

**Untersuchung der katalytischen Funktion
der Gyrase aus *Bacillus subtilis* mit
Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Thomas Göttler

aus Ingolstadt/Deutschland

Basel 2008

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag von

Prof. Dr. Dagmar Klostermeier

Prof. Dr. Stephan Grzesiek

Basel, den 25. März 2008

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri

Dekan

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel publiziert:

Göttler, T. & Klostermeier, D. (2007). Dissection of the nucleotide cycle of *B. subtilis* DNA gyrase and its modulation by DNA. *Journal of Molecular Biology* **367**, 1392-1404.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das untersuchte Protein | 1 |
| 1.1.1 Topoisomerasen..... | 1 |
| 1.1.2 Die Gyrase | 4 |
| 1.1.3 Superspiralisierung von Plasmiden..... | 7 |
| 1.1.4 Der Reaktionszyklus der Gyrase | 8 |
| 1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer..... | 11 |
| 1.2.1 Förster-Transfer | 11 |
| 1.2.2 Ensemble-FRET | 12 |
| 1.2.3 Einzelmolekül-FRET..... | 13 |
| 1.2.4 FRET mit Biomolekülen..... | 15 |
| 1.3 Zielsetzung der Arbeit..... | 18 |
| | |
| 2 Material | 20 |
| 2.1 Chemikalien | 20 |
| 2.2 Enzyme | 21 |
| 2.3 Bakterienstämme und Plasmide | 21 |
| 2.4 Medien | 22 |
| 2.5 Puffer und Lösungen..... | 22 |
| 2.6 Fluoreszenzfarbstoffe..... | 24 |
| 2.7 Oligonukleotide..... | 25 |
| 2.8 Geräte..... | 27 |
| 2.9 Datenauswertung..... | 29 |
| | |
| 3 Methoden | 30 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden | 30 |
| 3.1.1 PCR-Mutagenese | 30 |
| 3.1.2 Transformation | 31 |
| 3.1.2.1 Elektrotransformation..... | 31 |
| 3.1.2.2 Hitzetransformation..... | 31 |
| 3.1.3 PCR-Screen | 32 |
| 3.1.4 Expressionstest | 33 |
| 3.1.5 Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i> | 33 |
| 3.2 Proteinreinigung..... | 34 |
| 3.2.1 Zellaufschluss..... | 34 |
| 3.2.2 Proteinbehandlung | 35 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2.1 Ammoniumsulfatfällung | 35 |
| 3.2.2.2 Entfernung der DNA | 35 |
| 3.2.3 Flüssigchromatographie..... | 36 |
| 3.2.3.1 Theorie | 36 |
| 3.2.3.2 Heparin-Sepharose | 36 |
| 3.2.3.3 Blaue Sepharose | 37 |
| 3.2.3.4 Anionenaustauscher..... | 37 |
| 3.2.3.5 Größenausschlusschromatographie | 37 |
| 3.2.4 Reinigungskontrolle..... | 38 |
| 3.2.4.1 UV-Spektrometrie | 38 |
| 3.2.4.2 PAGE unter denaturierenden Bedingungen | 39 |
| 3.3 Substratbehandlung | 40 |
| 3.3.1 DNA-Präparation..... | 40 |
| 3.3.2 Ethanolfällung | 41 |
| 3.3.3 Phenol-Chloroform-Fällung | 41 |
| 3.3.4 Linearisierung..... | 41 |
| 3.3.5 Doppelstrangbildung..... | 42 |
| 3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese | 42 |
| 3.4 Aktivität | 43 |
| 3.4.1 Standard-Aktivitätstest | 43 |
| 3.4.2 Spaltung von Oligonukleotiden | 44 |
| 3.4.3 2D-Gelelektrophorese..... | 44 |
| 3.4.4 ssATPase-Test | 45 |
| 3.4.5 stATPase-Test..... | 46 |
| 3.5 Bindung..... | 48 |
| 3.5.1 Fluoreszenztitration | 48 |
| 3.5.1.1 mantADP-Titration..... | 48 |
| 3.5.1.2 Einzelpunktmessung in Anwesenheit von DNA | 49 |
| 3.5.1.3 Verdrängungstitration..... | 49 |
| 3.5.2 Bindungskinetik..... | 50 |
| 3.5.3 Anisotropie | 51 |
| 3.5.4 GEMSA | 52 |
| 3.5.5 Analytische Größenausschlusschromatographie | 53 |
| 3.5.6 Analytische Ultrazentrifugation..... | 54 |
| 3.6 Fluoreszenzmarkierung..... | 55 |
| 3.6.1 Auswahl geeigneter Positionen..... | 55 |
| 3.6.2 Statistische Doppelmarkierung..... | 56 |
| 3.6.3 Einzelmarkierung..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6.4 Analyse der Fluoreszenzmarkierung | 58 |
| 3.7 Bestimmung des Förster-Abstands | 60 |
| 3.7.1 Quantenausbeute | 60 |
| 3.7.2 Überlappungsintegral | 61 |
| 3.7.3 Förster-Abstand | 62 |
| 3.8 Ensemble-FRET | 62 |
| 3.8.1 ssFRET | 62 |
| 3.8.2 Zeitaufgelöste Messungen | 64 |
| 3.8.2.1 Aufbau | 64 |
| 3.8.2.2 Messung der IRF | 65 |
| 3.8.2.3 Messung der Donor-Lebensdauer | 66 |
| 3.8.2.4 Messung der Rotationskorrelationszeit | 68 |
| 3.9 Einzelmolekül-FRET | 69 |
| 3.9.1 Aufbau | 69 |
| 3.9.2 Einzelmolekülmessung | 71 |
| 3.9.3 Auswertung | 73 |
| 3.9.3.1 Zeitdiagramme | 73 |
| 3.9.3.2 FRET-Histogramme | 74 |
| 3.9.3.3 Einzelmolekülereignisse | 76 |
| 3.9.3.4 Beurteilung der Photonenergebnisse | 76 |
| 3.9.4 Bestimmung der Korrekturparameter | 78 |
| 3.9.4.1 Kreuzdetektion | 78 |
| 3.9.4.2 Quantenausbeute und Detektionseffizienz | 79 |
| 3.9.4.3 Direkte Anregung | 81 |
| 3.9.5 FCS | 82 |
| 3.9.5.1 Theorie | 82 |
| 3.9.5.2 Bestimmung des konfokalen Volumens | 84 |
| 3.9.5.3 Bestimmung von Diffusionskonstanten | 84 |
| 4 Ergebnisse | 86 |
| 4.1 Proteinreinigung | 86 |
| 4.1.1 Vorbehandlung | 86 |
| 4.1.2 Heparin-Sepharose | 86 |
| 4.1.3 Blaue Sepharose | 88 |
| 4.1.4 Größenausschlusschromatographie | 89 |
| 4.1.5 Reinigungsprotokolle | 90 |
| 4.1.6 Überblick über alle Mutanten | 91 |
| 4.2 Aktivität | 94 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.1 DNA-Topoisomerisierung durch Gyrase..... | 94 |
| 4.2.1.1 Standard-Aktivitätstest | 94 |
| 4.2.1.2 Nukleotidanaloga | 96 |
| 4.2.1.3 Aktivität von Gyrasemutanten..... | 97 |
| 4.2.1.4 Spaltung von Oligonukleotiden..... | 98 |
| 4.2.1.5 Bestimmung des Vorzeichens der Spiralisierung..... | 99 |
| 4.2.2 ssATPase-Aktivität von Gyrase..... | 100 |
| 4.2.2.1 Abhängigkeit von GyrB | 100 |
| 4.2.2.2 Abhängigkeit von GyrA | 102 |
| 4.2.2.3 Abhängigkeit von ATP..... | 103 |
| 4.2.2.4 Abhängigkeit von DNA..... | 104 |
| 4.2.2.5 Kooperativität..... | 106 |
| 4.2.2.6 Modifizierter ssATPase-Test..... | 107 |
| 4.2.2.7 Einfaches Bindungsmodell..... | 109 |
| 4.2.3 stATPase-Aktivität von GyrB..... | 110 |
| 4.2.3.1 ATP-Hydrolyserate | 110 |
| 4.2.3.2 Nukleotidanaloga | 111 |
| 4.3 Bindungseigenschaften | 112 |
| 4.3.1 Nukleotidbindung | 112 |
| 4.3.1.1 Bindung von GyrB an Nukleotide..... | 112 |
| 4.3.1.2 Einfluss von GyrA..... | 114 |
| 4.3.1.3 Einfluss von DNA | 115 |
| 4.3.1.4 GyrB E44Q..... | 116 |
| 4.3.1.5 Nukleotidanaloga | 116 |
| 4.3.2 Messung der Bindungskinetik | 117 |
| 4.3.3 Bindung von GyrA an DNA | 118 |
| 4.3.4 Bindung von GyrA an GyrB..... | 119 |
| 4.3.4.1 Anisotropietitrationen..... | 119 |
| 4.3.4.2 Tetramer- und Trimerbildung..... | 121 |
| 4.3.4.3 Verdrängungstitration..... | 124 |
| 4.3.5 GEMSA-Ergebnisse | 125 |
| 4.3.6 Analytische Größenausschlusschromatographie | 127 |
| 4.3.6.1 Einzelne Untereinheiten | 127 |
| 4.3.6.2 Tetramerbildung | 128 |
| 4.3.6.3 Einfluss von Nukleotiden | 130 |
| 4.3.7 Analytische Ultrazentrifugation..... | 131 |
| 4.4 Fluoreszenzmarkierung..... | 132 |
| 4.4.1 Farbstoffspektren | 132 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.2 Spektrale Verschiebung | 133 |
| 4.4.3 Einzelmarkierung..... | 134 |
| 4.4.4 Statistische Doppelmarkierung..... | 136 |
| 4.5 Bestimmung des Förster-Abstands | 138 |
| 4.5.1 Donor-Quantenausbeute | 138 |
| 4.5.2 Überlappungsintegral..... | 138 |
| 4.5.3 Förster-Abstand | 138 |
| 4.6 Ensemble-FRET..... | 140 |
| 4.6.1 ssFRET mit markierter DNA..... | 140 |
| 4.6.2 Zeitaufgelöste Messungen | 141 |
| 4.6.2.1 IRF..... | 141 |
| 4.6.2.2 Donor-Lebensdauer | 142 |
| 4.6.2.3 Rotationskorrelationszeit..... | 143 |
| 4.7 Einzelmolekül-FRET | 145 |
| 4.7.1 Optimierung der Messparameter | 145 |
| 4.7.1.1 Donor-Akzeptor-Verhältnis..... | 145 |
| 4.7.1.2 Anregungsintensität..... | 147 |
| 4.7.1.3 Proteinkonzentration | 148 |
| 4.7.2 Korrekturparameter..... | 149 |
| 4.7.3 C-Tor | 150 |
| 4.7.3.1 Verschiedene Farbstoffpositionen | 150 |
| 4.7.3.2 Gyrase mit Substraten | 153 |
| 4.7.3.3 Einzelmolekülereignisse..... | 155 |
| 4.7.3.4 Verwendung von Glycerin | 157 |
| 4.7.4 DNA-Tor | 158 |
| 4.7.4.1 Verschiedene Farbstoffpositionen | 158 |
| 4.7.4.2 Gyrase mit Substraten | 159 |
| 4.7.4.3 Einsatz von Inhibitoren | 160 |
| 4.7.4.4 Einzelmolekülereignisse..... | 161 |
| 4.7.5 N-Tor | 163 |
| 4.7.6 C-terminale Domäne von GyrA..... | 164 |
| 4.7.6.1 TMR als Akzeptor | 164 |
| 4.7.6.2 Alexa555 als Akzeptor | 167 |
| 4.7.7 FCS | 169 |
| 4.7.7.1 Konfokales Volumen..... | 169 |
| 4.7.7.2 Plasmidbindung..... | 169 |

| | |
|--|------------|
| 5 Diskussion | 172 |
| 5.1 Biochemische Charakterisierung | 172 |
| 5.1.1 Reinigung der Untereinheiten..... | 172 |
| 5.1.2 Rekonstitution der nativen Gyrase..... | 173 |
| 5.1.3 Charakterisierung der ATPase-Aktivität | 174 |
| 5.1.3.1 GyrB als DNA-abhängige ATPase..... | 174 |
| 5.1.3.2 Nicht-kooperatives Verhalten..... | 176 |
| 5.1.3.3 Ratenkonstanten im Nukleotidzyklus..... | 177 |
| 5.1.4 Bindungseigenschaften der Gyrase..... | 178 |
| 5.1.4.1 Affinität zu Nukleotiden..... | 178 |
| 5.1.4.2 Affinität zu DNA..... | 180 |
| 5.1.4.3 Bindung von GyrA an GyrB | 182 |
| 5.1.5 Kontrolliertes Ausschalten des Enzyms | 184 |
| 5.2 Von der Mutation zum Laseraufbau | 186 |
| 5.2.1 Herstellung und Fluoreszenzmarkierung der Cysteinmutanten..... | 186 |
| 5.2.2 Spektrale Eigenheiten der Mutanten..... | 188 |
| 5.2.3 Ensemblemessungen..... | 190 |
| 5.3 Einzelmolekül-FRET mit Gyrase..... | 191 |
| 5.3.1 Optimierung der Methode..... | 191 |
| 5.3.2 Verschiedene Bereiche der Gyrase | 193 |
| 5.3.2.1 C-Tor | 193 |
| 5.3.2.2 DNA-Tor | 196 |
| 5.3.2.3 N-Tor | 199 |
| 5.3.2.4 C-terminale Domäne von GyrA | 200 |
| 5.4 Ausblick | 202 |
| | |
| 6 Zusammenfassung | 207 |
| | |
| 7 Anhang | 209 |
| 7.1 Auswertung der ssATPase-Tests | 209 |
| 7.1.1 Michaelis-Menten-Kinetik..... | 209 |
| 7.1.2 Hill-Gleichung | 210 |
| 7.1.3 Kooperativitätsparameter..... | 211 |
| 7.1.4 Einfaches Bindungsschema | 211 |
| 7.2 Auswertung der Fluoreszenzmessungen | 213 |
| 7.2.1 1:1-Bindungsmodell | 213 |
| 7.2.2 mantADP-Titration..... | 213 |
| 7.2.3 Verdrängungstitration..... | 214 |

| | |
|---|------------|
| 7.3 Auswertung der Anisotropiemessungen | 215 |
| 7.3.1 Einfache Anisotropietitration..... | 215 |
| 7.3.2 Globales Modell | 216 |
| 7.3.3 Verdrängungstitration..... | 218 |
| 7.4 DNA- und Proteinsequenzen | 219 |
| 7.4.1 GyrA | 219 |
| 7.4.2 GyrB | 220 |
| | |
| 8 Literaturverzeichnis | 222 |
| | |
| Abkürzungsverzeichnis | 231 |
| | |
| Danksagung | 234 |
| | |
| Lebenslauf | 235 |

1 Einleitung

1.1 Das untersuchte Protein

1.1.1 Topoisomerasen

Topoisomerasen^{1,2} katalysieren die Interkonversion von verschiedenen topologischen Zuständen der DNA in der Zelle. Sie relaxieren und superspiralisieren Plasmide, trennen Catenane oder lösen DNA-Knoten, die bei wichtigen zellulären Vorgängen entstehen können. Es handelt sich um ubiquitäre molekulare Maschinen aus ein oder mehreren Untereinheiten, die ihre biochemische Funktion in der Regel an eine Hydrolyse von ATP-Molekülen koppeln. Topoisomerasen werden in zwei Hauptgruppen (Topo I und Topo II) unterteilt, die ihrerseits genauer klassifiziert werden.

Typ-I-Vertreter sind dadurch gekennzeichnet, dass sie zur Ausübung ihrer Funktion einen DNA-Einzelstrang reversibel spalten und die entstehenden Enden affin bzw. kovalent über ein hochkonserviertes reaktives Tyrosin binden^{1,2}. Bei Ia-Topoisomerasen wird die OH-Gruppe der Aminosäure an das 5'-Ende des Phosphatrückgrats gekoppelt, während bei Ib-Enzymen das 3'-Ende kovalent festgehalten wird. Nahezu alle Typ-I-Arten liegen als Monomere mit einer Länge von etwa 650 – 1250 Aminosäuren vor. Die Unterarten haben sich in der Regel auf verschiedene Tätigkeiten spezialisiert, so dass es verständlich ist, warum in derselben Zelle stets mehrere Arten von Topoisomerasen vorkommen. So ist beispielsweise in *E. coli* die Topo I für die Relaxierung von negativen superhelikalen Windungen zuständig, während die Topo III (beide vom Typ Ia) bevorzugt Catenane löst. Beide Vertreter nehmen die jeweils andere Aufgabe nur eingeschränkt wahr. Die Notwendigkeit dieser Tätigkeiten ergibt sich aus elementaren Zellprozessen wie der Replikation, der Transkription oder der Rekombination der genetischen Information. So werden z. B. bei der Replikation des zirkulären Genoms von Bakterien die beiden Einzelstränge derart kopiert, dass die entstehenden Doppelstränge in einer Catenanform vorliegen. Die Ringe sind also ineinander verschlungen und können somit nur getrennt werden, wenn ein Strang von der Topo III temporär gespalten wird, damit der andere Strang hindurchtreten kann. Eine übermäßige Superspiralisierung entsteht ebenfalls bei der Replikation oder auch bei der Transkription des Genoms: Eine DNA-Helikase wandert dabei entlang eines Doppelstrangs und entwindet ihn, wobei hinter ihr relaxierte DNA-Abschnitte entstehen. Gleichzeitig wird der Teil der DNA, der noch vor dem Enzym liegt, entsprechend stark verdrillt, was nur zu einem bestimmten Grad energetisch möglich ist. Die Reaktion würde also zum Erliegen kommen, würde sie nicht ständig von einer Entspannungsreaktion begleitet. Die Topo I nimmt diese Aufgabe wahr, indem sie superspiralisierte DNA relaxiert. Sie spaltet dabei einen Einzelstrang, hält die beiden entstehenden Enden fest und leitet den zweiten Strang durch die Lücke. Nach der Religation der gebundenen Enden liegen beide Stränge topologisch invertiert vor, so

dass Spannung aus dem Plasmid genommen wurde. Eukaryotische Topo-III-Vetreter führen die gleiche Reaktion an übermäßig verdrillten Chromosomen im Zellkern aus, wobei sie sich diese Aufgabe mit Topo-II-Enzymen teilen. Ib-Enzyme kommen hauptsächlich in höheren Organismen vor und haben keine strukturelle Ähnlichkeit zu den Ia-Topoisomerasen. Die eukaryotische Topo I (vom Typ Ib) relaxiert positiv und negativ superspiralisierte Plasmide, allerdings mit einem anderen Mechanismus als die Topo III: Das Enzym führt einen temporären Einzelstrangbruch in die dsDNA ein, so dass der Doppelstrang an der Bruchstelle solange frei rotieren kann, bis genügend Torsionsspannung beseitigt wurde. Topoisomerasen sind also prinzipiell dafür zuständig, mit verschiedenen Mechanismen topologische Probleme zu lösen, die im Zusammenhang mit der Replikation und weiteren zellulären Prozessen auftreten. Ein Sonderfall ist die reverse Gyrase vom Typ Ia, die v. a. in hyperthermophilen Archäen, aber auch in einigen thermophilen Eubakterien vorkommt³⁻⁵. Dieses zinkfingerhaltige Enzym ist die einzige bekannte Topoisomerase, die unter ATP-Verbrauch positive Superspiralisierung in ein Plasmid einführen kann. Es ist anzunehmen, dass diese Fähigkeit eine Adaptation an die extremen Bedingungen ist, bei denen diese Organismen aufwachsen.

Bei den Typ-II-Topoisomerasen^{1,2} handelt es sich durchweg um Komplexe mit zwei bzw. vier Untereinheiten. Ihre kennzeichnende Eigenschaft ist die reversible Spaltung eines DNA-Doppelstrangs im aktiven Zentrum, um einen zweiten Doppelstrang aktiv durch die entstehende Lücke führen zu können. Durch diese topologische Umorientierung kann Superspiralisierung in Plasmiden bzw. eukaryotischen Chromosomen beseitigt oder eingeführt werden. Die beiden Enden der DNA werden im Abstand von vier Basenpaaren jeweils am 5'-Ende von zwei Tyrosinen kovalent gebunden, die sich an der gleichen Aminosäureposition auf zwei identischen Untereinheiten befinden. Fast alle Topo-II-Vetreter gehören zum Typ IIa; lediglich in einigen Archäen kommt ein strukturell unterschiedliches Protein vor, das als Prototyp der Unterklasse IIb klassifiziert wurde. Die eukaryotische Topo II ist ein Homodimer, während bakterielle Vertreter Heterotetramere der Form A₂B₂ sind. Dennoch wird in beiden Fällen eine gleichartige Gesamtstruktur ausgebildet, da die Untereinheiten A bzw. B des prokaryotischen Enzyms homolog zur C- bzw. N-terminalen Hälfte der eukaryotischen Untereinheit sind. Die Topo II in höheren Organismen relaxiert gemeinsam mit einigen Typ-I-Enzymen negativ superspiralisierte DNA, die im Zusammenhang mit Prozessen wie der Replikation oder der Transkription des Genoms auftreten. Das Protein benötigt dafür die freiwerdende Energie aus der Hydrolyse von ATP-Molekülen, wobei diese nicht für die Spaltung des Doppelstrangs, sondern für die auftretenden Konformationsänderungen im Enzym eingesetzt wird. Die eubakterielle Topoisomerase IV, deren Untereinheiten in der Literatur als ParC bzw. ParE bezeichnet werden, kann ebenfalls relaxieren, ist jedoch hauptsächlich für die Trennung von Catenanen nach einer Replikationsrunde zuständig. Im Gegensatz dazu besitzt die Gyrase, die nur in Eubakterien vorkommt, als einzige Topoisomerase die Fähigkeit, relaxierte DNA unter ATP-Verbrauch negativ zu spiralisieren. Daneben kann sie, genau wie das Topo-IV-Enzym, negative Superhelices

relaxieren, was bei der Gyrase allerdings ATP-unabhängig abläuft. Die Antwort auf die Frage, warum dasselbe Enzym zwei gegenteilige Reaktionen katalysiert, ergibt sich wiederum aus den elementaren Zellprozessen, die von Topoisomerasen begleitet werden: Bei der Replikation des genetischen Materials und bei der Transkription muss zuerst ein lokaler Einzelstrang gebildet werden, damit eine Polymerase diesen kopieren bzw. von diesem die gewünschte Information ablesen kann. Diese lokale Doppelstrangentwindung wird erheblich vereinfacht, wenn die DNA zu einem bestimmten Grad negativ superspiralisiert ist. Einige Promotoren können sogar überhaupt nicht erkannt werden, wenn das Plasmid völlig relaxiert vorliegt. Bei einer zu hohen Superspiralisierung ist es für Polymerasen aber ebenso unmöglich, an die DNA zu binden. Die Aufgabe der Gyrase besteht nun darin, einen bestimmten Grad an negativer Superspiralisierung im Plasmid aufrechtzuerhalten, was sie je nach der Situation durch eine Einführung oder durch eine Beseitigung von negativen Superhelices tut. Dabei wird sie von den Topoisomerasen I und IV unterstützt, die allerdings nur relaxieren können. Die Schaffung idealer Bedingungen für die Initiation von elementaren zellulären Prozessen ist also – neben der Beseitigung topologischer Probleme – die zweite große Aufgabe, die von Topoisomerasen ausgeführt wird.

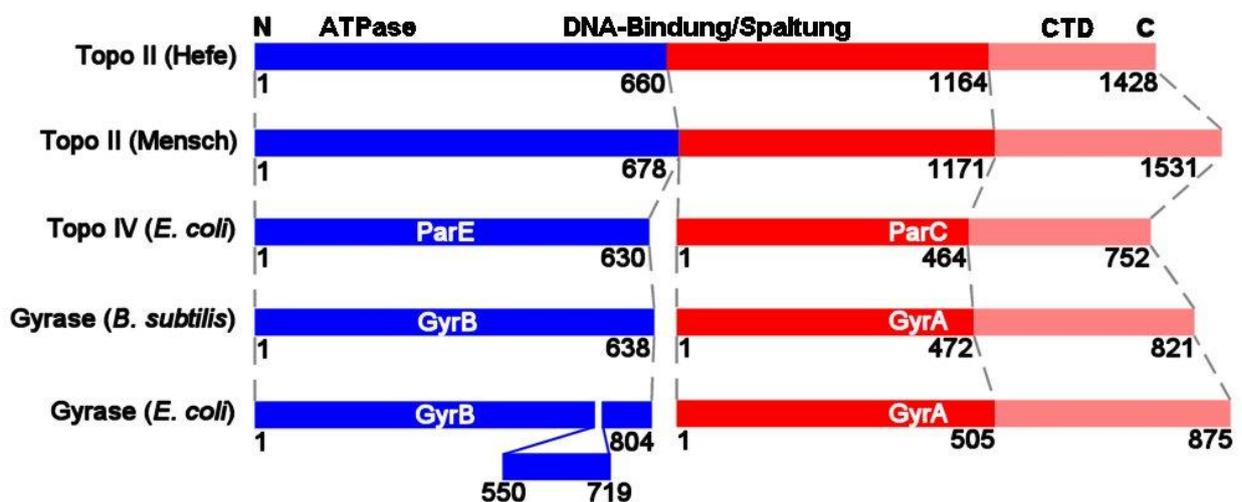


Abbildung 1: Domänenvergleich einiger Vertreter der Topo-II-Klasse. Homologe Bereiche in verschiedenen Enzymen sind mit Rechtecken gleicher Farbe dargestellt (die Zahlen geben die Aminosäureposition an). Eine Erläuterung des Schemas findet sich im Text.

Ein Vergleich zwischen verschiedenen Vertretern der Topo-II-Klasse ist schematisch in Abb. 1 gezeigt¹. Die Untereinheiten GyrB (bzw. ParE) und GyrA (ParC) zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit mit der N- und der C-terminalen Hälfte der eukaryotischen Typ-IIa-Topoisomerasen. Tatsächlich sind auch die Gene, die für die prokaryotischen Monomere codieren, auf dem Chromosom direkt nacheinander angeordnet. Die Bereiche, die für die ATP-Hydrolyse (in der Gyrase: GyrB) sowie für die Bindung und Spaltung der DNA (GyrA und GyrB) zuständig sind, finden sich in allen IIa-Enzymen an einer vergleichbaren Stelle. Auch die C-terminale Domäne (CTD) kommt in allen Spezies vor, allerdings kann

nur die Gyrase diese einsetzen, um negative Superspiralisierung in relaxierte Plasmide einzuführen. Einige Gyrasen, beispielsweise in *E. coli*, besitzen darüber hinaus GyrB-Untereinheiten mit nicht konservierten Insertionen, deren Funktion jedoch unklar ist. Die eukaryotischen Topo-II-Vertreter, die bislang am besten erforscht wurden, sind diejenigen aus der Hefe, aus *Drosophila* sowie aus dem Menschen. Bei der Gyrase war das Exemplar aus *E. coli* bislang das Standardobjekt der Forschung und es sind 3D-Strukturen von der N-terminalen Domäne von GyrB⁶ sowie von beiden GyrA-Bereichen^{7,8} bekannt; aber auch von einem Teil der ähnlichen Topo IV aus *E. coli*⁹ bzw. aus *Streptococcus pneumoniae*¹⁰. Die C-terminale Domäne von GyrB konnte bislang nicht kristallisiert werden, allerdings ist zu vermuten, dass ihre Struktur (abgesehen von der nicht-konservierten Insertion) eine deutliche Ähnlichkeit zum homologen Teil der Hefe-Topo II^{11,12} aufweist.

1.1.2 Die Gyrase

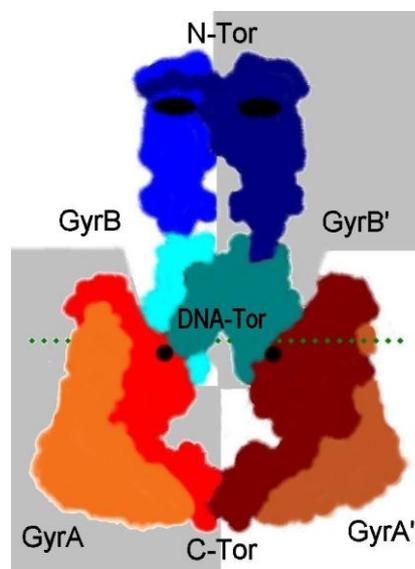


Abbildung 2: Schematische Gesamtstruktur der Gyrase. Die vier Untereinheiten GyrA, GyrA', GyrB und GyrB' sind weiß bzw. grau hinterlegt. Die verschiedenen Domänen sind farblich unterschiedlich gekennzeichnet: ATPase-Domänen (N-terminaler Teil von GyrB) in dunkelblau, DNA-Fangdomänen (C-terminale Domäne von GyrB) in türkis, DNA-Bindedomänen (N-terminaler Teil von GyrA) in (dunkel-)rot und die CTD (C-terminale Domäne von GyrA) ockerfarben. Eine grüne gepunktete Linie gibt die ungefähre Position des gebundenen DNA-Strangs (G-DNA) an. Das DNA-Tor befindet sich in der Abbildung in einer halbgeöffneten Konformation. Die beiden aktiven Tyrosine (in GyrA) und die beiden ATP-Bindestellen (in GyrB) sind mit schwarzen Kreisen bzw. Ellipsen eingezeichnet. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

Die im Jahr 1976 erstmals beschriebene Gyrase^{13,14} (Klassifikation EC 5.99.1.3) ist eine bakterielle Topoisomerase vom Typ IIa. Sie setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, von denen jeweils zwei identisch sind¹⁵, und hat daher die heterotetramere Struktur A₂B₂. Die Monomere, die als GyrA bzw. GyrB bezeichnet werden, haben (in *Bacillus subtilis*) ein Molekulargewicht von etwa 92,1 kDa (821 Aminosäuren) bzw. 71,5 kDa (638). Das aktive tetramere Enzym besteht somit aus insgesamt 2918

Aminosäuren mit einer Masse von 327,2 kDa. Die Untereinheit GyrA bindet derart hochaffin an sich selbst, dass sie, auch wenn kein GyrB vorhanden ist, grundsätzlich ein Dimer GyrA_2 bildet¹⁶. GyrB liegt dagegen (in Abwesenheit von GyrA bzw. Nukleotiden) als Monomer vor^{17,18}, bis es auf GyrA_2 trifft und gemeinsam mit einem weiteren GyrB das aktive Tetramer formt. Die Struktur des gesamten Enzyms ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.

GyrB ist ein Mitglied der GHKL-Superfamilie¹⁹, d. h. das Enzym weist eine charakteristische Helix-Faltblatt-Faltung auf, die auch in einigen anderen ATPasen (Chaperon Hsp90, Histidinkinase und das DNA-Reparaturenzym MutL) zu finden ist. Die Untereinheit besteht aus zwei verschiedenen Domänen und besitzt im N-terminalen Bereich (ca. 400 Aminosäuren) eine ATP-Hydrolysestelle²⁰⁻²². Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass GyrB in der Lage ist, nach der Bindung von ATP zu dimerisieren²³, so dass sich ein Komplex aus jeweils zwei GyrB- und ATP-Molekülen ergibt. Die Bindung des Nukleotids löst eine Konformationsänderung in GyrB aus, so dass es affiner zu sich selbst wird, solange es das Substrat gebunden hat. Dieser Zustand ist aber nicht dauerhaft, da nach einer Hydrolyse des Nukleotids das entstehende ADP dissoziiert und die beiden GyrB-Einheiten sich wieder trennen. Die (schwache) intrinsische ATP-Hydrolyserate von GyrB²² steigt in Anwesenheit von DNA deutlich an²⁰. Wird statt ATP das nicht-spaltbare Analogon AMPPNP als Bindungspartner eingesetzt, ist das Dimer aus zwei GyrB-Molekülen stabil²⁴ und kann kristallisiert werden⁶. Zur Verstärkung der Affinität können sich die N-terminalen 15 – 20 Aminosäuren von GyrB um die komplementäre Untereinheit herumlegen, wie es in Abb. 2 angedeutet ist. In A_2B_2 bilden die beiden ATPase-Domänen von GyrB das sogenannte N-Tor, das entweder im offenen oder im geschlossenen Zustand vorliegen kann, wobei eine Nukleotidbindung die Schließung des Tores induziert. Die zweite (C-terminale) Domäne von GyrB ist die sogenannte DNA-Fangdomäne, die dafür zuständig ist, ein DNA-Substrat zum aktiven Zentrum des Enzyms zu leiten¹. Sie bindet an die N-terminale Domäne von GyrA und stellt mit dieser den Zentralbereich des Tetramers dar. In diesem Abschnitt liegt auch das DNA-Tor, das sowohl von GyrA- als auch von GyrB-Strukturen gebildet wird und in Abb. 2 im halboffenen Zustand zu sehen ist. Zwischen dem N- und dem DNA-Tor liegt ein Hohlraum mit einem Durchmesser von ca. 2 – 3 nm, die groß genug ist, um eine doppelsträngige DNA zu umschließen, was für die Funktion des Proteins erforderlich ist.

GyrA besteht ebenfalls aus zwei verschiedenen Domänen, die durch eine Behandlung der Untereinheit mit der Proteinase Trypsin getrennt werden können²⁵. Die N-terminale Hälfte enthält die DNA-Bindestelle, deren dimere Struktur in A_2B_2 eine Homologie zum Transkriptionsfaktor CAP (*catabolite activator protein*) aufweist¹. In GyrA_2 (in Abwesenheit von GyrB) ist das DNA-Tor wegen der hohen Autoaffinität von GyrA immer geschlossen⁷, während sich im Tetramer die N-terminalen GyrA-Domänen auch voneinander entfernen können¹² (Abb. 2). Die GyrA-Untereinheit enthält ein hochkonserviertes reaktives Tyrosin (Y122 in *E. coli*; Y123 in *B. subtilis*). Im aktiven Zentrum von A_2B_2 liegen somit zwei

Tyrosine vor, die sich auf beiden Seiten der DNA-Bindestelle befinden. Die reaktiven Aminosäuren sind in der Lage, mit ihren OH-Gruppen einen nukleophilen Angriff auf das Phosphodiesterückgrat der gebundenen (und leicht gebogenen) G-DNA zu verüben und sie auf diese Art zu spalten. Die beiden N-terminalen Domänen in einem GyrA₂-Dimer sind mit einer herzförmigen Struktur vergleichbar, die in der Mitte einen Hohlraum mit einem Durchmesser von ca. 3 – 4 nm hat. Darunter befindet sich das sogenannte C-Tor der Gyrase, das von zwei GyrA-Spitzen (mit langen α -Helices) gebildet wird und vermutlich – wie auch die beiden anderen Tore des Enzyms – im offenen bzw. im geschlossenen Zustand vorliegen kann. Die Form des Tetramers A₂B₂ ähnelt insgesamt einer Acht, die an drei Stellen (oben, in der Mitte und unten) öffnen und schließen kann und zwei Lücken besitzt, die jeweils groß genug sind, um eine dsDNA zu umschließen. Die zweite Domäne von GyrA ist die CTD (C-terminale Domäne), deren Struktur erst in den letzten Jahren aufgeklärt werden konnte. Die vorhandenen Röntgenstrukturdaten aus *E. coli*⁸ sowie aus *Borrelia burgdorferi*²⁶ zeigen einen geschlossenen Ring aus sechs gleichartigen (repetitiven) Strukturen mit jeweils ca. 50 Aminosäuren sowie einer Erweiterung auf beiden Seiten. Die CTD befindet sich im GyrA₂-Dimer auf der abgewandten Seite des Zentralbereiches¹⁶ und ist für die Enzymfunktion essentiell: Eine Gyrase mit abgeschnittenen GyrA-Fragmenten, die keine CTD besitzen, kann zwar noch Plasmide relaxieren, aber keine negativen Superhelices mehr einführen²⁷. Man geht davon aus, dass diese Domänen in der Lage sind, etwa 140 Basenpaare eines DNA-Doppelstrangs (T-DNA) um sich herumzuwickeln^{28,29}, damit sie diesen durch das Enzym hindurchführen können. Sie nehmen also eine aktive Rolle bei der energetisch ungünstigen Einführung von Superhelices in ein Plasmid an. Die CTD ist scharnierartig in der Nähe des DNA-Tores mit der N-terminalen Domäne von GyrA verbunden. Während sie im Grundzustand (siehe Abb. 2) an dieser Struktur anliegt, klappt sie vermutlich nach oben, nachdem sie ein DNA-Substrat gebunden hat¹⁶. Die für die Superspiralisierung essentiellen Aminosäuren der CTD von GyrA wurden in einer Studie über das homologe Enzym aus *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben³⁰.

Die Gyrase kann einerseits ATP-unabhängig superspiralisierte Plasmide relaxieren und andererseits unter ATP-Verbrauch negative Superhelices in relaxierte Plasmide einführen³¹, was sie von allen anderen Topoisomerasen unterscheidet. Mehrere Verbindungen sind bekannt, die die enzymatische Aktivität der Gyrase effektiv blockieren³². So kann z. B. die ATPase-Funktion, für die die Untereinheit GyrB zuständig ist, sehr spezifisch durch die Cumarinverbindungen Novobiocin oder Coumermycin A₁ kompetitiv inhibiert werden^{21,33,34}. Da diese Moleküle vermutlich nur GyrB angreifen, eignen sie sich gut zur Kontrolle, ob eine GyrB-Präparation weitere ATP-hydrolysierende Kontaminanten enthält oder nicht. Die Untereinheit GyrA wird dagegen spezifisch durch sogenannte Chinolone gehemmt^{35,36}. Bekannte Vertreter dieser Stoffklasse sind die Grundverbindung Nalidixinsäure und ihre Derivate Oxolinsäure, Norfloxacin oder Ciprofloxacin. Lange Zeit lag der Mechanismus der GyrA-Inhibition im Dunkeln, während man inzwischen davon ausgeht, dass sich diese Moleküle hochaffin an die temporär gespaltene

G-DNA lagern und damit ihre Religation behindern, wodurch der Reaktionszyklus des Enzyms blockiert ist. Einige Chinolone zeigen außerdem eine weitergehende Spezifität, da sie nur Gyrasen aus bestimmten Organismen inhibieren³⁷. Chinolone werden auch als Gyrasehemmer bezeichnet und spielen eine wichtige Rolle als Antibiotika gegen pathogene Bakterien, da sie nur die prokaryotische Gyrase, aber keine humanen Topoisomerasen angreifen.

1.1.3 Superspiralisierung von Plasmiden

Das natürliche Substrat der Gyrase ist neben dem Energielieferanten ATP das ringförmige Chromosom des Bakteriums¹. Ein solcher zirkulär geschlossener DNA-Doppelstrang, d. h. ein Plasmid, liegt *in vitro* im Grundzustand völlig entspannt vor. Dieser energetisch günstigste Zustand ist dann erreicht, wenn aus genau 10 Basenpaaren der DNA eine Doppelhelix gebildet wird. Einem solchen relaxierten DNA-Molekül wird die Windungszahl $L = \pm 0$ zugewiesen. Plasmide mit einer höheren (niedrigeren) Windungszahl, also mit weniger (mehr) als 10 Basenpaaren pro Windung, weisen eine Torsionsspannung auf und werden als positiv (negativ) superspiralisiert bezeichnet. Die Windungszahl (L von *linking number*), die immer ganzzahlig ist, setzt sich zusammen aus der helikalen (T von *twist*) und aus der superhelikalen Windungszahl (W von *writhe*; Gleichung 1):

$$L = T + W$$

Die helikale Windungszahl T gibt an, wie oft der Doppelstrang intern um seine Achse verdrillt ist und kann je nach Richtung der Torsion negativ bzw. positiv sein. Die superhelikale Windungszahl W bezeichnet die Anzahl der globalen Überkreuzungen des Doppelstrangs mit sich selbst. Diese topologischen Zustände werden schematisch in Abb. 3 verdeutlicht.

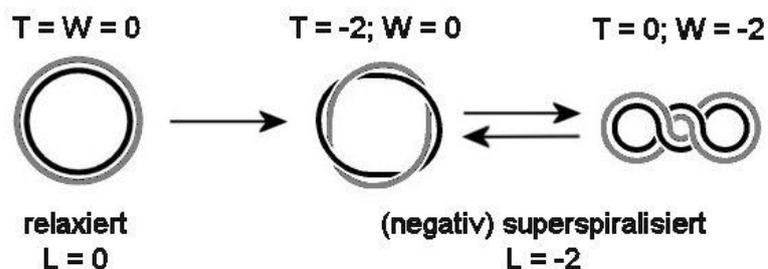


Abbildung 3: DNA-Topologie. Dargestellt ist eine schematische ringförmige dsDNA mit einem grauen und einem schwarzen Strang. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die beiden Stränge nicht als Doppelhelix, sondern nebeneinander gezeichnet. Gyrase kann das Plasmid durch einen temporären Doppelstrangbruch vom relaxierten Zustand (links; $L = 0$) in den negativ superspiralisierten Zustand ($L = -2$) überführen. Die beiden Konformationen in der Mitte und rechts können anschließend ohne weiteren Strangbruch frei ineinander übergehen. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

Zwei verschiedene Zustände mit derselben Windungszahl L , aber verschiedenen T - und W -Werten, können frei ineinander übergehen. Dagegen ist für eine Änderung von L die Einführung eines reversiblen Strangbruchs notwendig, um einen anderen Strang durch die entstehende Lücke führen zu können. Typ-II-Topoisomerasen wie z. B. die Gyrase können einen Doppelstrangbruch in der DNA erzeugen, so dass sie die Windungszahl des Plasmids je nach Reaktionsrichtung in Zwischenschritten (± 2) verändern. Topoisomerasen vom Typ I, die nur einen Einzelstrangbruch generieren, variieren den L -Wert dagegen in Einerschritten (± 1). Gleichartige Plasmide, die sich ausschließlich in ihrer Windungszahl unterscheiden, werden als Topoisomere bezeichnet. *In vivo* sorgt die Gyrase dafür, dass bakterielle Chromosomen stets zu einem bestimmten Grad negativ superspiralisiert sind, so dass mehr als 10 Basenpaare eine Windung bilden. Dies erleichtert die lokale Entwindung bzw. Einzelstrangbildung, die für essentielle Zellprozesse wie die Transkription oder die Replikation des genetischen Materials von großer Bedeutung ist.

1.1.4 Der Reaktionszyklus der Gyrase

Die Gyrase hat die Aufgabe, die räumliche Position von zwei DNA-Doppelsträngen auszutauschen. Dazu muss sie einen der beiden Stränge spalten, den anderen Strang durch die Lücke führen und diese wieder schließen. Da dieser Vorgang theoretisch beliebig oft wiederholt werden kann, liegt ein Reaktionszyklus vor¹, der schematisch in Abb. 4 dargestellt ist. Die Kombination aus den bereits vorliegenden biochemischen Daten^{15,20,23,34,38-43}, Experimenten mit einer magnetischen Pinzette⁴⁴⁻⁴⁶ sowie der strukturellen Information aus Röntgenkristalluntersuchungen erlaubt grundsätzlich die Aufstellung eines solchen Modells, wenn auch viele Details des Zyklus noch im Dunklen liegen und weiterhin auf ihre Aufklärung warten. Die Gyrase bindet in einem ersten Schritt (1) einen der beiden Doppelstränge, der im Folgenden als G-DNA (*gate* DNA) bezeichnet wird, mit hoher Affinität im Zentralbereich des Enzyms, der hauptsächlich von den beiden GyrA-Untereinheiten gebildet wird. Vermutlich wandert der Strang durch das offene N-Tor und entlang der DNA-Fangdomänen zur dimeren Bindestelle im aktiven Zentrum. In der Literatur wird eine Konsensussequenz⁴⁷ (5'-GNATGATCATNC-3') für die G-DNA beschrieben, wobei unklar ist, inwieweit diese spezifischer sein soll als eine beliebige DNA-Zufallssequenz. Das N-Tor wechselt dynamisch zwischen dem offenen und dem geschlossenen Zustand hin und her, wobei diese Fluktuation nach der G-DNA-Bindung und der darauf folgenden Konformationsänderung möglicherweise zunimmt. Ebenso gelangen die beiden aktiven Tyrosine (GyrA Y123 in *B. subtilis*) näher zum Substrat, so dass möglicherweise eine transiente reversible DNA-Spaltung einsetzt, die jedoch noch keine Öffnung des DNA-Tores zur Folge hat. Die hochkonservierten Tyrosine sind in der Lage, kovalent in einem Abstand von vier Basenpaaren an die beiden Stränge der dsDNA zu binden und diese dadurch zu öffnen. Die Kopplung erfolgt durch die Reaktion der nukleophilen OH-Gruppen der Aminosäuren mit den 5'-Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats und findet ohne energetischen Aufwand statt, da es sich um eine Umesterung handelt. Auf diese Weise entsteht eine

Lücke im G-DNA-Substrat, die jedoch schnell und einfach wieder geschlossen werden kann. Gelangt nun ein zweiter Doppelstrang, der T-DNA (*transfer* DNA) genannt wird, durch das offene N-Tor in das Enzym (2), kommt eine Reaktionsabfolge in Gang, um diesen Strang durch die gebundene DNA zu transportieren. Bei der T-DNA handelt es sich entweder um ein anderes Molekül oder um einen anderen Bereich derselben DNA, die bereits am DNA-Tor gebunden ist. Letzteres gilt dann, wenn es sich beim Substrat um ein ringförmiges Plasmid handelt, das von der Gyrase relaxiert oder superspiralisiert werden soll. Die relative Position des T-DNA-Segments gegenüber der G-DNA kann dabei, bezogen auf die Primärstruktur, distal (entfernt) oder proximal (direkt benachbart) sein⁴⁵. Das N-Tor schließt nun nach einer Bindung von einem bzw. zwei ATP-Molekülen stabil (3) und die DNA-Fangdomänen leiten die T-DNA in den Zentralbereich. Die Gyrase ist jetzt in der Lage, die G-DNA tatsächlich zu spalten, d. h. nach der Bildung des Tyrosinylesters werden die beiden Substrathälften aktiv auseinandergezogen, indem das DNA-Tor eine deutliche Konformationsänderung eingeht (4). Für diese Bewegung ist vermutlich die Spaltung eines ATP-Moleküls notwendig, um die nötige Energie bereitzustellen. Da die G-DNA-Hälften kovalent an die GyrA-Untereinheiten gebunden sind, besteht keine Gefahr, dass die Enden auseinanderdriften und für die weitere Reaktion verloren gehen. Der Transport der T-DNA durch das geöffnete DNA-Tor bzw. durch die gespaltene G-DNA erfolgt vermutlich ebenfalls durch eine Konformationsänderung des Enzyms, da der Doppelstrang auf diese Weise in den unteren Bereich der Gyrase gedrückt wird (5). Die beschriebenen Schritte laufen auch (zumindest ein einziges Mal) in Anwesenheit von nicht-spaltbaren Nukleotidanaloga ab, allerdings beschleunigt eine ATP-Hydrolyse die Reaktion signifikant, so dass naheliegt, dass hier die Energie aus der ATP-Spaltung in Bewegungsenergie umgewandelt wird. Der T-DNA-Transport muss auf jeden Fall zügig ablaufen, da nach der DNA-Tor-Öffnung ein energetisch ungünstiger Zustand vorliegt. Die T-DNA wird nun nach einer Schließung des DNA-Tores durch das C-Tor aus dem Enzym entlassen (6). Dieser sogenannte Zwei-Tor-Mechanismus, welcher besagt, dass die T-DNA durch ein Tor in das Enzym eintritt und durch ein anderes Tor wieder austritt, ist durch biochemische Daten gestützt. Wird nämlich das C-Tor durch eine Quervernetzung zweier eingefügter Cysteine künstlich kovalent geschlossen, ist der Reaktionszyklus blockiert^{48,49}. Andere Untersuchungen mit der homologen Hefe-IIa-Topoisomenase und speziellen Catenansubstraten stützen diese These⁵⁰. Ein älteres Modell, wonach die T-DNA die geöffnete G-DNA durchquert und anschließend beide Stränge gemeinsam durch das N-Tor wandern, konnte durch diese Experimente widerlegt werden. Im Zwei-Tor-Modell wird die gebundene G-DNA nach dem Austritt der T-DNA durch eine Rückbildung des Phosphodiesterückgrats religiert. Die Gyrase geht nun wieder in den Ausgangszustand über (7) und kann wahlweise eine neue Reaktionsrunde mit einer weiteren T-DNA eingehen oder den Zyklus durch eine Freisetzung der G-DNA beenden. Wenn das Protein kein ATP, sondern ein nicht-hydrolysierbares Nukleotidanalogen gebunden hat, können die letzten Schritte nicht mehr ausgeführt werden. Als Ergebnis des beschriebenen Reaktionszyklus haben die beiden Doppelstränge ihre räumliche Position getauscht, was zu einer Änderung der Superhelizität des Plasmids führt.

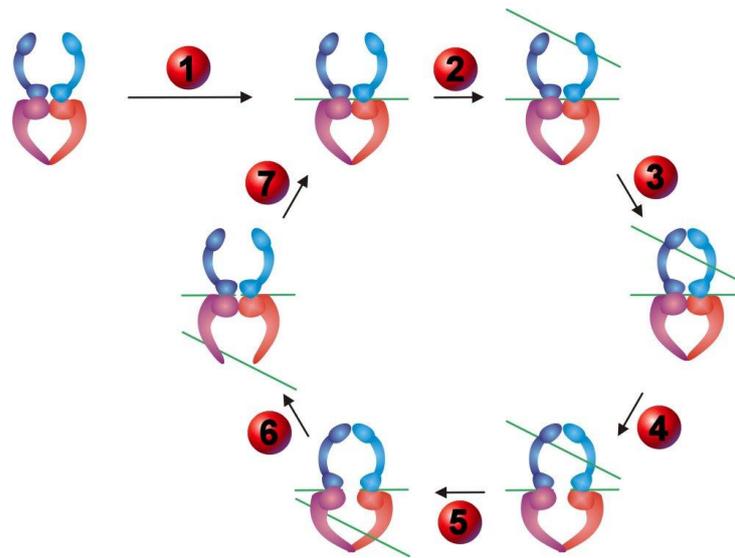


Abbildung 4: Der Reaktionszyklus der Gyrase. Das Enzym ist als Tetramer dargestellt, wobei die beiden GyrA-Untereinheiten (ohne die CTD) schematisch mit einer rötlichen und GyrB mit einer bläulichen Farbe eingezeichnet sind. Die beiden DNA-Stränge (G-DNA und T-DNA), deren räumliche Position im Verlauf des Zyklus getauscht wird, sind als grüne Linien dargestellt. Die einzelnen Schritte wurden nummeriert und sind im Text erläutert.

Der beschriebene Zyklus gilt nicht nur für die Gyrase, sondern analog für alle Typ-IIa-Topoisomerasen. Eukaryotische Vertreter, die als Homodimere vorliegen, können durch diese Reaktionsfolge unter ATP-Verbrauch Plasmide relaxieren. Dagegen benutzt die bakterielle Gyrase den Mechanismus, um durch eine Hydrolyse von zwei ATP-Molekülen und die darauf folgende Konformationsänderung negative Superspiralisierung und damit Torsionsspannung in ein relaxiertes Plasmid einzuführen. Neuere Daten weisen außerdem darauf hin, dass sich das T-DNA-Segment um die C-terminale Domäne (CTD) von GyrA wickelt und von dieser aktiv zum DNA-Tor geführt wird, was den energetisch ungünstigen Vorgang der Superspiralisierung überhaupt erst ermöglicht¹⁶. Andere Topoisomerasen vom Typ IIa, die keine vergleichbare Struktur (bzw. keine sogenannte „GyrA-Box“⁵¹) besitzen, sind daher nicht in der Lage, Superhelices einzuführen. Die ATP-unabhängige Relaxierung von negativ superspiralisierten Plasmiden durch die Gyrase findet in der umgekehrten Richtung statt. Man geht davon aus, dass die T-DNA durch das C-Tor in das Enzym wandert, dort den temporär geöffneten G-DNA-Strang durchquert und schließlich durch das N-Tor wieder austritt⁴⁹. Bei der T-DNA-Passage ist vermutlich wiederum die C-terminale Domäne von GyrA im Spiel, die den Durchtritt des Substrats durch das Enzym erleichtern kann. Da eine solche Plasmidrelaxierung energetisch begünstigt ist, kann dieser Vorgang auch in Abwesenheit von ATP stattfinden. Die Energie, die für die auftretenden Konformationsänderungen notwendig ist, wird in diesem Fall aus dem Rückgang der DNA-Torsionsspannung bezogen. Als weiterer auftretender Reaktionsvorgang wird in der Literatur eine Relaxierung von positiven Superhelices durch die Gyrase beschrieben^{45,49}, die prinzipiell mit der Einführung negativer Superhelices in relaxierte Plasmide vergleichbar ist und ATP-abhängig abläuft.

Der beschriebene Reaktionszyklus dient als Grundlage für die vorliegende Arbeit, wobei zu beachten ist, dass es sich bei einigen Teilschritten nur um mutmaßliche Vorgänge handelt, die noch genauer aufgeklärt werden müssen. Insbesondere die Zeitpunkte und die Kinetik der Bindung, Spaltung und Freisetzung der beiden Nukleotide sind nur eingeschränkt bzw. gar nicht erforscht. So herrschen beispielsweise verschiedene Ansichten darüber, ob beide ATP-Moleküle zeitgleich oder -versetzt gespalten werden⁵² bzw. ob nicht sogar ein Nukleotid bereits ausreicht, um die negative Superspiralisierung von Plasmiden (wenn auch auf einem deutlich langsameren Niveau) in Gang kommen zu lassen. Auch der genaue Zusammenhang zwischen der Bereitstellung von Energie durch die ATP-Hydrolyse und den Konformationsänderungen, die zum Durchtritt der T-DNA durch die gesamte Gyrase führen, ist kaum verstanden.

1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

1.2.1 Förster-Transfer

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) bzw. Förster-Transfer ist ein physikalischer Prozess, der 1946 von Theodor Förster beschrieben wurde⁵⁴. Dabei wird die Energie eines Fluoreszenzfarbstoffs nach der Anregung strahlungslos (über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) auf ein anderes Molekül übertragen, das sich im Abstand von maximal 10 nm (100 Å) zum ersten Fluorophor befindet. Die beiden Farbstoffe, die die Energie übertragen bzw. empfangen, werden als Donor bzw. Akzeptor bezeichnet. Der Förster-Transfer, d. h. die detektierbare FRET-Effizienz E_{FRET} , ist stark vom Abstand der beiden Fluorophore abhängig (Abb. 5) und fällt im Bereich von etwa 2 – 9 nm von 100 % auf 0 % ab. E_{FRET} kann durch folgende Gleichung bestimmt werden (1):

$$E_{\text{FRET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

Dabei ist R der Abstand zwischen Donor und Akzeptor und R_0 der sogenannte Förster-Abstand (oder Förster-Radius). Dieser bezeichnet die Farbstoffdistanz, bei der die Effizienz des Förster-Transfers genau 50 % beträgt ($E_{\text{FRET}} = 0,5$). R_0 ist eine charakteristische Kenngröße für ein bestimmtes Donor-Akzeptor-Paar und hängt von verschiedenen Parametern ab (siehe 3.7.3). So ist es z. B. erforderlich, dass sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt, damit dieser in der Lage ist, die übertragene Energie aufzunehmen. Daneben spielt auch die relative Orientierung der beiden Farbstoffe, die Donor-Quantenausbeute und der Brechungsindex des umgebenden Mediums eine Rolle. Für den Donor Alexa488 und den Akzeptor TMR ergibt sich, wenn die Farbstoffe in freier Form im Puffer vorliegen, ein Förster-Radius von 5,4 nm. Verwendet man stattdessen die Akzeptormoleküle

Alexa546 oder Alexa555, so verschiebt sich R_0 wegen der stärkeren Überlappung der Spektren zu den Werten 6,4 nm bzw. 7,0 nm. Nach einer Kopplung der Fluorophore an ein Biomolekül (z. B. an die Gyrase) kann sich R_0 in Abhängigkeit von der Position geringfügig ändern, was damit zusammenhängt, dass die molekulare Umgebung eines Farbstoffs einen Einfluss auf sein Spektrum sowie auf seine Quantenausbeute hat. Da die gemessene FRET-Intensität vom Abstand zwischen den beiden Fluorophoren abhängt, kann dieser physikalische Vorgang als „molekulares Lineal“ eingesetzt werden, womit gemeint ist, dass die Bestimmung von E_{FRET} für die Abstandsmessung im nm-Bereich verwendet werden kann. Die Methode hat in den letzten Jahren in der Biochemie und Zellbiologie eine große Bedeutung erlangt, da mit ihr beispielsweise Konformationsänderungen und Wechselwirkungen zwischen markierten Proteinen bzw. Nukleinsäuren dynamisch und sensitiv aufgeklärt werden können.

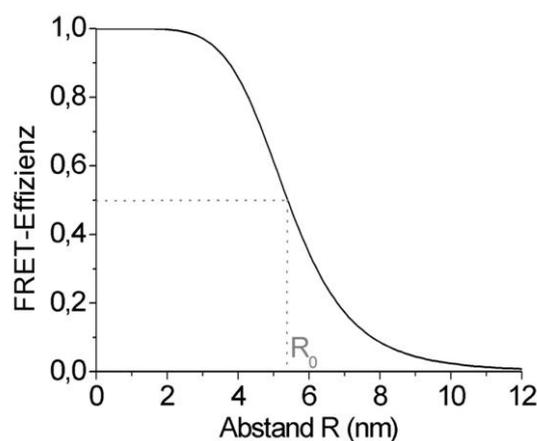


Abbildung 5: Abstandsabhängigkeit des Förster-Transfers. Der Förster-Radius R_0 (in diesem Beispiel 5,4 nm) ist derjenige Abstand zwischen dem Donor und dem Akzeptor, bei dem die FRET-Effizienz 50 % ($E_{\text{FRET}} = 0,5$) beträgt. Farbstoffdistanzen zwischen 3 und 8 nm eignen sich gut für FRET-Experimente, da in diesem Bereich schon eine kleine Abstandsänderung zu einer messbaren Veränderung des Förster-Transfers führt.

1.2.2 Ensemble-FRET

Der einfachste Weg, um einen Förster-Transfer in einem markierten Protein zu messen, ist ein Ensemble-Experiment an einem Fluorimeter. Unter Ensemble-Messungen versteht man allgemein – im Gegensatz zu Einzelmolekülmessungen – einen Ansatz, bei dem die Gesamtheit aller fluoreszierenden Moleküle in einer Küvette betrachtet wird. Bei einer solchen *steady-state*-Messung (ssFRET) erhält man als Ergebnis eine FRET-Intensität (und damit einen Farbstoffabstand R), die den Mittelwert aller Zustände in der Lösung angibt. E_{FRET} lässt sich aus Emissionsspektren mit der Gleichung (1)

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}}$$

berechnen, wobei I_D die Fluoreszenzintensität des reinen Donors ist und I_{DA} für die (niedrigere) Intensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors steht. Statische ssFRET-Experimente mit Biomolekülen sind zwar einfach und schnell durchzuführen, aber für eingehende Untersuchungen zu unflexibel, da sie keine Hinweise über unterschiedliche Konformationen bzw. FRET-Effizienzen in der Probe geben. Ein anderer Ansatz ist die Bestimmung von E_{FRET} über die Lebensdauer der Fluorophore (2):

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

τ_D und τ_{DA} sind die Fluoreszenzlebenszeiten des reinen Donors ohne bzw. mit Akzeptor. Die Lebensdauer nimmt dabei in Anwesenheit des Akzeptors in Abhängigkeit von der Farbstoffdistanz ab, da FRET auftritt. Damit stehen zwei unabhängige Wege zur Verfügung, um einen Förster-Transfer zu bestimmen. Lebensdauermessungen werden unter Verwendung eines gepulsten Lasers und eines zeitaufgelösten Detektionssystems durchgeführt, weshalb diese Methode auch als trFRET (*time-resolved FRET*) bezeichnet wird⁵⁵. Da sich die Anregung durch den Laserpuls und der anschließende Fluoreszenzzerfall im ps- bis ns-Bereich abspielen, ist davon auszugehen, dass die Konformationszustände der einzelnen markierten Proteine während dieses kurzen Zeitintervalls unverändert bleiben. Aus der gemessenen Zerfallskurve lassen sich daher mehrere Spezies mit unterschiedlicher FRET-Intensität, die sich in der Probe befinden, identifizieren und quantifizieren. trFRET gibt also im Gegensatz zu ssFRET einen Hinweis darauf, ob alle Biomoleküle im gleichen Zustand vorliegen, oder ob es sich um eine Mischung aus unterschiedlichen Konformationen des gleichen Enzyms handelt. Ensemble-Experimente erlauben allerdings keine Aussage über die zeitliche Abfolge verschiedener Zustände in einem einzelnen Proteinmolekül bzw. die Dynamik ihrer Umwandlung. Mit einem trFRET-Laseraufbau sind aber bei Verwendung von geeigneten Polarisatoren auch Anisotropiemessungen möglich, die einen Aufschluss über die (für FRET-Experimente notwendige) freie Drehbarkeit der Farbstoffe am Biomolekül geben.

1.2.3 Einzelmolekül-FRET

Fluoreszenzspektroskopie auf Einzelmolekülebene ist der dynamische Weg, um einen Förster-Transfer in markierten Biomolekülen zu messen. Bei dieser Methode ist es möglich, einzelnen Proteinen in einem bestimmten Zeitintervall direkt bei ihrer Arbeit zuzuschauen. Mit Einzelmolekül-FRET⁵⁶⁻⁶⁰ (*single molecule FRET* bzw. smFRET) lassen sich – wie in Ensemble-Experimenten – alle auftretenden Donor-Akzeptor-Abstände und somit Konformationszustände eines Enzyms in einer Probe unterscheiden. Im Gegensatz zu trFRET erlaubt eine Einzelmolekülmessung darüber hinaus die Betrachtung der zeitlichen Abfolge verschiedener Zustände eines einzelnen Proteins (oder einer markierten DNA bzw. RNA) sowie die Kinetik ihrer Umwandlung. So ist es beispielsweise möglich, die Bildung von multimeren

Komplexen, die Faltung von RNA-Strukturen oder Proteinen⁶¹ bzw. deren Konformationszyklus⁶² in Echtzeit zu verfolgen. Für eine leistungsfähige smFRET-Messung stehen hauptsächlich TIR- und konfokale Mikroskopietechniken zur Verfügung. Bei der TIR-Methode⁶³ werden viele markierte Moleküle in einem bestimmten Flächenabschnitt gleichzeitig angeregt, wobei die entstehende Fluoreszenz (getrennt nach Donor- und Akzeptorlicht) auf verschiedene Bereiche desselben CCD-Kamera-Sensors projiziert wird. Durch die separate Betrachtung in zwei Kanälen lassen sich sowohl die Intensität als auch (bei einer gepulsten Anregung) die Lebensdauer der einzelnen angeregten Moleküle verfolgen, um beide unabhängigen Methoden zur Messung von E_{FRET} zu berücksichtigen. Die Biomoleküle müssen zuvor auf eine geeignete Oberfläche gekoppelt und dadurch fixiert werden (siehe 5.4). Dies ist bei manchen Proteinen problematisch, da durch die Immobilisierung des Moleküls die physiologische Aktivität beeinträchtigt sein kann. Die Anregung der Probe erfolgt danach in einem TIR-Mikroskop, welches auf dem optischen Phänomen der Totalreflexion beruht. Bei einer solchen smFRET-Messung können einzelne Moleküle theoretisch beliebig lange betrachtet werden, allerdings tritt spätestens nach einigen Sekunden ein Bleicheffekt ein, der den Förster-Transfer beendet.

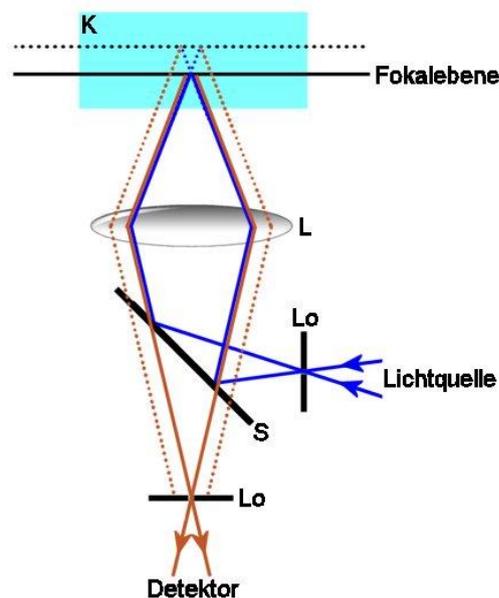


Abbildung 6: Prinzip der konfokalen Mikroskopie. Ein einfallender Lichtstrahl (blau) wird von einem dichroitischen Strahlteiler (S) reflektiert und durch eine Objektivlinse (L) in die Küvette (K) fokussiert. Nachdem er dort ein einzelnes fluoreszierendes Molekül anregt, wird das emittierte Licht durch dieselbe Linse zurückgeleitet. Die Fluoreszenz (braun) passiert den Strahlteiler und eine Lochblende (Lo) und wird vom Detektor erfasst. Die Lochblende sorgt dafür, dass nur Photonen detektiert werden, die exakt aus der Fokalebene bzw. aus dem konfokalen Volumen stammen. Der Lichtstrahl regt zwar auch Moleküle unter- bzw. oberhalb der Fokalebene an, aber die entstehende unerwünschte Fluoreszenz (braun gepunktet) wird von der Blende abgefangen, da sie nicht mittig durchtritt. Der Fokus des Anregungsstrahls nimmt eine Größe von wenigen Femtolitern ein und enthält bei einer geeigneten Probenverdünnung (im pM-Bereich) zu jedem Zeitpunkt nur ein einziges Fluorophor. Auf diese Weise ist es möglich, Informationen über den Konformationszustand eines einzelnen markierten Proteins zu gewinnen.

Einzelmolekülmessungen können alternativ auch mit einem invertierten konfokalen Mikroskop durchgeführt werden. Das Prinzip dieser Technik ist schematisch in Abb. 6 dargestellt: Der einfallende gepulste Laserstrahl wird von einem Objektiv auf einen bestimmten (annähernd ellipsoiden) Punkt – das sogenannte konfokale Volumen – in der Küvette fokussiert und die entstehende Fluoreszenz durch dieselbe Linse zurückgeleitet. Der Ausdruck „konfokale Mikroskopie“ weist darauf hin, dass sich der Anregungs- und der Detektionsfokus in demselben Punkt überlagern. Die Fluoreszenz, die aus der gewünschten Fokalebene stammt, wird anschließend durch eine Lochblende in das zeitaufgelöste Detektionssystem geleitet. Dieses besteht aus zwei getrennten *Avalanche*-Photodioden (APD) für das Donor- sowie für das Akzeptorlicht, die beide an eine Einzelphotonen-Zählkarte angeschlossen sind. Optische Information, die nicht aus dem konfokalen Volumen stammt, wird bei dieser Methode doppelt unterdrückt: Einerseits ist die Anregungsintensität in einer höheren oder niedrigeren Fokalebene deutlich geringer als im konfokalen Volumen. Andererseits wird die unerwünschte Fluoreszenz aus anderen Ebenen von der Lochblende abgefangen, da das Licht vom Objektiv nicht mittig auf diese projiziert wird. Das effektive Anregungsvolumen kann (beugungsbegrenzt) durch eine optimale Justierung des Laseraufbaus bis auf wenige Femtoliter reduziert werden, so dass sich bei einer starken Probenverdünnung (im pM-Bereich) im zeitlichen Durchschnitt höchstens ein einziges fluoreszierendes Molekül im Fokus befindet. Da die Proteine bei konfokalen smFRET-Experimenten frei in der Lösung beweglich sind, muss man im Gegensatz zur TIR-Methode nicht befürchten, dass die biochemische Aktivität der Moleküle verloren geht. Die zeitliche Beobachtung ist bei der konfokalen Mikroskopie allerdings durch die Brown'sche Molekularbewegung begrenzt: Ein einzelnes Molekül, das durch freie Diffusion in den Laserfokus eintritt, wird diesen nach einer bestimmten Zeit (im ms-Bereich) wieder verlassen. Währenddessen können sowohl die Fluoreszenzintensität in beiden Detektionskanälen als auch die Lebenszeit des Donors simultan bestimmt werden. Durch eine solche Multiparametermessung⁶⁴⁻⁶⁶ kann die Aussagekraft eines FRET-Experiments deutlich erhöht werden.

1.2.4 FRET mit Biomolekülen

Zur Untersuchung von Konformationsänderungen bzw. Wechselwirkungen in einem Protein (z. B. in der Gyrase) ist es erforderlich, einen Donor- sowie einen Akzeptorfarbstoff einzufügen. Die Fluorophore sollten für brauchbare FRET-Experimente verschiedene Eigenschaften aufweisen^{59,67}:

- Sie müssen einen hohen Extinktionskoeffizienten und (im Falle des Donors) eine hohe Quantenausbeute aufweisen.
- Der Akzeptor soll bei der Donor-Anregungswellenlänge kaum oder gar nicht angeregt werden.
- Die Farbstoffe sollten zur Vereinfachung der Detektion eine deutliche Stokes-Verschiebung aufweisen, d. h. die Differenz zwischen der Anregungs- und der Emissionswellenlänge sollte

möglichst hoch sein.

- Sie müssen ausreichend photostabil sein, d. h. die Farbstoffe dürfen bei der Laseranregung nicht zu schnell bleichen.
- Das Donor-Emissionsspektrum muss sich möglichst breit mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, damit der Förster-Radius R_0 einen hohen Wert annimmt.
- Die Farbstoffe müssen einfach und flexibel an den gewünschten Stellen in das Biomolekül einbaubar sein.
- Sie sollten im Vergleich zum Biomolekül klein sein, um dessen Bewegung bzw. Aktivität nicht nennenswert zu beeinträchtigen.

Es ist naheliegend, dass kein Farbstoff alle gewünschten Eigenschaften optimal in sich vereinen kann. Das intrinsische Proteinfluorophor Tryptophan steht prinzipiell als Donor bei $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ in Ensemble-Messungen zur Verfügung; es ist jedoch wegen seiner geringen Sensitivität nicht für Einzelmolekül-Experimente geeignet. Die Einführung von fluoreszierenden Proteinsequenzen wie GFP, YFP oder CFP (Grün/Gelb/Cyan fluoreszierendes Protein) ist für die vorliegende Problemstellung ebenfalls keine gute Lösung. Um diese Farbstoffe zu verwenden, müsste man ihre Gensequenz an den gewünschten Stellen gemeinsam mit dem Untersuchungsobjekt in einen Vektor klonieren, was ein erheblicher Aufwand ist, wenn viele Positionen im Biomolekül untersucht werden sollen. Außerdem ist zu befürchten, dass die Struktur und damit die Aktivität des Proteins stark beeinträchtigt ist, wenn sich mitten in seiner Primärstruktur eine Fremdsequenz aus über 200 Aminosäuren befindet. GFP und seine Derivate kommen für FRET-Experimente daher bestenfalls in Frage, wenn man sie als abgetrennte Domäne am N- oder C-terminalen Ende des untersuchten Biomoleküls anfügen würde.

Ein weitaus flexiblerer und vielversprechenderer Ansatz ist die Verwendung von kleinen (extrinsischen) Fluorophormolekülen, die kovalent an den gewünschten Stellen im Protein angebracht werden. Sie werden über eine reaktive Maleimidgruppe spezifisch an die Thiolgruppe von Cysteinen gekoppelt⁵⁹ und weisen eine Masse von nur ca. 1 kDa auf, was im Vergleich zur Gyrase vernachlässigbar ist. Um Farbstoffe ortsspezifisch in das Biomolekül einzufügen, muss eine Aminosäure an einer interessanten Position durch eine Punktmutation durch Cystein ersetzt werden. Native Cysteine an anderen Stellen müssen zuvor unter Beibehaltung der Aktivität durch geeignete Aminosäuren ausgetauscht werden, damit sie nicht ebenfalls mit den Fluorophoren reagieren können. Diese Voraussetzung ist bei vielen Proteinen ohne großen Aufwand erfüllbar, da in der Regel nur wenige Cysteine in der Primärsequenz vorkommen. Die Gyrase aus *B. subtilis* ist besonders gut für FRET-Messungen geeignet, da sie sogar nur ein Cystein in GyrA (C350) und zwei in GyrB (C58/C414) enthält, die zudem keine essentiellen Strukturen wie z. B. Disulfidbrücken oder Zinkfinger motive ausbilden. Die Struktur der homologen Gyrase aus *E. coli* besitzt dagegen insgesamt neun native Cysteine. Als Donor- bzw. Akzeptorfarbstoffe eignen sich u. a.

Tetramethylrhodamin (TMR) und mehrere Vertreter der Alexa-Reihe (Tab. 1 bzw. Abb. 8 in 2.6), da sie einen hohen Extinktionskoeffizienten aufweisen und ihre Quantenausbeute und Photostabilität günstig sind. Da sowohl die künstliche Einfügung von Cysteinen als auch die kovalente Kopplung mit Farbstoffen theoretisch die physiologische Aktivität der Gyrase beeinträchtigen können, muss durch Aktivitätstests sichergestellt werden, dass sich das markierte Protein noch genauso verhält wie der Wildtyp. Alexa-Moleküle besitzen zwischen der reaktiven und der farbgebenden Gruppe außerdem einen C_6 -Linker, so dass die Fluorophore frei an der Kopplungsstelle rotieren können, was für aussagekräftige FRET-Messungen von hoher Bedeutung ist. Die Verwendung von kleinen extrinsischen Farbstoffen ist sehr flexibel, da für ihre Einführung nur eine Punktmutation im Biomolekül notwendig ist. Dies ist vergleichsweise schnell durchführbar und beeinträchtigt in der Regel nicht die biologische Aktivität des Proteins. Außerdem kann mit TMR bzw. mit den Alexa-Molekülen ein breiter Abstandsbereich in FRET-Experimenten dynamisch untersucht werden, indem man dasselbe Cystein mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Falls sich z. B. in einer Messung mit Alexa488 und TMR ($R_0 = 5,4$ nm) herausstellt, dass der Abstand der Fluorophore im Protein zu hoch und daher die FRET-Effizienz zu gering ist, besteht die Möglichkeit, einfach einen besser geeigneten Akzeptor für die Markierung zu verwenden, um den Förster-Radius heraufzusetzen. Ein Nachteil dieser Markierungsmethode ist, dass sie nicht nur gemischtmarkiertes Protein (Protein-Donor-Akzeptor), sondern auch Protein-Donor-Donor und Protein-Akzeptor-Akzeptor erzeugt. Diese unerwünschten Objekte können jedoch in Einzelmolekül-FRET-Experimenten von den interessanten Spezies unterschieden werden, so dass ihr Auftreten die Messung nicht beeinträchtigt.

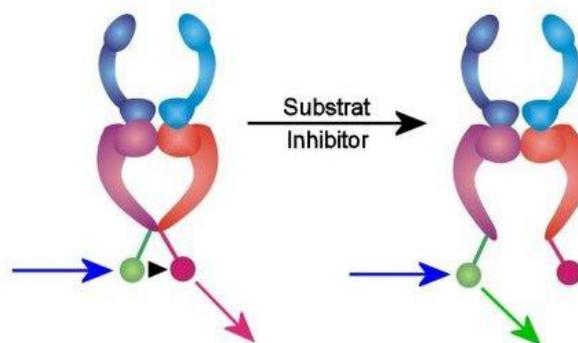


Abbildung 7: Prinzip einer FRET-Messung an einem Biomolekül. Das Schema zeigt ein tetrameres Gyrase-molekül, das an den beiden Enden des C-Tores mit einem Donor- (grün) und einem Akzeptorfarbstoff (rot) gekoppelt ist. Das C-Tor ist zuerst in einem geschlossenen Zustand, so dass der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren gering ist. Nach einer Anregung des Donors mit $\lambda_{ex} = 475$ nm (blauer Pfeil) wird die Energie durch FRET (schwarzes Dreieck) zum Akzeptor übertragen, so dass das Detektionssystem dessen Fluoreszenz (roter Pfeil) erfasst. Es besteht die Möglichkeit, dass nach der Zugabe von Substrat (oder Inhibitor) eine Konformationsänderung einsetzt, durch die das C-Tor zumindest zeitweilig geöffnet wird. Da der Farbstoffabstand nun größer ist, nimmt E_{FRET} ab, so dass nach einer Anregung des Donors hauptsächlich dessen Fluoreszenz (grüner Pfeil) detektiert wird.

Abb. 7 stellt das Prinzip einer Einzelmolekül-FRET-Messung am Beispiel der Gyrase dar. Markiert man z. B. das C-Tor an beiden Enden mit einem extrinsischen Donor- bzw. Akzeptormolekül, so wird nach einer Donoranregung eine hohe FRET-Effizienz (d. h. eine deutliche Akzeptorfluoreszenz) detektiert, wenn das Tor geschlossen und der Abstand der beiden Farbstoffe gering ist. Unter der Annahme, dass die Zugabe eines Substrates (oder eines Inhibitors) zu einer Öffnung des Tores führt, lässt sich eine Verringerung von E_{FRET} nachweisen. Der Abstand der Fluorophore ist nun deutlich größer, so dass das FRET-Detektionssystem eine Zunahme der Donor- bzw. eine Abnahme der Akzeptorfluoreszenz misst. Da die beschriebene Messung in Echtzeit abläuft, kann die auftretende Konformationsdynamik im Enzym direkt beobachtet werden, sofern sich das Biomolekül zum Zeitpunkt der Änderung im konfokalen Volumen aufhält.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat primär zwei unterschiedliche Ziele. Einerseits soll der Funktionszyklus der Gyrase aus dem gram-positiven Organismus *Bacillus subtilis* detailliert auf biophysikalischem Wege aufgeklärt werden. Mit geeigneten Methoden soll die Oligomerisierung der Untereinheiten zum funktionalen Tetramer, die Aktivität und die Bindung des Enzyms an natürliche und künstliche Substrate untersucht werden. Die Messung von Reaktions- und Dissoziationskonstanten für alle Bindungspartner sowie Kinetiken für einzelne Schritte des Nukleotidzyklus sollen ein Bild der Arbeitsweise des Enzyms vermitteln. Ein Zusammenhang zwischen der Energiegewinnung durch die ATP-Hydrolyse und der biochemischen Aktivität der Gyrase wird durch die Betrachtung, welchen Einfluss die DNA auf die Bindung und Spaltung von Nukleotiden hat, hergestellt. Die Ergebnisse sollen mit denjenigen aus der Literatur für homologe Topoisomerasen aus anderen Organismen verglichen werden. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob sich alle Gyrasen gleichartig verhalten oder ob funktionelle Unterschiede zwischen dem *Bacillus*-Enzym und dem bereits gut untersuchten Vertreter aus dem gram-negativen Bakterium *E. coli* existieren.

Die zweite große Zielsetzung dieser Arbeit ist ein Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Gyrase durch konfokale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie. Das Enzym soll dafür an geeigneten Stellen über eingeführte reaktive Cysteine mit Donor- und Akzeptorfarbstoffen markiert werden, um nach einer Anregung des Donors einen auftretenden Förster-Transfer zu messen. Es sollen ausschließlich solche Mutanten verwendet werden, die die gleiche Aktivität wie der Wildtyp der Gyrase aufweisen, um die Daten sinnvoll interpretieren zu können. Die Durchführung von derartigen Einzelmolekül-FRET-Experimenten muss zunächst durch eine Reihe von Vorversuchen etabliert werden, da das Lasersystem erst im Laufe der vorliegenden Arbeit aufgebaut wird. Die ermittelten Farbstoffabstände sollen mit den theoretischen Werten aus einem Homologiemodell verglichen werden, um die Verlässlichkeit der

Messungen zu beurteilen. Nach der Zugabe von geeigneten Liganden oder Inhibitoren soll untersucht werden, ob eine Konformationsdynamik im Enzym eintritt, die sich in einer Änderung der FRET-Effizienz bemerkbar macht. Dies soll sowohl global durch Histogramme als auch durch eine Betrachtung des Verhaltens von einzelnen Molekülen geschehen. Die Gyrase wird systematisch an allen Bereichen, bei denen eine Dynamik während des Funktionszyklus erwartet wird, durch Einzelmolekül-FRET-Experimente untersucht. Insbesondere gilt dies für das C-Tor, das N-Tor und das DNA-Tor am aktiven Zentrum des Proteins, aber auch für die noch wenig erforschte C-terminale Domäne der Untereinheit GyrA. Die Bestimmung von Förster-Abständen, Korrekturparametern und weiteren Faktoren durch zeitaufgelöste Lasermessungen für jede verwendete Mutante sollen die Einzelmolekül-daten verifizieren und abrunden. Schließlich sollen die Ergebnisse aus den biochemischen und aus den Lasermessungen miteinander verglichen und diskutiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

| | |
|---|-------------------------------|
| MnCl ₂ , Glycerin | AppliChem, Darmstadt, D |
| Acetonitril | Biosolve, Valkenswaard, NL |
| Streptomycinsulfat, | |
| Ampicillin Natriumsalz | Gerbu, Gaiberg, D |
| ATP γ S, mantADP | Jena Bioscience, Jena, D |
| KCl, Ethanol p. A., Isopropanol p. A., | |
| Aceton, Methanol, Essigsäure 100 %, HCl 37 %, HClO ₄ , NaOH | Merck, Darmstadt, D |
| Protein-/DNA-Marker bzw. -Probenpuffer, | |
| Rinderserumalbumin (BSA) | NEB, Frankfurt/Main, D |
| ADP Dinatriumsalz, ATP Dinatriumsalz, | |
| AMPPNP Tetralithiumsalsz | Pharma Waldhof, Düsseldorf, D |
| Isopropanol techn. | Reuss-Chemie, Tägerig, CH |
| NADH Natriumsalz, | |
| Phosphoenolpyruvat (PEP), | |
| Proteaseinhibitortabletten EDTA-frei | Roche, Basel, CH |
| MgSO ₄ , MgCl ₂ , KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , | |
| CaCl ₂ , NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , Na ₂ SO ₄ , | |
| ZnSO ₄ , NaCl, NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , | |
| H ₃ BO ₃ , NiSO ₄ , Lactose-Monohydrat, | |
| α -D-(+)-Glucose-Monohydrat, | |
| Hefeextrakt, Pepton aus Casein, | |
| Ammoniumsulfat, Agarose, GdmCl, | |
| L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat, | |
| EDTA Dinatriumsalz, DTT, Imidazol, | |
| SDS ultrapur, Tris Ultraqualität, | |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS), | |
| Bromphenolblau, EtBr, TEMED, | |
| Coomassie Brilliant Blau R 250, | |
| Kanamycinsulfat, Chloramphenicol, | |
| IPTG, β -Mercaptoethanol, Agar-Agar, | |
| Rotiphorese Gel 40 (37,5 : 1) | Roth, Karlsruhe, D |

MgSO₄, Na₂MoO₄, CoCl₂, CuCl₂,

FeCl₃, Na₂SeO₃, Ethanol techn.,

Polyethylenimin (PEI) hochmolekular,

Triton X-100, dNTPs, Hefe-tRNA,

Dimethylsulfoxid (DMSO), Spermidin,

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol,

Chloroquin Diphosphatsalz,

Antischaummittel, Novobiocin,

Nalidixinsäure, Oxolinsäure,

Ciprofloxacin, Sparfloxacin

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Ethylenglykol

VWR, Darmstadt, D

2.2 Enzyme

EcoRI, NdeI, DpnI

NEB, Frankfurt/Main, D

Taq-Polymerase

Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D

Pfu-Polymerase

Promega, Madison, USA

Pyruvatkinase (PK) und

Laktatdehydrogenase (LDH)

aus Kaninchenmuskel, Proteinase K

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

2.3 Bakterienstämme und Plasmide

Genotyp des Klonierstammes *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg, D):

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB lacI^fZ M15 Tn10* (Tet^r)]

Genotyp des Expressionsstammes *Escherichia coli* BL21 (DE3) RP (Stratagene, Heidelberg, D):

B F- *ompT hsdS* (r_B.m_B.) *dcm*+ Tet^r *gal endA Hte* [*argU proL Cm^r*]

Der Expressionsstamm verfügt über eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol.

Die Sequenzen von GyrA (2463 bp) bzw. GyrB (1917 bp) wurden mittels NdeI und EcoRI in pET27b (5414 bp) eingefügt. Beide Sequenzen lagen bereits zu Beginn dieser Arbeit in dem genannten Vektor vor. Das verwendete Plasmid pET27b stammt von Novagen (Madison, USA) und enthält ein Gen für Kanamycinresistenz. Die klonierte Sequenz wird von einem T7-Promotor kontrolliert und durch die Wahl der oben genannten Restriktionsstellen nativ, d. h. ohne N-terminalen His-Tag exprimiert.

Das Substratplasmid pUC18 (Fermentas, St. Leon-Rot, D) besteht aus 2686 Basenpaaren und wird in *E. coli* XL1-Blue in hoher Kopienzahl hergestellt. Die Sequenz enthält ein Gen für das Enzym β -Lactamase, so dass die Zellen gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent sind.

2.4 Medien

Luria-Bertani-Medium (LB):

10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1000 ml mit H₂O bidest. auffüllen; pH 7,0 (autoklaviert)

modifiziertes Autoinduktionsmedium ZYM-5052 (AIM⁶⁸):

10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; auf 1000 ml mit H₂O bidest. auffüllen; pH 7,0 (autoklaviert)

+ 25 ml 40 x „M“ (autoklaviert)

1,25 M K₂HPO₄; 1,25 M NaH₂PO₄; 2,5 M NH₄Cl; 0,25 M Na₂SO₄

+ 20 ml 50 x „5052“ (sterilfiltriert)

25 % Glycerin (v/v); 2,5 % Glucose (w/v); 10 % α -Lactose (w/v)

+ 1 ml 1000 x Mg²⁺ (sterilfiltriert)

2 M MgSO₄

+ 200 μ l 5000 x Spurenelemente (sterilfiltriert)

50 mM FeCl₃; 20 mM CaCl₂; 10 mM MnCl₂; 10 mM ZnSO₄; 2 mM CoCl₂;

2 mM CuCl₂; 2 mM NiSO₄; 2 mM Na₂MoO₄; 2 mM Na₂SeO₃; 2 mM H₃BO₃

2.5 Puffer und Lösungen

Aufschlusspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM β -Mercaptoethanol

Proteinpuffer/Dialysepuffer/Heparin-A (Beladungspuffer)/S200-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM β -Mercaptoethanol

Heparin-B (Elutionspuffer):

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM β -Mercaptoethanol

Markierungspuffer/AUZ-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 10 mM MgCl₂

Zur Entfernung von fluoreszierenden Verunreinigungen wird der Puffer speziell für FRET-Messungen ÜN mit Aktivkohle gerührt und danach sterilfiltriert (FRET-Puffer).

10 x Stopplösung für Aktivitätstest:

10 % SDS; 0,5 M EDTA pH 8,0

ssATPase-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM EDTA; 2 mM β-Mercaptoethanol; 0,4 mM Phosphoenolpyruvat (PEP); 0,2 mM NADH

modifizierter ssATPase-Puffer²⁰:

35 mM Tris/HCl pH 7,5; 24 mM KCl; 6 mM MgCl₂; 1,8 mM Spermidin; 9 µg/ml Hefe-tRNA; 0,36 mg/ml BSA; 6,5 % (w/v) Glycerin; 5 mM DTT; 10 mM KH₂PO₄; 0,4 mM Phosphoenolpyruvat (PEP); 0,2 mM NADH

Coomassie-Färbelösung:

50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Brilliantblau R-250

Coomassie-Entfärbelösung:

20 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure

0,5 x TBE:

44,5 mM Tris; 44,5 mM Borsäure (H₃BO₃); 5,4 mM EDTA

2D-Puffer:

44,5 mM Tris; 44,5 mM Borsäure (H₃BO₃); 5,4 mM EDTA, 10 mg/l Chloroquin

DNA-Probenpuffer:

50 % (v/v) Glycerin; 5 % (w/v) SDS; 50 mM EDTA; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

SDS-Trenngel (10 %):

375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 600 µl APS; 10 % (v/v) Acrylamid; 0,27 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 40 µl TEMED

SDS-Sammelgel (4,5 %):

125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,06 % (w/v) SDS; 400 µl APS; 4,5 % (v/v) Acrylamid; 0,1 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 40 µl TEMED; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

4 x SDS-Probenpuffer:

130 mM Tris/HCl pH 6,8; 200 mM DTT; 40 mM EDTA; 20 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Weitere verwendete Puffer werden in den entsprechenden Kapiteln im Methodenteil aufgeführt.

2.6 Fluoreszenzfarbstoffe

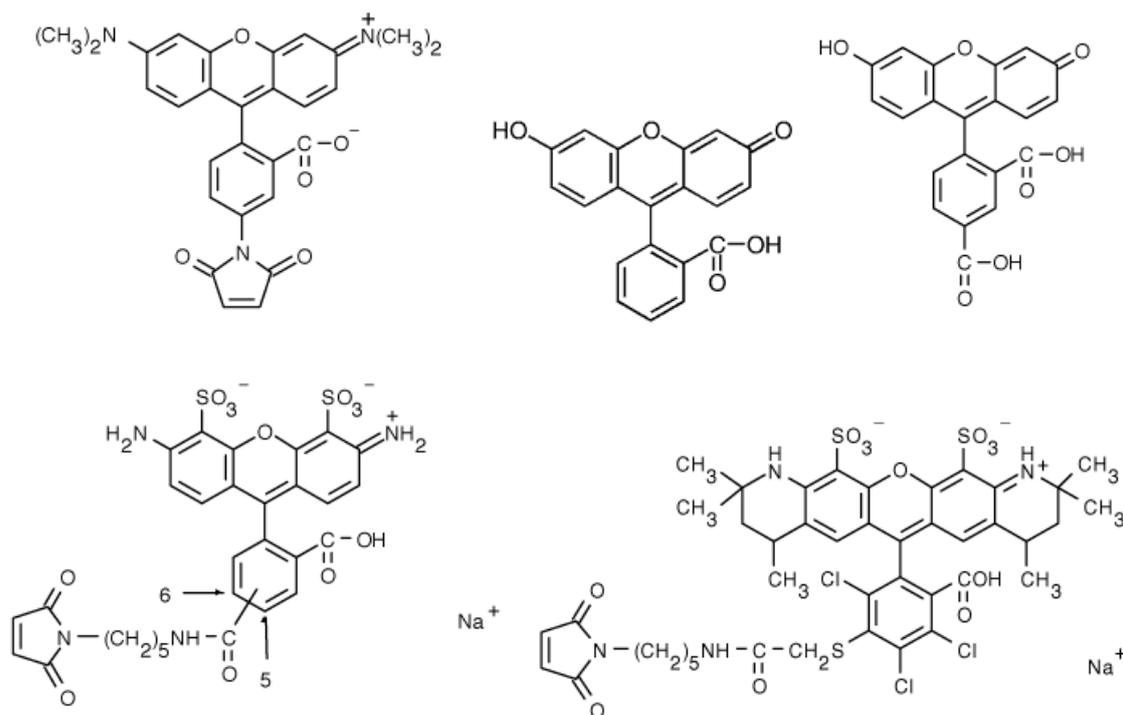


Abbildung 8: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe. TMR (oben links), Alexa488 (unten links) und Alexa546 (unten rechts) besitzen eine reaktive Maleimidgruppe, um spezifisch an die SH-Gruppe von Cysteinen zu binden. Bei den Alexa-Fluorophoren ist außerdem der C₆-Linker sichtbar, der für eine freie Rotation des Farbstoffs an der Kopplungsstelle sorgt. Uranin (oben Mitte) wird als Referenzsubstanz eingesetzt, während FAM (Carboxyfluorescein; oben rechts) an dsDNA-Substrate gekoppelt wurde. Quelle: Molecular Probes

Proteine wurden über Cysteinreste kovalent mit dem Donor Alexa488⁶⁹ (Alexa Fluor® 488 C₅-Maleimid) bzw. mit den Akzeptoren Alexa546 (Alexa Fluor® 546 C₅-Maleimid), Alexa555 (Alexa Fluor® 555 C₂-Maleimid) oder TMR (Tetramethylrhodamin-5-Maleimid) verknüpft. Diese Farbstoffe, die jeweils einen reaktiven Maleimidring zur Kopplung an SH-Gruppen enthalten, wurden von Molecular Probes^{70,71} (Karlsruhe, D) geliefert. Oligonukleotide wurden dagegen direkt vom Hersteller am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5-FAM (5-Carboxyfluorescein) bzw. intern mit Alexa488 oder Alexa555 markiert. Die Kopplung erfolgte in diesem Fall über reaktive Succinimidylestergruppen an entsprechende Aminoheptylnukleotide. Zur Bestimmung von Quantenausbeuten und Förster-Abständen und für FCS

wurde Uranin (Na⁺-Fluorescein) von Radiant Dyes Chemie (Wermelskirchen, D) als Referenzsubstanz eingesetzt. Abb. 8 zeigt die Struktur aller eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe mit Ausnahme von Alexa555. Ein Überblick der wichtigsten Eigenschaften der Fluorophore findet sich in Tab. 1.

| Name des Farbstoffs | Funktion | ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹] | bei λ | Emissionsmaximum | Molekulargewicht |
|---------------------|-------------|--|---------------|------------------|------------------|
| Alexa488 | Donor | 71000 | 494 nm | 516 nm | 721 Da |
| Alexa546 | Akzeptor | 93000 | 554 nm | 570 nm | 1034 Da |
| Alexa555 | Akzeptor | 158000 | 556 nm | 572 nm | ca. 1250 Da |
| TMR | Akzeptor | 95000 | 555 nm | 567 nm | 482 Da |
| Uranin | Referenz | 93000 | 490 nm | 514 nm | 332 Da |
| FAM | Signalgeber | 79000 | 492 nm | 518 nm | 376 Da |

Tabelle 1: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe. Quelle: Molecular Probes

2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von MWG (Ebersberg, D), Purimex (Greibenstein, D) oder Microsynth (Balgach, CH) bezogen. Alle Sequenzierungen wurden von Microsynth durchgeführt. Im Anhang (7.4) sind die vollständigen Sequenzen der beiden Untereinheiten der Gyrase sowie die Position der verwendeten Primer angegeben.

- Klonierprimer: Der Primer GyrB E2C 5' wird zusammen mit GyrB 3' für die Mutagenese GyrB E2C verwendet; das mutierte Basentriplett ist fettgedruckt.

GyrA 5' : GCG AAT TCC ATA TGA GTG AAC AAA ACA CAC
 GyrA 3' : GCG CTC GAG TCA CAC TTC TTC TTG TTC TTC TTC

GyrB 5' : GGG AAT TCC ATA TGG AAC AGC AGC AAA ACA G
 GyrB 3' : GGG GAA TTC TTA GAT GTC AAG ATT TTT AAC G
 GyrB E2C 5' : GGG AAT TCC ATA **TGT** GTC AGC AGC AAA ACA G

- Mutageneseprimer: Es sind nur die 5'-Stränge angegeben; das mutierte Basentriplett ist fettgedruckt.

GyrA S117C: GGT TCT GTT GAC GGA GAC **TGC** GCG GCG GCC ATG C
 GyrA Y123F: GCG GCG GCC ATG CGT **TTT** ACA GAA GCA CGA ATG
 GyrA T140C: GGA GAT TCT TCG CGA CAT **CTG** CAA AGA CAC AAT CGA TTA CCA GG
 GyrA G152C: CCA GGA TAA CTA TGA **CTG** CTC AGA AAG AGA ACC TGT CG
 GyrA S153C: CCA GGA TAA CTA TGA CGG **GTC** CGA AAG AGA ACC TGT CG
 GyrA C350L: CGA AAG TTT TAA CTC TTA AGC AAC **TGC** TGG AGC ATT ACC
 GyrA S395C: CAT CTC GAT GCA GTT ATC **TGT** CTT ATC CGT AAT TCT CAA ACG GC
 GyrA N399C: GCA GTT ATC TCC CTT ATC CGT **TGT** TCT CAA ACG GCT GAA ATT GCG

GyrA T408C: CGG CTG AAA TTG CGA **GAT GTG** GTT TAA TTG AAC AAT TCT C
 GyrA Q413C: GCG AGA ACA GGT TTA ATT GAA **TGT** TTC TCA CTG ACA GAG AAG C
 GyrA Q445C: GAA CGT GAA AAG ATC GAA GAA GAA TAC **TGT** TCT CTT GTT AAA TTA ATT GC
 GyrA K449C: CGA AGA AGA ATA CCA GTC TCT **TGT** TTG TTT AAT TGC AGA GCT AAA AGA C
 GyrA K594C: GCT GGA GGT AGA **ATG TGG** TGA GTG GAT CAA CG
 GyrA E726C: CGA ACT CCT GCT **TGT** GAG TAC AGA ACC
 GyrA E797C: CTC ATC AGA ATG GCA GAA **TGT** GAG CAT GTT GCT ACA G

GyrB S7C: GGA ACA GCA GCA AAA **CTG CTA** TGA TGA AAA TCA GAT ACA GG
 GyrB Q14C: CAG TTA TGA TGA AAA TCA GAT ATG **TGT** ACT AGA AGG ATT GGA AGC
 GyrB E17C: CAG ATA CAG GTA CTA **TGC** GGA TTG GAA GCT GTT CGT AAA AGA CC
 GyrB E44Q: CTT GGT ATG **GCA AAT** TGT CGA CAA TAG
 GyrB C58S: GCC CTC GCC GGT TAT **TCT** ACG GAT ATC AAT ATC C
 GyrB C58L: GCC CTC GCC GGT TAT **CTG** ACG GAT ATC AAT ATC C
 GyrB C58D: GCC CTC GCC GGT TAT **GAT** ACG GAT ATC AAT ATC C
 GyrB I84C: CCG CGG TAT TCC AGT CGG **TG TCA** TGA AAA AAT GGG CCG
 GyrB R90C: GGT ATT CAT GAA AAA ATG GGC **TGT** CCT GCG GTA GAA GTC
 GyrB E131C: GGC CGT AAA CGC ACT ATC AAC **ATG TCT** TGA TGT GAC GGT TCA CC
 GyrB P175C: CGA CAC ATT TTG TCC CGG **ACT GTG** AAA TTT TCT CAG AAA CAA CC
 GyrB C414S: CCG TAA GTT AGC GGA **CTC CTC** TTC AAA AGA TCC GAG C
 GyrB C414A: GGT AAG TTA GCG GAC **GCC** TCT TCA AAA GAT CCG
 GyrB C414D: CCG TAA GTT AGC GGA **GCA CTC** TTC AAA AGA TCC GAG C
 GyrB C414L: CCG TAA GTT AGC GGA **CTT GTC** TTC AAA AGA TCC GAG C

- Sequenzierprimer: Neben den angegebenen Primern werden für die vollständige Sequenzierung von GyrA und von GyrB der T7-Promotor (5') sowie der T7-Terminator (3') verwendet.

GyrA MidA 5': GGT GTA CTT GCT GTT AGT GAG AAT CC
 GyrA MidB 5': CAA ACG GCT GAA ATT GCG AGA ACA GG
 GyrB MidA 5': GGC GTA AAC ATC ACG ATT GAA GAT AAA CG

- Primer, die ausschließlich für PCR-Screens verwendet werden:

GyrA 710 3': CCT GAT TCG TAT GCT TTC CGG
 GyrB 246 3': GAC TGG AAT ACC GCG G
 GyrB 1174 5': GCG CGT GAA CTA ACA CG
 GyrB 1396 3': GGA TTT TAT CCA GTC TGG

- pUC18-Primer:

pUC18 Gyr 5': GCC AAG CTT TGC ATG ATC ATA CGT CGA CTC TAG AGG ATC C
 pUC18 Gyr 3': GGA TCC TCT AGA GTC GAC GTA TGA TCA TGC AAA GCT TGG C
 pUC18 94-bp 5': **CCC** AGT CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGG
 pUC18 94-bp 3': CGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGG

Die ersten beiden Primer dienen zur Einfügung einer Gyrase-spezifischen Bindungsstelle⁴⁷ in die Sequenz von pUC18. Mit den letzten beiden Primern wird aus der pUC18-Sequenz ein 94-bp-Segment amplifiziert, das die spezifische Bindungsstelle enthält und folgende 5'-Sequenz hat:

**CCCAGTCACG AC GTTGTAAA ACGACGGCCA GTGCCAAGCT TTGCATGATC ATACGTCGAC TCTAGAGGAT
 CCCC GGGTAC CGAGCTCGAA TTCG**

Dieses Substrat wird entweder unmarkiert für GEMSA oder markiert für Anisotropiemessungen eingesetzt. In diesem Fall ist der Primer am 5'-Ende (fettgedrucktes Cytosin C) kovalent mit 5-FAM (5-Carboxyfluorescein) verknüpft.

- Substrat-DNA: Für den modifizierten ssATPase-Test werden die 60-bp-Stränge (mit einer spezifischen Gyrase-Bindungsstelle⁴⁷) in unmarkierter Form verwendet, während für ssFRET-Messungen die beiden fettgedruckten Thymin (T) kovalent an Fluorophore gekoppelt sind. Der 5'-Strang ist dabei mit Alexa488 verknüpft und der 3'-Strang mit Alexa555, wobei die beiden Farbstoffe nach der dsDNA-Bildung auf der gleichen Seite der Konsensussequenz im Abstand von acht Basenpaaren platziert sind:

```
60-bp-dsDNA 5' : GACGGCCAGT GCCAAGCTTT GCATGATCAT ACGTCGACTC TAGAGGATCC CCGGGTACCG
60-bp-dsDNA 3' : CGGTACCCGG GGATCCTCTA GAGTCGACGT ATGATCATGC AAAGCTTGGC ACTGGCCGTC
```

2.8 Geräte

| | |
|---|---------------------------------------|
| Waage AND 300-i | A&D Instruments Ltd., Abingdon, GB |
| CCD-Spektrometer | APE, Berlin, D |
| <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur | Applied Photophysics, Surrey, GB |
| Synchronisationsdiode PHD-400-N, | |
| Photonenzählkarte SPC-630 | Becker + Hickl, Berlin, D |
| Allegra 21R Tischzentrifuge, | |
| Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| C ₁₈ -Chromatographiesäule | Bischoff Chromatography, Leonberg, D |
| Ultraschallstab Sonifier 250 | Branson, Danbury, USA |
| Spectramax M2 Mikrotiterspektrometer | Bucher Biotec AG, Basel, CH |
| Biophotometer, | |
| Vakuumkonzentrator 5301, | |
| PCR-Gerät Mastercycler Gradient, | |
| Heizblock Thermostat Plus, | |
| Pipetten "Research", | |
| Kühlzentrifuge 5402 | Eppendorf, Hamburg, D |
| Elektrotrafogerät Easyject Prima | Equibio/Peqlab, Erlangen, D |
| Illuminator FT-20/254/365 | Fisherbrand/Herolab GmbH, Wiesloch, D |
| Spannungsquelle HCN 14-3500 für trFRET | FuG Elektronik, Rosenheim, D |
| ÄKTA <i>prime</i> mit Zubehör, | |
| ÄKTA <i>purifier</i> mit Zubehör, | |

| | |
|---|--|
| Chromatographiesäulen (außer C ₁₈ -Säule), | |
| NAP-5-Säulen, P1-Pumpe, | |
| Spannungsquelle EPS 301 für Elektrophorese, | |
| Elektrophoreseapparatur Hoefer SE 250, | |
| UV/VIS-Photometer Ultrospec 2100 pro | GE Healthcare, Freiburg, D |
| Präzisionspritze | Hamilton, Bonaduz, CH |
| pH-Messgerät HI 8314 | Hanna Instruments, Kehl, D |
| Quarz-Präzisionsküvetten | Hellma, Mühlheim, D |
| Biofuge pico | Heraeus, Hanau, D |
| Fluorimeter FluoroMax-3, | |
| Photonendetektor für trFRET-Aufbau | Horiba Jobin Yvon, München, D |
| Wasserbad polystat cc-1 | Huber, Offenburg, D |
| Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge | Kendro AG, Zürich, CH |
| Waage EMB 1200-1 | Kern, Balingen, D |
| Geldokuanlage EDAS 290 | Kodak, Stuttgart, D |
| Oszilloskop waverunner 6100A | LeCroy, Genf, CH |
| DNA-Elektrophoreseapparatur | Mechanische Werkstatt Uni Bayreuth, D |
| pH-Indikatorstäbchen | Merck, Darmstadt, D |
| Analysenwaage AE 240 | Mettler Toledo, Gießen, D |
| <i>Microfluidizer</i> | Microfluidics, Newton, USA |
| Membranfilter 0,22 µm bzw. 0,025 µm | Millipore, Billerica, USA |
| Optischer Aufbau, | |
| Strommessgerät 841-PE für Laseraufbau, | |
| Lasertisch schwingungsgedämpft RS 2000 | Newport, Irvine, USA |
| smFRET-Küvetten Lab-Tek, | |
| Mikrotiterplatte mit 384 Feldern | Nunc, Rochester, USA |
| Konfokales Mikroskop IX71 | Olympus, Hamburg, D |
| Motor für trFRET-Polarisator | Owis GmbH, Staufen, D |
| QIAquick Gelextraktionskit, | |
| QIAquick PCR-Reinigungskit, | |
| Plasmidpräparationskit | Qiagen, Hilden, D |
| Photodiode APD | Perkin Elmer Optoelectronics, Wiesbaden, D |
| PureYield Plasmid Midiprep System | Promega, Madison, USA |
| Kamera für smFRET-Aufbau | Santec/Baxall, Stockport, GB |
| Plastikküvetten | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Konzentratorröhrchen Vivaspin 6 bzw. 500 | Sartorius, Göttingen, D |

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Pumplaser Millenia Pro mit Zubehör, | |
| Laser Tsunami mit Zubehör, | |
| Pulspicker 3980 mit Zubehör, | |
| Verdoppler/Verdreifacher GWU, | |
| Autokorrelator PulseScout, | |
| Strommessgerät 407A für Laseraufbau | Spectra Physics, Mountain View, USA |
| Dialysemembran Spectra/Por | Spectrumlabs.com, Breda, NL |
| Fluorimeter Cary Eclipse | Varian, Darmstadt, D |

2.9 Datenauswertung

Die Auswertung der Daten und die Erstellung der Graphen erfolgte mit dem Programm *Origin 7.5* (OriginLab, Northampton, USA). Zur Analyse von Fluoreszenz- und Anisotropietitrationen mit komplexen Bindungsmodellen wurde das Programm *Scientist 3.0* von Micromath (St. Louis, USA) verwendet.

Die Visualisierung von PDB-Strukturen erfolgte mit *PyMOL* (DeLano, Palo Alto, USA). Da die dreidimensionale Struktur der Gyrase aus dem Organismus *Bacillus subtilis* noch nicht durch das Verfahren der Röntgenkristallographie bestimmt ist, wurde mit Hilfe von *Swiss-Model* (Basel, CH) ein Homologiemodell anhand bekannter 3D-Strukturen erstellt. Als Referenz wird die Struktur des entsprechenden Enzyms aus *E. coli* verwendet, die mit den PDB-Bezeichnungen „1AB4“ (GyrA ohne CTD)⁷, „1ZI0“ (GyrA CTD)⁸ bzw. „1AJ6“ (N-terminaler Teil von GyrB)⁶ eingetragen ist.

Zeitaufgelöste sowie Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden mit Programmen von Airat Gubaev (Universität Basel) auf dem System *LabVIEW 8.2* (National Instruments, Austin, USA) ausgewertet. Die dafür notwendigen Algorithmen wurden von Florian Spreitler (Universität Bayreuth), von Airat Gubaev und von mir (Auffindung von interessanten *Bursts* mit Niveausprüngen) entwickelt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 PCR-Mutagenese

Ortsgerichtete Mutationen in DNA-Sequenzen werden mit dem *QuikChange*TM-Kit von Stratagene (Heidelberg, D) nach Angaben des Herstellers eingeführt. Bei diesem Verfahren wird das komplette Plasmid gemeinsam mit dem Insert (insgesamt ca. 7300 – 7800 bp) verdoppelt. Der einfache Reaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

5 µl 10 x Pfu-Puffer

50 ng Ausgangs-DNA

je 0,1 µl Primer #1 (5') und #2 (3') – entspricht jeweils 0,2 µM

1 µl dNTP-Gemisch – entspricht jeweils 50 µM pro Nukleotid

auf 50 µl mit H₂O auffüllen

Die beiden Primer haben eine Länge von jeweils ca. 30 – 35 bp und sollten einen Schmelzpunkt T_M von mindestens 78°C aufweisen. Dieser kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_M = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{675}{N} - (\%F) \text{ [}^\circ\text{C]}$$

Dabei steht %GC für den Anteil von Guanin und Cytosin in der Sequenz (0 – 100 %), N für die Gesamtzahl der Basen und %F für den Prozentsatz von Basen, die nicht mit der entsprechenden Position in der Ausgangs-DNA komplementär sind. Der Reaktionsansatz wird in ein steriles 0,2-ml-Gefäß überführt und mit 1 µl Pfu-Polymerase (entspricht 2 *units*) vermischt. Die Mutagenese findet in einem Gradienten-PCR-Gerät unter folgenden Bedingungen statt:

1 min 95°C

1 min 95°C – 1 min 60°C – 15 min 68°C (25 Wiederholungen)

4°C

Die drei Schritte, die 25mal oder bei Bedarf auch öfter wiederholt werden, stehen für den Zyklus Schmelzen – Primeranlagerung – Verlängerung. Da manche Primer abhängig von ihrer Sequenz bevorzugt bei Temperaturen unterhalb von 60°C an die DNA anlagern, können mehrere PCR-Ansätze zeitgleich unter Verwendung eines Temperaturgradienten (z. B. 50°C – 55,4°C – 60°C) getestet werden.

Die Reaktionsansätze werden am nächsten Tag auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (160 V 1 h) und bei erfolgreicher Mutagenese liegt eine Bande bei ca. 7 kbp vor.

Die parentale Ausgangs-DNA sollte nun beseitigt werden, damit im Ansatz keine Sequenzen mehr vorliegen, die die gewünschte Mutation nicht enthalten. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Ausgangs-DNA nicht *in vitro*, sondern in einer Zelle gebildet wurde und somit bestimmte Adenine eine Methylierung aufweisen (dam-Methylierung). Diese wird wiederum spezifisch vom Restriktionsenzym DpnI erkannt. 1 µl dieses Enzyms (20 *units*) wird zum Mutageneseansatz hinzugegeben und 90 min bei 37°C inkubiert, so dass das nun Ausgangs-DNA-freie PCR-Produkt für die Elektrotransformation bereit ist.

3.1.2 Transformation

3.1.2.1 Elektrotransformation

Zur Transformation der DNA in den Klonierstamm *E. coli* XL1-Blue werden 10 µl der DNA aus dem Mutageneseansatz mit einer Mikrodialysemembran (0,025 µm) 10 min gegen H₂O dialysiert. Dieser Schritt ist erforderlich, um die DNA von Salzrückständen zu reinigen, die bei der nachfolgenden Elektroporation zu einem Salzschock in den Zellen führen würden. Der DNA-Tropfen wird nun mit einem Aliquot der kompetenten Zellen vermischt und 15 min auf Eis gelagert. Der Ansatz wird in eine Elektrotrafoküvette überführt und in einem Elektroporator bei 2500 V einem kurzen Elektroschock ausgesetzt. Bei diesem Vorgang wird die Zellmembran temporär für Plasmide durchlässig. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium werden die Zellen 30 min bei 37°C angezogen, 3 min bei 3000 Upm abzentrifugiert (Biofuge) und das resuspendierte Pellet auf eine LB-Km-Platte ausgestrichen. Der Ansatz wird daraufhin ÜN kopfüber bei 37°C gelagert.

3.1.2.2 Hitzetransformation

Zur Transformation der DNA in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) RP wird ein Aliquot der kompetenten Zellen mit 2 µl Mini-Prep-DNA vermischt und 15 min auf Eis gelagert. Die Zellen werden einem Hitzeschock (90 s bei 42 °C) ausgesetzt und kurz auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium werden die Bakterien 30 min bei 37°C angezogen, 3 min bei 3000 Upm abzentrifugiert (Biofuge) und das resuspendierte Pellet auf eine LB-Km-Cm-Platte ausgestrichen. Der Ansatz wird ÜN kopfüber bei 37°C gelagert. Anschließend kann mit einer Kolonie von der Platte eine Glycerinkultur angefertigt werden. Dazu wird diese ÜN bei 37°C in 10 ml LB-Km-Cm-Medium aufgezogen und anschließend 850 µl der Zellsuspension mit 150 µl sterilem Glycerin vermischt und eingefroren.

3.1.3 PCR-Screen

Leider werden durch die beschriebene Mutagenesemethode manchmal Insertionen in das DNA-Produkt eingefügt. Die Primersequenz ist dann nicht einmal, sondern zweimal (Duplikation) oder noch öfter in das Plasmid integriert. Durch einen PCR-Screen können auf einfache Art und Weise Klone mit Insertionen aussortiert werden, wobei man noch keine Aussage darüber erhält, ob insertionsfreie Ansätze auch tatsächlich die gewünschte Mutation enthalten oder nicht. Eine Sequenzierung der mutierten DNA ist daher am Ende auf jeden Fall erforderlich. Beim PCR-Screen werden zwei geeignete Primer (5' und 3') ausgesucht, die links und rechts von der Mutationsstelle an das Plasmid binden und im Idealfall etwa 100 bis 400 bp voneinander entfernt sein sollten. Alternativ kann auch einer der beiden Mutageneseprimer selbst als PCR-Screen-Primer verwendet werden. Durch eine PCR mit der mutierten DNA und den beiden Primern mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Amplifikate mit der richtigen Länge von solchen mit Insertionen unterscheiden, da diese ca. 30 – 40 bp länger sind. Der einfache PCR-Screen-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

2 µl 10 x Taq-Puffer

je 0,1 µl Primer #1 (5') und #2 (3') – entspricht jeweils 0,5 µM

0,8 µl dNTP-Gemisch – entspricht jeweils 40 µM pro Nukleotid

0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 units)

auf 20 µl mit H₂O auffüllen

Die Taq-Polymerase arbeitet schneller als die Pfu-Polymerase und produziert mehr unerwünschte Punktmutationen, was beim PCR-Screen allerdings unerheblich ist. Mit sterilen Zahnstochern werden Kolonien von der Elektrotransformationsplatte zu einzelnen Reaktionsansätzen gegeben und gleichzeitig zur Sicherheit auf einer zweiten LB-Km-Platte ausgestrichen. Diese Platte wird mindestens 8 h oder ÜN bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Außerdem wird zum Vergleich eine Wildtypkontrolle erstellt, d. h. die oben genannte Reaktionsmischung wird in einem separaten Ansatz mit 0,5 µl WT-DNA aus einer Mini-Prep vermischt. Nun wird eine PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

5 min 95°C (Zellaufschluss)

45 s 95°C – 30 s 52°C – 30 s 72°C (25 Wiederholungen)

30 s 72°C

4°C

Alle PCR-Ansätze werden gemeinsam mit der WT-Kontrolle auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (160 V 1 h). Diejenigen PCR-Produkte, die genauso lang sind wie das Kontrollamplifikat, enthalten keine

Insertionen. Wenn man einen für die Mutation verwendeten Mutageneseprimer auch als PCR-*Screen-Primer* eingesetzt hat, wird man jeweils eine Bande für jedes Vorkommen der Primersequenz im Plasmid auf dem Gelfoto erkennen. Die gewünschten insertionsfreien PCR-Produkte weisen daher nur eine Bande auf, während Duplikationen (Triplikationen usw.) zwei (drei usw.) Banden erzeugen.

Anschließend kann ein insertionsfreier Klon von der Sicherheitsplatte in 10 ml LB-Km-Medium überführt und ÜN bei 37°C und 150 Upm aufgezogen werden. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wird mit dieser Zellsuspension nach Angaben des Herstellers eine Mini-Prep durchgeführt. Die DNA kann dann extern sequenziert werden, um zu ermitteln, ob in der PCR-Mutagenese die gewünschte Sequenz erzeugt wurde oder nicht.

3.1.4 Expressionstest

Mit einem Expressionstest (Proteinproduktionstest) kann ermittelt werden, ob die Hitzetransformation der DNA in den Expressionsstamm erfolgreich war. Mehrere Kolonien von der Platte werden in jeweils 10 ml LB-Km-Cm-Medium bei 37°C und 150 Upm aufgezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 die Proteinexpression mit 0,2 mM IPTG induziert. Nach mehreren Stunden werden 250 µl der Zellen 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert (Biofuge), das Pellet in 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer gelöst und 5 min bei 95°C gekocht. Als Kontrollansatz werden Zellen verwendet, die ebenso lang, aber ohne IPTG-Zugabe angezogen wurden. Alle Proben werden nun auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mit PAGE unter denaturierenden Bedingungen getrennt. Nach der Coomassiefärbung kann durch einen Vergleich der Banden mit dem Kontrollansatz ermittelt werden, ob eine Expression des gewünschten Proteins stattgefunden hat oder nicht.

3.1.5 Heterologe Überexpression in *E. coli*

Aus einer Bakterien-Glycerinkultur wird mit einer Impföse unter sterilen Bedingungen ein Ausstrich auf einer LB-Platte mit den Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol (LB-Km-Cm) durchgeführt. Nach einer ÜN-Inkubation bei 37°C wird am nächsten Tag eine Einzelkolonie in 10 ml LB-Km-Cm-Medium überimpft und die Vorkultur über Tag (ca. 8 h) bei 37°C und 150 Upm geschüttelt. Aus diesem Ansatz wird anschließend 1 ml in 100 ml LB-Km-Cm pipettiert und unter gleichen Bedingungen wie bei der Tageskultur ÜN inkubiert. Tags darauf werden davon 40 ml in eine Fermenterflasche mit 4 l LB-Km-Cm (siehe 2.4) sowie einer geringen Menge eines Antischaummittels gegeben. Die Anzucht der Bakterien erfolgt unter Luftzufuhr bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6, was etwa 2 h in Anspruch nimmt. Die heterologe Überproduktion der Proteine wird nun durch Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert und in einem Zeitraum von 4 h bis zu einem OD₆₀₀-Endwert von 2,5 – 3,5 durchgeführt.

Alternativ kann die Überproduktion in einem Autoinduktionsmedium (AIM⁶⁸) in einem Fermenter oder in einem Kolben mit Schikanen stattfinden. Eine Einzelkolonie des Expressionsstammes wird dazu in 10 ml LB-Km-Cm-Medium überimpft und die Vorkultur über Tag (ca. 8 h) bei 37°C und 150 Upm geschüttelt. Dieser Ansatz wird anschließend komplett in 1 l AIM-Km-Cm überführt und ÜN bei 37°C (150 Upm) inkubiert. Eine Induktion durch IPTG ist in diesem Fall nicht nötig, da AIM die beiden Zuckerkomponenten Glucose und Lactose enthält (siehe 2.4). Die Bakterien betreiben zunächst solange Glucose-Stoffwechsel, bis bei einer bestimmten Zellkonzentration dieser Stoff aufgebraucht ist. Danach schalten sie auf den alternativen Lactose-Stoffwechsel um, wodurch gleichzeitig die Überexpression induziert wird.

3.2 Proteinreinigung

3.2.1 Zellaufschluss

Die Zellen aus dem Überexpressionsansatz werden 10 min bei 5000 Upm pelletiert (Sorvall-Zentrifuge, Rotor SLA-3000) und anschließend in 30 ml Aufschlusspuffer ($c_{\text{NaCl}} = 1 \text{ M}$) resuspendiert. Bei Bedarf kann dieser Ansatz in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C einige Wochen lang aufbewahrt werden. Für den Aufschluss der Zellen stehen der *Microfluidizer* und der Ultraschallstab zur Verfügung. Um eine Spaltung der rekombinanten Proteine durch bakterielle Proteasen zu verhindern, wird zur Probe eine halbe Proteaseinhibitortablette gegeben, die zuvor in ca. 1 ml H₂O bidest. aufgelöst wurde. Alle folgenden Arbeitsschritte einschließlich Fällungen und der chromatographischen Reinigung finden auf Eis bzw. bei 4°C statt.

Der Ultraschallstab muss vor und nach der Benutzung gründlich mit H₂O und Ethanol gereinigt werden. Wegen der auftretenden Wärme erfolgt der Aufschluss der Zellen in Eiswasser. Die Probe wird etwa siebenmal für 1 min dem Ultraschall auf mittlerer Stufe (200 W) ausgesetzt. Dazwischen wird der Ansatz jeweils geschüttelt und 1 min auf Eis belassen, um die Ausbeute zu erhöhen. Bei der Benutzung des *Microfluidizers* wird dieser zuerst gründlich mit H₂O und Aufschlusspuffer gespült. Die Probe wird nun nach den Vorgaben des Herstellers durch das Gerät geleitet, wobei die Zellen durch den hohen auftretenden Druck und insbesondere durch den spontanen Druckabfall am Ende der dünnen Leitung zum Platzen gebracht werden. Nach dem Gebrauch muss das Gerät sorgfältig mit H₂O und technischem Isopropanol gespült werden. Grundsätzlich ist diese Methode vorzuziehen, da die Zellen mit dem *Microfluidizer* wesentlich gründlicher aufgeschlossen werden als mit einem Ultraschallstab.

Nach dem Aufschluss wird der Ansatz 30 min bei 13000 Upm abzentrifugiert (Beckman-Zentrifuge, Rotor F0650), wobei es sich beim Überstand um den Rohextrakt handelt. Bei Bedarf kann das Pellet im

gleichen Volumen Puffer resuspendiert und von beiden Phasen je 15 µl mit PAGE unter denaturierenden Bedingungen untersucht werden. Auf diese Weise ist es möglich, das Proteinverhältnis zwischen Pellet und Rohextrakt zu bestimmen und die Aufschlussmethode zu beurteilen.

3.2.2 Proteinbehandlung

3.2.2.1 Ammoniumsulfatfällung

Proteine können (in der Regel unter Beibehaltung der Aktivität) mit Ammoniumsulfat gefällt werden. Das Salz konkurriert in hohem Maße mit den Enzymen um die Hydrathülle und sorgt ab einer gewissen Konzentration dafür, dass die Proteine reversibel ausfallen. Zur Probe wird langsam unter Rühren Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 50 % (entspricht 0,29 g/ml) gegeben, welches zuvor mit einem Mörser zerkleinert wurde. Bei zu schneller Zugabe kann es passieren, dass die Proteine (durch die pH-Änderung) denaturiert werden. Nach der Fällung (45 min bei 4°C) wird der Ansatz schließlich 30 min bei 13000 Upm (Beckman-Zentrifuge, Rotor F0650) abzentrifugiert. Das Pellet enthält die gefällten Proteine und kann in wenigen ml eines geeigneten Puffers resuspendiert werden. Die Fällung mit Ammoniumsulfat ist insbesondere nach einer PEI-Fällung notwendig, um restliches Polyethylenimin von den Proteinen zu trennen. PEI darf unter keinen Umständen auf eine Chromatographiesäule gelangen, da es diese aufgrund seiner langkettigen Struktur verstopfen würde. Bei manchen Proteinen führt die Ammoniumsulfatpräzipitation jedoch zu einer irreversiblen Denaturierung, so dass auf diesen Schritt verzichtet werden muss. In diesem Fall kann die DNA mit Streptomycinsulfat beseitigt und das Probenvolumen durch geeignete chromatographische Verfahren auf wenige ml reduziert werden.

Nach der Fällung muss die Probe dialysiert werden, um restliches Ammoniumsulfat zu entfernen bzw. um die Salzkonzentration für die folgenden chromatographischen Schritte anzupassen. Dazu wird der Ansatz in einen Dialyseschlauch gefüllt und mindestens 4 h bzw. ÜN unter leichtem Rühren bei 4°C im hundertfachen Volumen des gewünschten Puffers aufbewahrt. Alternativ kann die Probe zweimal in Folge jeweils mindestens 4 h im zehnfachen Puffervolumen dialysiert werden.

3.2.2.2 Entfernung der DNA

Zur Entfernung von DNA kann die Probe einer Streptomycinfällung unterzogen werden. Dazu wird Streptomycinsulfat, das in Aufschlusspuffer gelöst wurde, langsam unter Rühren auf Eis zum Ansatz getropft, bis die Massenkonzentration 5 % beträgt. Nach der Zugabe lässt man die Probe 15 min weiterrühren und zentrifugiert die DNA 30 min bei 13000 Upm (Beckman-Zentrifuge, Rotor F0650) ab. Der Überstand sollte nun weitgehend nukleinsäurefrei vorliegen. Eine andere Möglichkeit zur Entfernung

von Nukleinsäuren ist die Fällung mit Polyethylenimin (PEI). Dazu wird eine 5%ige PEI-Lösung hergestellt und eine Menge, die 7 % des Probenvolumens entspricht, langsam unter Rühren bei 4°C zum Ansatz getropft. Nachdem 15 min weitergerührt wurde, kann die DNA durch Zentrifugation (15 min 13000 Upm mit Beckman-Zentrifuge, Rotor F0650) pelletiert werden.

3.2.3 Flüssigchromatographie

3.2.3.1 Theorie

Die Flüssigchromatographie (LC) ist eine Trennmethode, bei der eine gelöste Substanzmischung mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes über eine stationäre Phase geleitet wird und dabei die einzelnen Bestandteile der Mischung getrennt werden. Die LC-Methode der Wahl zur Proteinreinigung ist FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) – alle Reinigungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an einer solchen Anlage („ÄKTA *prime*“) bei 4°C durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Proteingemisch mit einer Pumpe über eine Säule geleitet, in der sich das entsprechende Gelmaterial befindet. Je nach der chemischen Zusammensetzung der Matrix, dem verwendeten Laufpuffer sowie den Proteineigenschaften erfolgt ein unterschiedliches Laufverhalten der Makromoleküle und somit eine Trennung des Gemisches. Durch die Verwendung eines Gradienten, bei dem ein Laufpuffer schrittweise durch einen anderen mit höherer Salzkonzentration ersetzt wird, kann die Trennung deutlich verbessert werden. Ein nachgeschalteter UV-Detektor ist in der Lage, automatisch den Proteingehalt der aus der Säule austretenden Lösung über die Absorption bei 280 nm zu bestimmen. Die gewünschten Proteine können schließlich mit Hilfe eines Fraktionskollektors gesammelt werden. Alle verwendeten Puffer sowie Wasser und Ethanol müssen sterilfiltriert vorliegen und zur Vermeidung von Luftblasen auf der Säule vor jedem Lauf frisch entgast werden. Ebenso muss man die Proben vor dem Auftrag 10 min bei 13000 Upm abzentrifugieren (Beckman-Zentrifuge, Rotor F0650), um die Säulen nicht mit der Zeit zu verstopfen.

3.2.3.2 Heparin-Sepharose

Bei der Chromatographie mit einer Heparinsäule spielt die sterische Affinität sowie die Ladung der Proteine eine Rolle. Einerseits weist das an die Sepharose gebundene Polysaccharid Heparin eine strukturelle Ähnlichkeit zu DNA auf und ist somit in der Lage, DNA-prozessierende Proteine zu binden. Andererseits kann das Polyanion wegen seiner Sulfatgruppen als Kationenaustauscher wirken, indem es an positiv geladene Seitenketten der Proteine bindet. Zunehmende Salzkonzentrationen destabilisieren daher die Affinität zur Gelmatrix. Die 5-ml-Säule (*HiTrap Heparin HP*) wird bei 5 ml/min (0,5 MPa) mit Wasser und Heparin-A-Puffer vorgespült und danach die Probe, die im gleichen Puffer vorliegen muss, mit Hilfe einer 5-ml-Schleife oder eines 50-ml-*Superloops* auf die Säule geleitet. Nach erneutem Spülen

mit Puffer A bis zu einem konstanten UV-Wert kann man einen Gradienten zu Heparin-Puffer B fahren und das Eluat in 1- bis 2-ml-Fractionen sammeln. Es wird zur besseren Trennung ein sehr langer Gradient von 100 ml eingesetzt und anschließend eventuell auf der Säule verbleibende Rückstände mit Puffer B entfernt. Wenn die Elution schon deutlich vor dem Ende des Gradienten abgeschlossen ist, kann der Anteil an Puffer B auch manuell direkt auf 100 % erhöht werden. Die Säule wird zum Schluss mit Wasser und 20 % EtOH gespült und bei 4°C gelagert. Durch die automatische Messung der A_{280} bzw. durch PAGE unter denaturierenden Bedingungen kann herausgefunden werden, in welchen Fraktionen sich das gewünschte Enzym aufhält. Da die meisten Proteine durch die Heparinsäule festgehalten und erst bei der Elution wieder freigegeben werden, ist dieses Material sehr gut geeignet, um ein hohes Probenvolumen auf ein niedriges zu reduzieren. Dies spielt besonders dann eine Rolle, wenn ein Protein nicht durch eine Ammoniumsulfatfällung eingengt werden kann, da es durch eine solche irreversibel denaturiert würde.

3.2.3.3 Blaue Sepharose

Ein Weg, der besonders bei ATPasen erfolgversprechend ist, ist eine Affinitätschromatographie mit blauer Sepharose als Trägermaterial. Die Sepharose ist hierbei mit dem blauen Farbstoff *Cibacron blue* verknüpft, der eine ähnliche Struktur wie NADH aufweist und daher auch mit dem Adeninnukleotid ATP um ATPasen wie z. B. GyrB konkurriert. Die Chromatographie mit blauer Sepharose (*HiTrap Blue HP*; 5-ml-Säule) funktioniert genau wie diejenige mit Heparin-Sepharose und es werden dieselben Puffer und Bedingungen verwendet.

3.2.3.4 Anionenaustauscher

Diethylaminoethyl-(DEAE-)Sepharose ist ein schwacher Anionenaustauscher, der u. a. zur Entfernung des Polyanions DNA aus Proteingemischen eingesetzt werden kann. Voraussetzung ist, dass das zu reinigende Protein sich nicht ebenfalls an die Säule (*HiPrep 16/10 DEAE FF*) anlagert. Eine ähnliche Funktion erfüllt der starke Anionenaustauscher Sepharose Q, der quaternäre Ammoniumionen enthält und daher theoretisch ebenfalls Substanzen binden kann, die überwiegend negativ geladen sind. Der Ablauf der Chromatographie und die verwendeten Puffer entsprechen denen im Fall der Heparinsäule.

3.2.3.5 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie werden die Moleküle im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Säulenarten bezüglich ihrer Größe bzw. ihres Molekulargewichts getrennt. Die verwendete Gelmatrix Superdex 200 (S200) besteht aus einem Trägermaterial aus feinen Gelkügelchen, die wiederum im Inneren von kleinen Poren durchzogen werden. Große Proteine sind nicht bzw. kaum in der Lage, in

die Poren zu gelangen und laufen schnell durch das Gel hindurch. Kleinere Moleküle verfangen sich dagegen in den Gelkugeln, so dass sie während der Chromatographie ein retardiertes Laufverhalten zeigen und längere Zeit benötigen, um die 120-ml-Säule zu verlassen. Mit dem verwendeten Gelmaterial erzielt man eine gute Trennung im Bereich von 10 bis 600 kDa, sofern man dafür sorgt, dass das Auftragsvolumen genügend klein ist. Die Proteinprobe muss daher vor dem S200-Lauf mit *Vivaspin*-Filterröhrchen mit einem Ausschlussgewicht von 10 kDa bei 4800 Upm (Beckman-Zentrifuge, Rotor S4180) solange konzentriert werden, bis ihr Volumen den Wert von 2 ml unterschreitet. Die Säule (*S-200 HR 16/60*) wird ÜN mit jeweils zwei Säulenvolumen (240 ml) Wasser und S200-Puffer vorgespült. Zur Auftragung der Probe wird eine 2-ml-Schleife verwendet, die zuvor ebenfalls mit Wasser und Puffer behandelt werden muss. Nachdem der konzentrierte Ansatz (in S200-Puffer) in die Schleife eingespritzt wurde, kann er von dort über die Säule geleitet und das Eluat in 1- oder 2-ml-Fraktionen gesammelt werden. Nach 120 ml bei 1 ml/min und einem maximalen Druck von 0,5 MPa ist der Lauf beendet. Durch eine A_{280} -Messung sowie PAGE unter denaturierenden Bedingungen können wiederum die Fraktionen ermittelt werden, die das rekombinante Protein enthalten. Die Säule muss anschließend ÜN mit Wasser und 20 % EtOH gereinigt und danach bei 4°C gelagert werden. Die Gelfiltrationsmatrix sollte wegen ihrer hohen Empfindlichkeit nie zur Reinigung von Rohextrakten eingesetzt werden und immer der letzte Schritt im Reinigungsprotokoll sein. Die Lösung mit den gewünschten Proteinen kann mit *Vivaspin*-Röhrchen bei 4800 Upm (Beckman-Zentrifuge, Rotor S4180) auf eine geeignete Konzentration (50 – 100 μ M) eingengt, aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und schließlich bei -80°C für längere Zeit gelagert werden.

3.2.4 Reinigungskontrolle

3.2.4.1 UV-Spektrometrie

Eine Proteinlösung kann untersucht werden, indem man ein Spektrum im UV-Bereich von 230 bis 350 nm aufnimmt. Das Absorptionsmaximum sollte im Idealfall bei 280 nm liegen, wobei dieser Wert, wie bei GyrA und GyrB der Fall, bei einem hohen Verhältnis von Tyrosin- gegenüber Tryptophanresten im Protein um wenige nm sinken kann. Liegt das Maximum deutlich darunter, befindet sich im Ansatz noch DNA, die hauptsächlich bei 260 nm absorbiert. Das Verhältnis A_{280}/A_{260} sollte 1,8 bis 2 betragen. Wenn das Protein als Aggregat vorliegt, überlappt sich das Proteinspektrum mit einer hyperbolischen Kurve, die insbesondere ab 300 nm besonders auffällig ist. Bei vollständig gelöstem Protein liegt die Absorption in diesem Wellenlängenbereich dagegen bei Null. Bei Abwesenheit von DNA und Aggregat kann aus der Absorption bei 280 nm mit der Lambert-Beerschen Formel die Konzentration des Proteins bestimmt werden (1):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Als Referenz wird hierbei Puffer ohne Protein eingesetzt. Bei einer Schichtdicke $d = 1$ cm und bekanntem Extinktionskoeffizienten ϵ bei 280 nm kann die Konzentration c aus der Absorption A berechnet werden. Die Ermittlung von ϵ_{280} erfolgt für Proteine im entfalteten Zustand mit bekannter Aminosäuresequenz durch folgende Formel⁷² (2):

$$\epsilon_{280} = 5690 \cdot \sum Trp + 1280 \cdot \sum Tyr + 120 \cdot \sum Cystine [M^{-1}cm^{-1}]$$

Aus der Anzahl der aromatischen Reste Tryptophan und Tyrosin sowie der Disulfidbrücken kann so der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins bestimmt werden. Der Einfluss der dritten aromatischen Aminosäure Phenylalanin kann vernachlässigt werden. Für die beiden Gyrase-Untereinheiten ergeben sich folgende Werte:

GyrA (1 Trp, 25 Tyr, keine Disulfidbrücke): $37690 M^{-1}cm^{-1}$

GyrB (2 Trp, 28 Tyr, keine Disulfidbrücke): $47220 M^{-1}cm^{-1}$

3.2.4.2 PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Zur Proteintrennung wird die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) verwendet. Das Proteingemisch wird zuerst mit 4 x SDS-Probenpuffer vermengt und sofort 5 min bei 95°C gekocht. Alternativ können (beispielsweise bei Produktionstests) Zellpellets in 1 x Puffer resuspendiert und erhitzt werden. Bei diesem Vorgang werden die Proteine komplett und irreversibel denaturiert. Das im Probenpuffer vorhandene β -Mercaptoethanol trennt Disulfidbrücken, während SDS (Natriumdodecylsulfat) an hydrophobe Aminosäuren der Proteine bindet, so dass die Ausbildung von Sekundärstrukturen behindert wird und die Makromoleküle sich auffalten. Man geht davon aus, dass im Durchschnitt etwa zwei SDS-Moleküle pro Aminosäure gebunden werden. Das Resultat sind mizellartige Gebilde mit teilweise aufgefalteten Peptidketten, die aufgrund des hohen SDS-Gehalts unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz stark negativ geladen sind. Bei einer anschließenden Trennung in einem elektrischen Feld hängt die Wanderungsgeschwindigkeit allein von der Masse des Proteins ab.

Das Gel besteht bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE aus zwei Bereichen: Das eigentliche Trenngel dient der Trennung des Proteingemisches in Abhängigkeit von der Molekülgröße. Daneben wird ein niedrigkonzentriertes Sammelgel verwendet, das die Aufgabe hat, das Gemisch am Startpunkt der Elektrophorese zu konzentrieren, was die Trennschärfe deutlich erhöht. Je nach Größe der interessanten Proteine kann die Konzentration an Acryl-/Bisacryllösung und somit die Netzdichte im Gel variiert werden. Für die meisten Proteine können 10%ige Trenngelle verwendet werden, während bei sehr kleinen

Proteinen 15%ige Gele ein besseres Ergebnis liefern. Das Trenngel wird angesetzt und sofort nach der Zugabe von TEMED, welches als Starter für die Polymerisierung des Gels wirkt, in vorbereitete Glas- oder Keramikplatten gegossen. Mit einer dünnen Isopropanolschicht kann eine unerwünschte Oxidation des Gels durch Sauerstoff aus der Luft verhindert werden. Nach erfolgter Polymerisation wird der Alkohol abdekantiert, das Sammelgel (4,5 %) nach der TEMED-Zugabe auf das Trenngel gegossen und ein Teflonkamm eingeführt. Das Sammelgelgemisch wurde zuvor durch Zugabe einer Spatelspitze Bromphenolblau gefärbt, da auf diese Weise die Geltaschen auf dem weißen Keramikhintergrund besser erkennbar sind. Fertige SDS-Gele können 1 – 2 Wochen lang in einem feuchten Zellstofftuch bei 4°C aufbewahrt werden.

Das Gel wird nach der Entfernung des Kammes in eine Elektrophoreseapparatur eingebaut und der SDS-Laufpuffer eingefüllt. Die Proben (10 – 15 µl) sowie 4 µl eines Proteinmarkers (zur Größenbestimmung) werden nun in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wird 40 min bei RT und 30 mA pro Gel durchgeführt und ist beendet, wenn die blaue Laufmittelfront die Unterseite des Trenngels erreicht hat. Zum Nachweis der Proteine wird anschließend eine Färbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau R-250 durchgeführt, der sich an die denaturierten Proteine anlagert und diese sichtbar macht. Das Sammelgel aus der SDS-PAGE wird entfernt und das Trenngel mindestens 45 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Nach fünfminütiger Inkubation in Entfärbelösung wird das Gel in H₂O aufbewahrt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen sind, und anschließend in einer Dokumentationsanlage ohne Bandpassfilter fotografiert. Die Nachweisgrenze bei dieser Färbemethode liegt bei ca. 50 – 100 µg Protein, was für die meisten Zwecke ausreichend ist.

3.3 Substratbehandlung

3.3.1 DNA-Präparation

Für Aktivitäts- und Bindungstests wird pUC18 mit 2686 bp (entspricht 1745 kDa) als Substrat verwendet. Zur pUC18-Herstellung werden 20 µl der Glycerinkultur in 100 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin angeimpft und ÜN bei 37°C und 150 Upm inkubiert. Anschließend wird nach den Vorgaben des Herstellers eine Midi-Prep durchgeführt, die etwa 50 µg reines pUC18 liefert. Das Volumen des Ansatzes kann mit einem Vakuumkonzentrator solange eingengt werden, bis sich eine Konzentration von etwa 200 µg/ml ergibt. Diese kann unter Verwendung eines Photometers und H₂O als Referenz bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Umrechnungsfaktor für doppelsträngige DNA (1 A₂₆₀ entspricht 50 µg/ml) bestimmt werden. Bei einer Gesamtlänge von 2686 bp entsprechen 1,745 µg/ml einer Konzentration von 1 nM. Das Plasmid wird aliquotiert, damit DNAsen keinen größeren Schaden anrichten können, und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Für ATPase- oder mantADP-Tests sowie für FRET-Messungen werden deutlich höhere Mengen an Plasmid benötigt. Dazu werden die Zellen in 0,5 – 1 l Medium aufgezogen und nach den Vorgaben des Herstellers eine Mega-Prep durchgeführt. Die Ausbeute an pUC18 steigt dadurch um etwa den Faktor 20 – 50 auf wenige mg. Der Ansatz sollte anschließend ethanolgefällt werden, um das Volumen zu verkleinern und um die Reinheit zu erhöhen.

3.3.2 Ethanolfällung

Bei Gegenwart von monovalenten Ionen fällt DNA in einem Ethanolüberschuss reversibel aus. 100 µl eines pUC18-Ansatzes mit beliebiger Konzentration werden hierfür zuerst mit 10 µl 3 M KAc (pH = 5,5) und dann mit 220 µl 100 % EtOH p. a. versetzt und die DNA ÜN bei -20°C gefällt. Nach 10 min bei 13000 Upm (Biofuge) wird das Pellet in 100 µl 70 % EtOH resuspendiert, da unter diesen Bedingungen zwar die monovalenten Ionen, nicht aber das Plasmid in Lösung gehen. Nach weiteren 5 min bei 13000 Upm kann das DNA-Pellet getrocknet, in 50 µl nukleasefreiem H₂O (bzw. aktivkohlegereinigtem H₂O für FRET-Messungen) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

3.3.3 Phenol-Chloroform-Fällung

DNA kann von Proteinen durch eine Extraktion mit Phenol und Chloroform getrennt werden, wobei die Enzyme irreversibel denaturiert werden. Dazu wird 100 µl Probe mit 100 µl einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 vermengt. Es bilden sich zwei nicht mischbare Phasen aus, wobei die obere wässrige Phase die DNA enthält und die untere organische Phase aus dem Chloroform und dem größten Teil des Phenols besteht. Beide Stoffe haben eine denaturierende Wirkung auf Proteine, wobei Chloroform zusätzlich eine Stabilisierung der Phasengrenze bewirkt. Die Zugabe von geringen Mengen an Isoamylalkohol verhindert ein übermäßiges Schäumen während des Mischvorgangs. Die Proteine fallen bei diesem Schritt aus und sammeln sich größtenteils in der Interphase zwischen beiden Schichten an. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 8000 Upm zur Beschleunigung der Phasenbildung (Biofuge) wird die obere wässrige Komponente in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 100 µl von einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 dazugegeben. Dieser Schritt dient zur Extraktion des Phenolanteils, der zuvor in der wässrigen Phase gelöst war. Nach der Vermischung und 1 min bei 8000 Upm wird wiederum die obere wässrige Phase entnommen und zur Beseitigung von Phenolrückständen einer Ethanolfällung unterzogen.

3.3.4 Linearisierung

Das Plasmid pUC18 enthält in den 2686 bp exakt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI.

Dies kann genutzt werden, um die DNA z. B. für nachfolgende ATPase- oder Gelverschiebungstests zu linearisieren. 500 nM pUC18 werden mit EcoRI (1 *unit*) in EcoRI-Puffer nach Angaben des Herstellers 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym 20 min bei 65°C hitzedeaktiviert und 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert.

3.3.5 Doppelstrangbildung

Doppelsträngige DNA-Fragmente werden aus den beiden (markierten oder unmarkierten) Einzelsträngen durch eine Thermobehandlung hergestellt. Jeweils 10 µM der beiden Stränge werden in einem Gesamtvolumen von 20 µl in H₂O in einem 0,2-ml-PCR-Gefäß vermischt. Der Ansatz wird danach in einem PCR-Gerät auf 90°C erhitzt und die Temperatur nach jeweils 10 min in 10°C-Schritten auf 30°C reduziert. Durch diese langsame Abkühlung ist praktisch sichergestellt, dass keine unspezifischen Bindungen zwischen den Einzelsträngen entstehen, sondern ausschließlich die gewünschte dsDNA gebildet wird. Als Ergebnis erhält man 10 µM des Doppelstrangs, der anschließend für ssATPase-Tests oder für FRET-Messungen eingesetzt werden kann.

3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Proben wird das Verfahren der Elektrophorese in einem Agarosegel verwendet. Da Nukleotide durchgehend negativ geladen sind, hängt ihre Laufgeschwindigkeit allein von ihrer Größe ab. Es wird 1 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE gelöst (entspricht 1 %) und der Ansatz solange in der Mikrowelle gekocht, bis er vollkommen durchsichtig und frei von Schlieren ist. Für Spaltungstests oder PCR-Screens werden 2%ige Gele verwendet, um kleinere Fragmente untersuchen zu können. Die Gellösung wird danach in eine vorbereitete Form gegossen und für die Taschenbildung ein Kamm mit wahlweise 9 oder 13 Zacken eingeführt. Nachdem das Gel fest geworden ist, kann es in die Laufkammer eingelegt und mit 0,5 x TBE bedeckt werden. Die Proben werden mit 10 x DNA-Puffer vermenget und 10 µl davon in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung können außerdem 4 µl eines geeigneten DNA-Markers aufgetragen werden. Der Elektrophoreselauf findet in der Regel 1 h bei 160 V statt und ist beendet, wenn die violette Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat. Zur Verbesserung der Bandentrennung kann eine Elektrophorese alternativ ÜN bei 4°C und 18 V durchgeführt werden, was insbesondere bei Aktivitätstests deutlich schönere Resultate liefert als ein einstündiger Lauf bei hoher Spannung. Nach der Elektrophorese wird das Gel 30 min in eine EtBr-Färbelösung (1 µg/ml) gelegt. In dieser Zeit interkaliert der hochgiftige Farbstoff Ethidiumbromid in die DNA. Das Gel wird danach kurz in H₂O gelegt und schließlich in einer Dokumentationsanlage unter Verwendung eines SYBR-Green-Bandpassfilters fotografiert.

3.4 Aktivität

3.4.1 Standard-Aktivitätstest

Gyrase ist in der Lage, ATP-unabhängig negativ superspiralisierte Topoisomere zu relaxieren und ATP-abhängig die inverse Reaktion auszuführen. Die einzelnen Verdrillungsstufen lassen sich durch Agarose-Gelelektrophorese trennen, da Plasmide mit einer stärkeren Spiralisierung kompakter sind und daher in einem elektrischen Feld schneller wandern als relaxierte, d. h. relativ sperrige Plasmide⁷³. Für den Aktivitätstest wird das Plasmid pUC18 mit 2686 bp verwendet, das in natürlicher Form negativ superspiralisiert vorliegt. Der Testansatz besteht aus folgenden Komponenten:

200 nM GyrA

800 nM GyrB

15 nM pUC18

in Proteinpuffer (siehe 2.5)

Möchte man die Abhängigkeit der Relaxierung von der GyrB-Konzentration bestimmen, so variiert man die Menge an zugegebener ATPase. Bei einem vierfachen Überschuss gegenüber GyrA kann von einer Sättigung ausgegangen werden (5.1.4.3). GyrA und GyrB liegen sofort nach der Zusammenführung als aktive Gyrasemoleküle vor, so dass für die Tetramerbildung keine Vorinkubationszeit nötig ist. Die ATP-freie pUC18-Relaxierung im Testansatz wird zum Zeitpunkt $t = 0$ mit der Zugabe des Plasmids gestartet und bei 37°C durchgeführt. Zu den gewünschten Zeitpunkten werden 9 µl aus dem Ansatz entnommen und dort die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Stopplösung beendet. Dabei handelt es sich um eine 1:1-Mischung aus 10 % SDS und 0,5 M EDTA, wodurch einerseits die Proteine denaturiert und andererseits die (für die ATP-Interaktion notwendigen) Mg^{2+} -Ionen komplexiert werden. Beide Substanzen haben dagegen keinen schädlichen Einfluss auf die DNA-Moleküle bzw. auf deren Topologie. 2 h nach dem Beginn der Relaxierung gibt man 1,5 mM ATP zum restlichen Ansatz, um die negative Superspiralisierung zu induzieren, und entnimmt weiterhin regelmäßig Proben wie beschrieben.

Die Ansätze werden schließlich in eine 1%ige Agarose-Gelelektrophorese (Lauf ÜN bei 18 V und 4°C) eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass ein eingesetzter DNA-Marker aus linearen Fragmenten besteht, welche gegenüber ringförmigen Plasmiden ein deutlich abweichendes Laufverhalten zeigen. Ein Standard erlaubt also nur eine ungefähre Größenabschätzung und ist daher im Prinzip auch entbehrlich. Die Ansätze sollten ein leiterförmiges Bandenmuster auf dem Gel ergeben, wobei jede Einzelbande eine Spiralisierungsstufe darstellt und somit einer bestimmten Windungszahl L (siehe 1.1.3) zugeschrieben werden kann. Superspiralisierte (d. h. kompakte) Moleküle wandern am schnellsten durch das

Agarosegel, während relaxierte Plasmide sperriger und somit retardiert sind. Plasmide mit einem Einzelstrangbruch liegen grundsätzlich entspannt vor und laufen etwa genauso langsam wie völlig relaxierte Plasmide ohne Bruchstelle.

Eine Gyrase-Präparation gilt dann als aktiv, wenn sie sowohl die ATP-unabhängige Relaxierung als auch die ATP-abhängige Superspiralisierung ausführt. Zum einfachen Nachweis der Aktivität von markierten oder unmarkierten Gyrase-Mutanten wird ein Schnelltest ausgeführt: Der obige Testansatz (mit der mutierten Untereinheit und dem Wildtyp der jeweils anderen Untereinheit) wird 2 h bei 37°C inkubiert (Relaxierungstest), anschließend mit 1,5 mM ATP vermischt und für weitere 10 min bei der gleichen Temperatur belassen (Spiralisierungstest). Zwei Aliquots aus dem Ansatz (direkt vor der ATP-Zugabe und 10 min später) werden, wie oben beschrieben, auf das Agarosegel aufgetragen. Zur besseren Beurteilung der Aktivität der Mutante sollte ein Wildtyp-Kontrolltest mit GyrA WT und GyrB WT parallel ausgeführt werden, um die Relaxierungs- und Superspiralisierungsgeschwindigkeit vergleichen zu können.

3.4.2 Spaltung von Oligonukleotiden

Die Gyrase bildet im DNA-Substrat (G-DNA) einen um vier Basen versetzten Doppelstrangbruch, um die Transfer-DNA (T-DNA) hindurchzuleiten. Auch gebundene Oligonukleotide, v. a. mit einer spezifischen Konsensussequenz, werden daher geschnitten, was durch einen Spaltungstest mit anschließender Proteindenaturierung untersucht werden kann. 1 µM markierte oder unmarkierte dsDNA wird mit jeweils 3 µM GyrA und GyrB in An- oder Abwesenheit von 1,5 mM ATP je 10 min bei 37°C inkubiert, um die Spaltungsreaktion in Gang kommen zu lassen. Anschließend wird die DNA in den 10-µl-Ansätzen durch Zugabe von 1 µl Stopplösung (1:1-Mischung aus 10 % SDS und 0,5 M EDTA) vom Protein befreit. Die Proben sowie eine Referenz mit unbehandelter dsDNA werden nun auf ein 2%iges Agarosegel (30 min bei 160 V) aufgetragen. Wenn eine Spaltung der Oligo-DNA stattgefunden hat, sollten kleinere Fragmente sichtbar werden.

3.4.3 2D-Gelelektrophorese

Während man im eindimensionalen Aktivitätstest nur zwischen relaxierten und verdrillten Plasmiden unterscheiden kann, erlaubt ein zweidimensionaler Test (2D-Test) eine Aussage über das Vorzeichen der Superspiralisierung⁴. Die Probenvorbereitung, d. h. die DNA-Topoisomerisierung, erfolgt dabei genau wie beim Standardtest. Die mit Stopplösung und DNA-Probenpuffer versehenen Ansätze laufen zunächst in der ersten Dimension ÜN bei 4°C und 15 V in einem 1%igen Agarosegel, um die Plasmide nach Superspiralisierungsgraden zu trennen, wobei das Vorzeichen noch keine Rolle spielt. Ein dreifach

positiv und ein dreifach negativ superspiralisiertes Plasmid werden daher in der ersten Dimension ein identisches Laufverhalten zeigen. Das Agarosegel wird nun 90 min bei RT in 2D-Puffer gelagert, der 10 mg/l Chloroquin (siehe Abb. 9) enthält. Diese Verbindung interkaliert in negativ superspiralisierte DNA, wobei diese relaxiert bzw. positiv spiralisiert wird. Durch diese spezifische Bindung weisen negativ spiralisierte Plasmide in der zweiten Dimension ein retardiertes Laufverhalten gegenüber positiven Spezies auf, so dass man eine Aussage über das Vorzeichen der Verdrillung erhält. Das chloroquinierte Gel wird um 90° gedreht und 70 min bei RT einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Nach der EtBr-Färbung erhält man ein Bogenmuster, bei dem der linke Ast negativ und der rechte Ast positiv superspiralisierte Spezies anzeigt. Relaxierte Plasmide befinden sich oben in der Mitte des Musters, während Einzelstrangbruch-DNA einen separaten Fleck links oberhalb ergibt.

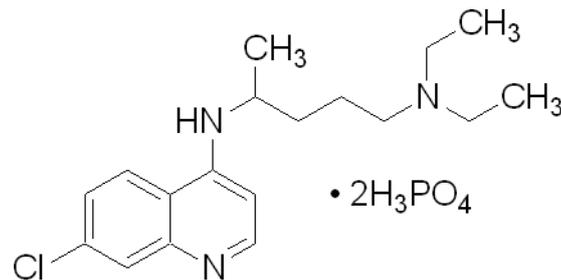
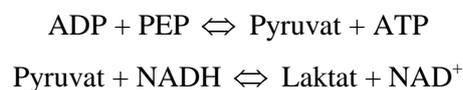


Abbildung 9: Chloroquin. Das Molekül interkaliert in negativ superspiralisierte Plasmide und kann in 2D-Aktivitätstests zur Unterscheidung zwischen positiven und negativen Superhelices eingesetzt werden. Quelle: Sigma-Aldrich

3.4.4 ssATPase-Test

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von GyrB kann ein gekoppelter *Steady-state*-ATPase-Test (ssATPase-Test) verwendet werden⁷⁴. Dieser beruht auf folgenden Reaktionen:



Das bei der ATPase-Reaktion entstehende ADP wird unter Bildung von Pyruvat rückphosphoryliert. Dieses Produkt ist in der Lage, NADH zu oxidieren, wobei die Absorption bei 340 nm abnimmt. Die beiden Reaktionen werden von den Enzymen Pyruvatkinase (PK) und Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert. Es ist zu beachten, dass ATP auch spontan hydrolysieren kann, so dass sich ein schwacher Hintergrundwert ergibt, der bei der Auswertung berücksichtigt werden muss. Der Ansatz besteht aus folgenden Komponenten, wobei die Konzentrationen von GyrA, GyrB, ATP und pUC18 bei Bedarf variiert werden können:

2,8 µl 10 mg/ml PK (Endkonzentration 37,3 µg/ml)
3,5 µl 5 mg/ml LDH (Endkonzentration 23,3 µg/ml)
5 mM ATP
100 nM GyrB
500 nM GyrA
25 nM pUC18
in ssATPase-Puffer (750 µl; siehe 2.5)

Der ATPase-Testpuffer und die Hilfsenzyme werden vorgelegt und nacheinander ATP, die Gyrase und das Plasmid in der gewünschten Menge hinzugefügt. Nach jeder Zugabe wird der Ansatz gemischt und der Verlauf der Absorption bei 340 nm und 37°C über einen Zeitraum von insgesamt maximal 90 min gemessen. Der Kontrollansatz zur Bestimmung der enzymunabhängigen Spontanhydrolyse enthält statt der Gyrase und pUC18 ATPase-Puffer bzw. H₂O. Als Referenz wird eine leere Küvette eingesetzt. Aus der negativen Steigung der A₃₄₀, die um die Nullkontrolle bereinigt wurde, kann mit dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$) die ATP-Spaltungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom jeweils modifizierten Faktor berechnet werden. Jedes umgesetzte NADH (Extinktionskoeffizient $\epsilon_{340} = 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) entspricht dabei der Hydrolyse eines ATP-Moleküls. Die Parameter wie z. B. die Maximalgeschwindigkeit v_{max} oder die Michaelis-Menten-Konstante K_M können unter Verwendung der im Anhang (7.1) beschriebenen Modelle aus den gemessenen ATPase-Kurven bestimmt werden.

Zum Vergleich mit Literaturdaten, in denen die ATPase-Aktivität der *E. coli*-Gyrase unter Verwendung von Oligo-DNA untersucht wurde, wurde der gekoppelte ssATPase-Test modifiziert. In diesem Fall sah der Ansatz folgendermaßen aus:

2,8 µl 10 mg/ml PK (Endkonzentration 37,3 µg/ml)
3,5 µl 5 mg/ml LDH (Endkonzentration 23,3 µg/ml)
0 – 3 mM ATP
650 nM GyrB
650 nM GyrA
0 – 5 µM 60-bp-dsDNA
in modifiziertem ssATPase-Puffer (750 µl; siehe 2.5)

3.4.5 stATPase-Test

Beim ssATPase-Test ist zu beachten, dass er lediglich eine apparente ATP-Hydrolyserate angibt, da die ermittelte Geschwindigkeit neben der Substratspaltung auch weitere Vorgänge aus dem Nukleotidzyklus

beinhaltet. Dazu zählen Reaktionen wie die Bindung des Nukleotids an das Enzym oder die Dissoziation der Reaktionspartner ADP und Phosphat. Die ssATPase-Ratenkonstante gibt also nur eine Untergrenze für den tatsächlichen ATPase-Wert an. Die reale ATPase-Geschwindigkeit kann dagegen in einem *single-turnover*-ATPase-Test (stATPase-Test) gemessen werden. Im Gegensatz zum ssATPase-Test liegt hier die Gyrase in einem Überschuss gegenüber dem Substrat vor, so dass jedes Enzym nur eine einzige Spaltung durchführt und für die weitere Messung nicht mehr den vollständigen Nukleotidzyklus durchlaufen muss. 30 μl 250 μM GyrB werden bei RT zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 200 μM ATP gemischt (statt ATP können auch Tests mit modifizierten Nukleotidanaloga durchgeführt werden). Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 2 μl aus dem Ansatz entnommen und mit 1 μl 1 M HClO_4 vermischt, um die Reaktion zu stoppen. Perchlorsäure sorgt für eine sofortige irreversible Denaturierung des Proteins, ohne das Substrat zu hydrolysieren oder anderweitig zu beschädigen. Nach 1 min auf Eis wird die Probe mit 10 μl 3 M KAc neutralisiert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Ein Kontrollansatz, der nur aus 200 μM ATP (in 30 μl H_2O) besteht, wird analog behandelt.

Zur Analyse werden die Ansätze auf eine hydrophobe C_{18} -HPLC-Säule aufgetragen. Bei dieser Chromatographie, die aufgrund des hohen Gegendrucks mit dem Gerät *ÄKTA purifier* durchgeführt wird, wird das Nukleotidgemisch in die einzelnen Bestandteile ATP und ADP sowie eventuell AMP oder weitere Reaktionspartner getrennt. Die in Acetonitril gelagerte 5-ml-Säule wird vor der Benutzung gründlich mit Wasser und C_{18} -Puffer (100 mM Natriumphosphat; pH = 6,5) gespült. Zur Auftragung der Probe (10 μl) wird eine 100- μl -Schleife verwendet, die zuvor ebenfalls mit Wasser und Puffer gereinigt werden muss. Der Lauf hat eine Länge von 13 ml bei einem Druck von ca. 10 MPa, der bei einer Laufrate von 1 ml/min erreicht wird. Anschließend steht die Säule direkt zur nächsten Beladung bereit. Die C_{18} -Säule muss nach dem letzten Lauf zuerst mit Wasser und dann mit einem 1:1-Volumengemisch aus Wasser und Acetonitril gereinigt werden.

Zur Auswertung werden in jedem Lauf das ATP- und das ADP-Signal integriert und der prozentuale ATP-Anteil (c) an der Gesamtnukleotidmenge (ATP + ADP) bestimmt. Man erhält eine Hydrolysekurve, die ausgehend vom Startwert c_0 (aus dem proteinfreien Kontrollansatz) exponentiell fällt, so dass man die Ratenkonstante k_{hyd} durch Anpassung mit einer einfachen Exponentialgleichung bestimmen kann (1):

$$c = c_0 \cdot e^{-k_{\text{hyd}}t}$$

Falls nötig, kann zur Kurvenanpassung auch eine doppelte Exponentialgleichung mit zwei Hydrolysekonstanten k_1/k_2 und den dazugehörigen Amplituden A_1/A_2 verwendet werden (2):

$$c = c_0 \cdot (A_1 \cdot e^{-k_1t} + A_2 \cdot e^{-k_2t})$$

3.5 Bindung

3.5.1 Fluoreszenztitration

3.5.1.1 mantADP-Titration

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D (Gyrase/mantADP) kann eine Fluoreszenztitration mit dem ADP-Analogen mantADP⁷⁵ verwendet werden. MantADP (2'/3'-O-(N-Methyl-Anthraniloyl)-ADP; siehe Abb. 10) enthält an der Ribose in 2'- bzw. 3'-Stellung eine fluorophore Gruppe, die durch intramolekulare Umlagerung zwischen beiden Positionen dynamisch wechseln kann. Die Verbindung weist ein Absorptionsmaximum bei 360 nm auf und emittiert Photonen bei einem Maximum von ca. 440 nm. Die Fluoreszenzintensität von freiem mantADP nimmt etwa um den Faktor 2,3 zu, wenn sich das Molekül in die ATP-Bindetasche von Enzymen lagert. Dies kann ausgenutzt werden, um durch eine Titration von mantADP mit einer ATPase den K_D -Wert der beiden Partner zu ermitteln.

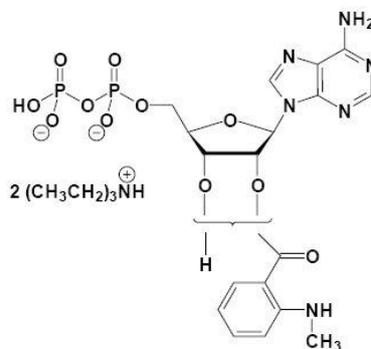


Abbildung 10: mantADP. Es handelt sich dabei um ADP, das eine Methyl-Anthraniloyl-Gruppe trägt, die dynamisch zwischen der 2'- und der 3'-OH-Gruppe der Ribose springt. MantADP emittiert nach einer Anregung bei 360 nm Fluoreszenz bei 440 nm. Deren Intensität erhöht sich um etwa den Faktor 2,3, wenn das Nucleotidanalogen an eine ATPase bindet. Quelle: Jena Bioscience

Am Anfang einer Titrationsreihe werden 100 μ l 5 μ M mantADP in Proteinpuffer in einer Quarzküvette vorgelegt. Nach dreiminütiger Äquilibrierung wird von der Probe bei $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm die Emission bei $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm über einen Zeitraum von 1 min hinweg alle 0,1 Sekunden gemessen. Ein Wasserbad sorgt dafür, dass die Temperatur im Küvettenraum konstant bei 25°C liegt. Als Anregungs- bzw. Emissionsbandbreite werden 5 nm bzw. 10 nm gewählt und die Integrationszeit beträgt 2 Sekunden. Es werden nun schrittweise geringe Proteinmengen zugegeben und jeweils nach 3 min die Aufzeichnung des Fluoreszenzverlaufs wiederholt. Damit sich die Konzentration von mantADP im Verlauf der Titration nicht ändert und somit der Verdünnungseffekt in der Auswertung nicht berücksichtigt werden muss, sollte das zugegebene Protein ebenfalls 5 μ M mantADP enthalten. Die Messreihe ist abgeschlossen, wenn die

Intensität der Fluoreszenz ein Plateau erreicht hat und sich nach mehreren ATPase-Zugaben nicht weiter ändert. Der gesuchte K_D -Wert (Protein/mantADP) kann mit dem im Anhang (7.2.2) beschriebenen Bindungsmodell aus der Titrationskurve bestimmt werden. Zusätzlich können vor der ersten und nach der letzten Proteinzugabe je ein Anregungs- (220 – 425 nm; $\lambda_{em} = 440$ nm) und ein Emissionsspektrum (365 – 500 nm; $\lambda_{ex} = 360$ nm) aufgenommen werden. Die Messungen erfolgen bei 25°C mit einer Geschwindigkeit von 60 nm/min, einer Integrationszeit von 0,5 s und einer Bandbreite von jeweils 5 nm.

3.5.1.2 Einzelpunktmessung in Anwesenheit von DNA

Um die Bindungskonstante von Protein und Nukleotid in Anwesenheit von DNA zu bestimmen, werden sehr große pUC18-Mengen benötigt. Damit sichergestellt ist, dass ein Großteil der Gyrase-Moleküle während der Titration Zugang zu einem Plasmid hat, sollte ein äquimolares Protein-DNA-Verhältnis vorliegen. Mit der oben beschriebenen mantADP-Titrationsmethode würde die Erfassung einer 1:1-Mischung aus Gyrase und pUC18 im μM -Bereich zu einem enormen DNA-Verbrauch führen. Deshalb wird die K_D -Bestimmung in Anwesenheit von DNA in einem Mikrotiterfluorimeter unter Verwendung einer schwarzen 384-Felder-Platte durchgeführt. Je 5 μM mantADP in Proteinpuffer werden mit 0 – 34 μM Gyrase und einer entsprechenden Menge an pUC18 in verschiedene Felder der Mikrotiterplatte gefüllt. Das Protein-DNA-Verhältnis ist bis zu einer Konzentration von etwa 9 μM äquimolar, während bei einer höheren Gyrase-Menge konstant 10 μM pUC18 eingesetzt werden, um eine Gelbildung zu vermeiden. Es werden acht einzelne Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen gemessen, die ein Volumen von jeweils 10 μl haben. Die Proben werden bei $\lambda_{ex} = 360$ nm bestrahlt und die Fluoreszenz bei 25°C unter Verwendung eines entsprechenden Sperrfilters ($\lambda_{em} > 435$ nm) bestimmt. Der gesuchte K_D -Wert von Protein und Nukleotid in Anwesenheit von DNA wird wie bei der einfachen pUC18-freien mantADP-Titration unter Verwendung des im Anhang (7.2.2) beschriebenen Bindungsmodells ermittelt.

3.5.1.3 Verdrängungstitration

Wegen der Methyl-Anthraniloyl-Gruppe hat K_D (Gyrase/mantADP) nur eine begrenzte Aussagekraft über den K_D -Wert von ADP. Dennoch ist zu vermuten, dass die beiden Dissoziationskonstanten in der gleichen Größenordnung liegen. Experimentell kann der tatsächliche K_D -Wert des Nukleotids ADP durch eine Verdrängungstitration (Rücktitration) des Protein-mantADP-Komplexes mit einem ADP-Überschuss ermittelt werden. Dazu wird schrittweise ein geringes Volumen einer geeigneten Vorverdünnung von ADP in Proteinpuffer zur mantADP-ATPase-Lösung gegeben und jeweils unter den gleichen Bedingungen wie bei der Hintitration über einen Zeitraum von 1 min die Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = 360$ nm und $\lambda_{em} = 440$ nm aufgenommen. Die ADP-Lösung sollte zur Vermeidung eines Verdünnungseffektes 5 μM mantADP enthalten und wird bis zu einer Sättigungskonzentration von 500 – 2000 μM eingesetzt.

Der gesuchte K_D -Wert (Gyrase/ADP) lässt sich mit dem in 7.2.3 beschriebenen Bindungsmodell aus der Verdrängungskurve bestimmen. Statt mit ADP kann man auch eine Rücktitration mit ATP durchführen, allerdings ist hier zu beachten, dass dieses Nukleotid während der Titration zu ADP hydrolysiert, wodurch das Ergebnis beeinträchtigt wird.

3.5.2 Bindungskinetik

Die Kinetik einer Bindung kann, falls sie im Sekundenbereich abläuft, manuell gemessen werden. Das Protein wird in einer Küvette durch Pipettieren mit dem Substrat vermischt und in ein Fluorimeter eingesetzt, um eine Signaländerung zu messen, die auf der Wechselwirkung der beiden Partner beruht. Da dieser Vorgang (vom Mischen bis zum Klicken auf „Start“) je nach Geschicklichkeit des Forschers mindestens 10 s dauert, können auf diese Weise nur Bindungskinetiken mit einer entsprechend hohen Geschwindigkeitskonstante sinnvoll untersucht werden. Im vorliegenden Fall wurde ein vorgefertigter GyrB-mantADP-Komplex (10 μM Protein + 5 μM mantADP) in Proteinpuffer bei RT mit einem 1000fachen Überschuss an ADP (5 mM; Gesamtvolumen 130 μl) versetzt und daraufhin die zeitliche Änderung der Fluoreszenzemission ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) gemessen. Wie bei einer mantADP-Rücktitration ist damit zu rechnen, dass die Intensität um etwa den Faktor 2,3 abnimmt, da das gebundene Fluorophor durch den ADP-Überschuss von der ATPase verdrängt wird. Das gleiche Experiment kann auch invertiert ausgeführt werden, d. h. man misst, wie schnell die Fluoreszenz ansteigt, nachdem man einen Gyrase-ADP-Komplex mit einem Überschuss an mantADP versetzt hat.

Eine wesentlich aussagekräftigere Messung einer Bindungskinetik ist mit einer *Stopped-Flow*-Apparatur möglich. Ein solches Gerät besteht aus zwei Spritzen A und B, in die jeweils 2 ml der Startlösungen gefüllt werden (A: 10 μM GyrB + 5 μM mantADP; B: 5 mM ADP; jeweils in Proteinpuffer). Nachdem diese zum Zeitpunkt $t = 0$ ihren Inhalt in einer Reaktionskammer vereinigen, wird automatisch direkt mit der Messung der Signaländerung begonnen. Die Totzeit liegt bei diesem Verfahren bei wenigen ms, d. h. etwa drei Größenordnungen niedriger als bei der manuellen Methode. Gemessen wird die zeitliche Emissionsänderung ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) unter Verwendung eines Sperrfilters ($\lambda_{\text{em}} > 435 \text{ nm}$) bei $T = 25^\circ\text{C}$. Da für einen einzelnen Test nur etwa 100 μl aus beiden Spritzen benötigt werden, ist es möglich, dieselbe Messung bis zu 20mal in Folge auszuführen. Anschließend kann aus allen Einzelaufzeichnungen eine gemittelte Gesamtkurve erstellt und mit einer einfachen Exponentialgleichung angepasst werden (1):

$$F = A \cdot e^{-kt} + F_0$$

Dabei stehen F für die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit, F_0 für die Fluoreszenz von freiem mantADP, k für die gesuchte Geschwindigkeitskonstante (in s^{-1}) und A für die Amplitude der

Signaländerung. Die Halbwertszeit der Bindung $t_{1/2}$ (in s) ist definiert als der Quotient aus $\ln(2)$ und k . Die Qualität der Kurvenanpassung kann durch eine Auftragung der Differenz zwischen der Mess- und der Fitkurve gegenüber der Zeit beurteilt werden. Falls die gemessene Kurve sich durch eine einfache Exponentialfunktion nicht zufriedenstellend beschreiben lässt, ist damit zu rechnen, dass die Dissoziation über mehrere Zwischenstufen mit unterschiedlichen Ratenkonstanten verläuft. In diesem Fall muss eine doppelt- oder höher exponentielle Fitgleichung verwendet werden (2):

$$F = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + A_2 \cdot e^{-k_2 t} + (\dots +) F_0$$

3.5.3 Anisotropie

Eine sehr leistungsfähige Methode, um die Bindung zweier Moleküle zu erfassen, ist die Messung der Anisotropie in einem Fluorimeter, das mit Polarisatoren ausgerüstet ist. Ein monochromatischer Lichtstrahl, der durch einen Polarisator A ausgerichtet wurde, trifft auf die Probenlösung in einer Küvette und regt diese zur Fluoreszenz an. Das emittierte Licht ist gleichfalls polarisiert und wird durch einen zweiten Polarisator B (Analysator) zum Detektor geleitet. Die Polarisationsachse von B wird dabei einerseits parallel und andererseits im 90° -Winkel (senkrecht) zu A angeordnet, so dass man zwei Intensitäten I_p und I_s erhält. Die Anisotropie r der Probe ist dann folgendermaßen definiert (1):

$$r = \frac{I_p - I_s}{I_p + 2I_s}$$

Bei einem starren Molekül, das sich während der Messung nicht bewegt, entspricht das emittierte Licht der Polarisationsachse von A. Es ist daher nicht in der Lage, den um 90° gedrehten B-Filter zu passieren. Gelöste Fluorophore können sich dagegen abhängig von ihrer Form und Größe mehr oder weniger schnell um ihre Achse drehen, d. h. die emittierten Photonen werden eine andere Polarisation aufweisen als das eingestrahlte Licht. Im Laufe der Lebenszeit des angeregten Zustandes (im ns-Bereich) wird sich daher ein bestimmter Teil der Moleküle so weit gedreht haben, dass sie Photonen senkrecht zur Ebene des eingestrahlt Lichts emittieren. Diese können dann durch den ebenso senkrecht zu A angeordneten B-Filter treten. Je kleiner und wendiger das Molekül ist, desto schneller rotiert es während der Lebenszeit des angeregten Zustandes und desto kleiner ist r . Folglich wird sich die Anisotropie eines Fluorophors erhöhen, wenn es an ein anderes Molekül bindet und die Rotationsgeschwindigkeit daher abnimmt. Dabei ist zu beachten, dass auch die Form des Objekts eine wichtige Rolle bei der Drehung spielt. Ein größeres kugelförmiges Molekül kann durchaus eine geringere Anisotropie haben als ein etwas kleineres, aber dafür längliches bzw. sperriges Teilchen. Die Messung von r erlaubt eine schnelle Aussage darüber, ob ein Fluorophor nach Zugabe eines anderen Stoffes eine Bindung mit diesem eingeht. Bei einer Interaktion

kann ähnlich wie bei mantADP-Messreihen durch eine geeignete Anisotropietitration der K_D -Wert der beiden Bindungspartner bestimmt werden.

130 μl einer teilweise mit dem Fluorophor Alexa488 einfachmarkierten GyrB-Mutante (GyrB C414S; siehe 4.4.3) werden in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0,3 μM ; 1 μM ; 5 μM bzw. 15 μM in Proteinpuffer) in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt. Die Lösung wird durch Mischen von markiertem und unmarkiertem GyrB C414S so eingestellt, dass trotz der unterschiedlichen Gyrasemenge die Konzentration des gekoppelten Farbstoffs in jedem Fall 100 nM beträgt. Anschließend wird das Protein bei 25°C solange mit GyrA WT titriert, bis eine Sättigung der Anisotropie erkennbar ist. Diese wird bei $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ (Bandbreite je 6 nm) alle 18 s über einen Zeitraum von 120 s hinweg gemessen (Integrationszeit: 4 s). Die Titrationslösung enthält ebenfalls markiertes GyrB in derselben Konzentration wie oben beschrieben, so dass diese während der Messung unverändert bleibt. Aus den vier Titrationskurven können unter Verwendung des im Anhang (7.3.2) beschriebenen globalen Modells die Bindungskonstanten K_{D1} (GyrA₂/GyrB) und K_{D2} (GyrA₂GyrB/GyrB) bestimmt werden. Nach dem Ende der 0,3- μM -GyrB-Hintitration wird eine Rücktitration mit unmarkiertem GyrB WT (0 – 12 μM) unter den gleichen Bedingungen wie oben durchgeführt. Die zugegebene Lösung enthält neben GyrB WT auch teilweise markiertes GyrB C414S und GyrA WT, um deren Konzentrationen nicht mehr zu verändern. Die Titrationskurve kann mit dem im Anhang (7.3.3) beschriebenen Verdrängungsmodell analysiert werden. Dies erlaubt eine Aussage darüber, ob sich die mit Alexa488 markierte GyrB-Mutante genauso verhält wie der unmarkierte Wildtyp von GyrB, was die Bildung der tetrameren Gyrase betrifft.

Der K_D -Wert des GyrA-DNA-Komplexes lässt sich ebenfalls durch eine Anisotropietitration bestimmen. 100 nM eines am 5'-Ende mit 5-FAM markierten 94-bp-dsDNA-Substrats mit einer spezifischen Gyrase-Bindestelle (130 μl ; siehe 2.7) werden in Proteinpuffer mit GyrA WT bis zu einer Konzentration von etwa 27 μM titriert. In der Titrationslösung sind 100 nM des markierten Substrats enthalten, um dessen Konzentration während der Messung konstant zu halten. Die Anisotropie wird bei $\lambda_{\text{em}} = 495 \text{ nm}$ (Bandbreite 5 nm) bzw. $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ (10 nm) bestimmt, während alle anderen Parameter wie oben beschrieben eingestellt werden. Die Bestimmung des gesuchten K_D -wertes (GyrA/DNA) wird im Anhang (7.3.1) erklärt.

3.5.4 GEMSA

Die Affinität von Gyrase zu DNA kann mit GEMSA (*Gel electrophoretic mobility shift assay*) untersucht werden. Bei einem solchen Gelverschiebungstest nutzt man die Tatsache aus, dass DNA wegen der Massenzunahme in einem Agarosegel langsamer wandert, nachdem sie an ein Protein gebunden hat. Durch eine Versuchsreihe mit gleicher Plasmid- und variabler Proteinkonzentration kann auf diese Art

die Größenordnung der Bindungskonstante zwischen Enzym und Substrat ermittelt werden. Je 15 nM pUC18, das zur Vermeidung eines Bandenmusters im Gel mit EcoRI linearisiert wurde (3.3.4), werden mit 0 – 10 µM GyrA 10 min bei RT inkubiert, um die Bildung von Protein-DNA-Komplexen zu ermöglichen. Alternativ kann ein 94-bp-Substrat (328 nM) mit einer spezifischen Gyrasebindestelle in einer ähnlichen Konzentration – bezogen auf Basenpaaren – verwendet werden (siehe 2.7). Die Ansätze werden anschließend auf ein 1%iges (für pUC18) bzw. 2%iges Agarosegel (für das 94-bp-Substrat) aufgetragen und 90 min einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Für die Auswertung wird manuell (oder automatisch) abgeschätzt, wie hoch der prozentuale Anteil der gebundenen (retardierten) DNA in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration ist. Hier liegt eine Unsicherheitsquelle vor, da diese Abschätzung besonders bei auftretendem DNA-Schmier nur eingeschränkt verlässlich ist. Aus dem Prozentsatz lässt sich die Menge des Protein-Substrat-Komplexes [ES] berechnen. Zur Ermittlung der Bindungskonstante K_D wird folgende Formel angewendet (1):

$$[ES] = \frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2}\right)^2 - [E]_0 \cdot [S]_0}$$

Diese Gleichung, die im Anhang (7.2.1) hergeleitet wird, beruht auf der Annahme, dass eine 1:1-Bindung zwischen dem Substrat und dem Enzym vorliegt. Es ist jedoch zu vermuten, dass das 2686-bp-Plasmid pUC18 und möglicherweise auch die 94-bp-dsDNA zwei oder mehrere Enzymmoleküle gleichzeitig binden können. Die ermittelte Bindungskonstante kann somit nur die Größenordnung des apparenten K_D -Wertes angeben. $[E]_0$ und $[S]_0$ sind für jeden Ansatz die eingesetzten Konzentrationen des Enzyms bzw. des Substrats in nM. Eine Auftragung von [ES] gegenüber der variablen Enzymkonzentration $[E]_0$ bei konstanter DNA-Konzentration $[S]_0$ sollte theoretisch eine Sättigungskurve ergeben, sofern keine Mehrfachbindung auftritt.

3.5.5 Analytische Größenausschlusschromatographie

Die Methode der analytischen Größenausschlusschromatographie kann dazu verwendet werden, um Bindungseigenschaften von Molekülen zu untersuchen. Bilden zwei Substanzen bei der Mischung einen Komplex, so läuft das Dimer während einer solchen Chromatographie wegen des größeren Molekulargewichtes schneller als die beiden Komponenten allein. Die Trennung unterschiedlich großer Moleküle durch die verwendete Säule S200 HR 10/30 (24 ml) läuft auf die gleiche Art ab wie bei der 120-ml-Säule, die für die Reinigung von Proteinlösungen verwendet wird (3.2.3.5). Für einen Lauf über eine 10/30-Säule ist allerdings ein deutlich höherer Druck erforderlich, der nicht mit einer ÄKTA *prime*, sondern nur mit der größeren *purifier*-Anlage geleistet werden kann. Die Säule wird vor der Benutzung mit jeweils zwei Säulenvolumen (ca. 50 ml) Wasser und S200-Puffer gespült. Zur Auftragung der Probe

(100 µl) wird eine 100-µl-Schleife verwendet, die zuvor ebenfalls mit Wasser und Puffer gereinigt werden muss. Der Lauf hat eine Länge von 30 ml bei einem maximal einsetzbaren Druck von 1,5 MPa, der bei der Laufrate von etwa 0,6 ml/min erreicht wird. Anschließend steht die Säule bei Bedarf zur nächsten Beladung bereit. Nach dem letzten Lauf muss sie gründlich mit Wasser und 20 % EtOH gereinigt und danach bei 4°C gelagert werden.

Während der Chromatographie kann über die Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt werden, welches Laufverhalten die verschiedenen Komponenten in der Probe aufweisen. Zur Auswertung wird deren Elutionsvolumen mit den Ergebnissen aus einem Kalibrierungslauf verglichen, bei dem eine Mischung mehrerer globulärer Proteine mit bekanntem Molekulargewicht auf die Säule aufgetragen wurde. Dieser Lauf ergibt bei logarithmischer Auftragung der Masse M gegen das Elutionsvolumen V_E eine Gerade, von der man die gesuchte Masse der einzelnen Komponenten in der Probe ablesen kann. Die bei den vorliegenden Messungen verwendete Kalibrierungsgerade ist folgendermaßen definiert (1):

$$\ln(M) = 18,049 - 0,5264 \cdot V_E$$

Je größer ein Protein, desto eher wird es zum Detektor gelangen – allerdings ist zu beachten, dass auch seine Form eine Rolle im Laufverhalten spielt. Längliche Proteine, die stark von der idealen Kugelform abweichen, kommen während des Säulenlaufs im Vergleich zu gleich schweren kugelförmigen Objekten unterschiedlich schnell voran. Die analytische Größenausschlusschromatographie erlaubt daher nur eine Abschätzung des Molekulargewichts einer Probe.

3.5.6 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) wird eine Probe mit sehr hoher Geschwindigkeit (maximal 100000 Upm bzw. 10^6 g) in einer Vakuumkammer rotiert. Proteine oder andere Makromoleküle in der Probenlösung wandern daher je nach Größe und Form mehr oder weniger schnell vom Meniskus zum Boden der Messzelle. Ein optisches Detektionssystem misst in Echtzeit während der Drehung die Absorption bei 280 nm von der Lösung in Abhängigkeit von der Laufweite. Dazu wird synchron die Absorption in einer Referenzzelle gemessen, die lediglich AUZ-Puffer enthält. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Ultrazentrifugationsexperimente wurden von Ariel Lustig (Universität Basel) ausgeführt und ausgewertet. Bei den Proben handelt es sich entweder um reines GyrA in unterschiedlichen Konzentrationen oder um Mischungen aus beiden Untereinheiten der Gyrase in AUZ-Puffer.

Mit einer analytischen Ultrazentrifuge können zwei unterschiedliche Messungen durchgeführt werden: Einerseits kann bei hoher Drehzahl die Sedimentationsgeschwindigkeit einer Probe (in Svedberg-

Einheiten) gemessen werden, die von der Größe und der Form eines Moleküls abhängt. Dieses Experiment liefert eine Aussage darüber, wie viele verschiedene Komponenten in der Lösung enthalten sind. Zum anderen kann bei einer relativ niedrigen Drehgeschwindigkeit (je nach Masse ca. 5000 – 12000 Upm \ddot{U} N) ein Sedimentationsgleichgewichtsexperiment ausgeführt werden, in dem die Proteine einem Gleichgewicht aus Sedimentation zum Boden sowie Diffusion in die entgegengesetzte Richtung ausgesetzt sind. Da die molekulare Form beide Prozesse gleichermaßen beeinflusst, hängt die Gleichgewichtsposition in der Messzelle allein vom Gewicht des Proteins bzw. des Komplexes ab. Die AUZ ist daher eine sehr exakte Methode zur Größenbestimmung und liefert genauere Werte als die analytische Gelfiltration, bei der die Form eines Objekts den Lauf entscheidend beeinflussen kann. Allerdings wird die Auswertung einer AUZ-Messung umso komplexer, je mehr Komponenten in der Lösung enthalten sind.

3.6 Fluoreszenzmarkierung

3.6.1 Auswahl geeigneter Positionen

Die Gyrase wird im Rahmen dieser Arbeit an den vier verschiedenen Regionen C-Tor, N-Tor und DNA-Tor sowie der C-terminalen Domäne (CTD) von GyrA mit FRET-Messungen untersucht. Dazu muss das Enzym an verschiedenen interessanten Stellen jeweils mit einem Donor- sowie einem Akzeptorfarbstoff gekoppelt werden. Dies geschieht über die SH-Gruppen von Cysteinen, die durch PCR-Mutagenese an den entsprechenden Stellen in die Proteinsequenz eingeführt wurden. Die insgesamt drei nativen Cysteine der Gyrase müssen zuvor durch geeignete andere Aminosäuren ersetzt werden, damit an diese Stellen keine Farbstoffe mehr binden können. In jeder Region werden anschließend jeweils mehrere Aminosäuren für einen Austausch durch Cystein ausgewählt, die im Vergleich zu den homologen Sequenzen der *E. coli*-Gyrase und der Topoisomerase II aus Hefe nicht als hoch-konserviert erscheinen. Außerdem sollte die 3D-Struktur des Proteins darauf hindeuten, dass die gewählten Positionen an der Peripherie liegen, damit die Zugänglichkeit für die Farbstoffe während der Markierung gewährleistet ist. Da die Gyrase aus *B. subtilis* noch nicht durch das Verfahren der Röntgenkristallographie strukturell aufgeklärt ist, wurde mit seiner Aminosäuresequenz sowie der bekannten 3D-Struktur des verwandten *E. coli*-Enzyms⁶⁻⁸ ein Homologiemodell angefertigt. Dabei wird von einem Computerprogramm eine wahrscheinliche (d. h. energieoptimierte) dreidimensionale Struktur der *Bacillus*-Gyrase errechnet, die sich aus der bekannten *Escherichia*-Struktur durch eine Betrachtung der Sequenzunterschiede ergibt. Das Homologiemodell ist eine brauchbare Grundlage für die Suche nach zugänglichen Positionen für die Markierung. Wenn diese Kriterien berücksichtigt werden, kann erwartet werden, dass zumindest einige der gewählten Positionen in jeder Region nach einer Einfachmutation durch Cystein ein aktives und für Farbstoffe zugängliches Protein ergeben. Im GyrA-Dimer liegen dann bereits zwei gleichwertige

Cysteine für eine statistische Doppelmarkierung vor, nachdem die GyrA-Sequenz nur einmal mutiert wurde. Der Abstand der beiden Cysteine im Dimer sollte idealerweise zwischen 2,5 und 7,5 nm liegen, damit ein Förster-Transfer zwischen den gekoppelten Fluorophoren erfolgen kann und bei Zugabe eines Substrats eine Konformationsdynamik, d. h. eine Änderung der FRET-Effizienz, erkennbar wird.

3.6.2 Statistische Doppelmarkierung

Für FRET-Messungen ist es erforderlich, cysteinhaltige Proteine kovalent mit geeigneten Fluorophoren zu verknüpfen. Um einen intramolekularen Förster-Transfer zu erhalten, muss sich sowohl ein Donor- als auch ein Akzeptorfarbstoff am Protein befinden. Die Gyrase-Untereinheit GyrA, die in Abwesenheit von GyrB ein Dimer GyrA_2 bildet, wird hierfür statistisch doppelmarkiert. Dazu werden zuerst beide Farbstoffe in einem bestimmten Verhältnis gemischt und anschließend mit GyrA_2 , das zwei gleichwertige Cysteine enthält, vereinigt. Je nach Mischungsverhältnis erhält man daraufhin Protein mit einem unterschiedlichen Anteil an gekoppeltem Donor und Akzeptor (Kopplungsverhältnis). Allerdings lässt es sich bei dieser Methode nicht vermeiden, dass manche Proteine mit einer der beiden Farbstoffsorten doppelt verknüpft werden (Protein-Donor-Donor bzw. Protein-Akzeptor-Akzeptor). Um eine möglichst vollständige Kopplung aller freien Cysteine mit Fluoreszenzfarbstoffen zu erreichen, verwendet man bei der Markierung eine fünffach höhere Menge an Farbstoff im Vergleich zum Protein.

Zuvor ist es jedoch erforderlich, β -Mercaptoethanol aus der Probe zu entfernen, da auch dieses eine SH-Gruppe enthält und somit in der Lage wäre, mit den Farbstoffen zu reagieren. Dazu werden etwa 100 μl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 30 – 60 μM mit einer NAP-5-Säule gereinigt. Dabei handelt es sich um eine 5-ml-Größenausschlussäule, mit der das große GyrA vom vergleichsweise kleinen Molekül β -Mercaptoethanol effizient getrennt werden kann. Das Protein wird auf die Säule pipettiert, die zuvor mit H_2O und 3 Volumina Puffer ohne β -Mercaptoethanol (Markierungspuffer) gespült wurde. Anschließend gibt man die Differenz von 500 μl an Puffer zu, d. h. bei 100 μl Probenvolumen sind 400 μl erforderlich. Das Protein kann nun von der Säule entfernt werden, indem man 600 μl Markierungspuffer zugibt und gleichzeitig das Eluat in einem Eppendorf-Gefäß auffängt. Nachdem die Säule gut, d. h. mit einer Menge von mindestens 3 – 4 Volumina, mit H_2O und Puffer gespült wurde, steht sie für eine neue Beladung bereit. Sie kann bei 4°C in 20 % EtOH einige Wochen lang aufbewahrt werden.

Das Eluat mit einem Volumen von 1 ml enthält etwa 95 – 99 % der zu Beginn eingesetzten Menge an Protein. Dieses liegt nun mercaptoethanolfrei vor und sollte daher unmittelbar zur Markierung weiterverwendet werden, damit die SH-Gruppen nicht mit der Zeit oxidieren. Zur einfacheren Handhabung wird das Protein mit einem 500- μl -*Vivaspin*-Röhrchen mit einem Ausschlussgewicht von 10

kDa bei 13000 Upm (Biofuge) auf ein Volumen von etwa 100 μ l eingengt, um annähernd die Ausgangskonzentration zu erhalten. Da Protein mit gekoppeltem Farbstoff die Eigenschaft hat, irreversibel an die *Vivaspin*-Membran zu binden, darf es mit solchen Filterröhrchen ausschließlich vor der Markierung konzentriert werden.

Die Farbstoffe werden aufgrund der besseren Löslichkeit nicht in Puffer, sondern in DMSO aufbewahrt, was auch zu einer längeren Haltbarkeit beiträgt. Bei -20°C sowie ständiger Abschirmung von Licht ist es möglich, TMR und Alexa488 mehrere Wochen lang zu lagern, bevor die Maleimidgruppen langsam irreversibel ihre Reaktivität verlieren. Die gelösten Farbstoffe werden im gewünschten Verhältnis zusammengeführt, so dass ihre gesamte Stoffmenge fünfmal so hoch ist wie diejenige des Proteins. Dieses wird nun dazugegeben und der Ansatz 20 – 60 min bei RT inkubiert. Die Reaktionszeit kann alternativ im Rahmen einer kinetischen Reihe im Bereich von 1 min bis ∞ variiert werden, um für einzelne – unterschiedlich gut zugängliche – Cysteinmutanten die jeweils geeignetste Inkubationsdauer zu ermitteln. Die Kopplung kann bei Bedarf durch Zugabe von 0,1 μ l β -Mercaptoethanol gestoppt werden, da dieses in hohem Überschuss vorliegt und sämtliche freien Farbstoffe, die noch in der Lösung vorliegen, abfängt. Zur Entfernung der freien Farbstoffe, die bei FRET-Messungen stören würden, sowie von β -Mercaptoethanol wird das Protein erneut mit einer NAP-5-Gelfiltrationssäule, wie bereits beschrieben, gereinigt. Bei der Elution der markierten Proteine werden diesmal jedoch nur 300 μ l Markierungspuffer eingesetzt, da freies Alexa488 schon wenig später im Eluat erscheinen würde. Als Auffanggefäße werden spezielle braun gefärbte 1-ml-Glasfläschchen verwendet, die dafür sorgen, dass die Probe lichtgeschützt ist. Außerdem wird sie auf diese Art nicht mit der Zeit durch fluoreszierende Weichmacher kontaminiert, die in der Regel in Plastikgefäßen enthalten sind. Da markierte Gyrase die Eigenschaft hat, nach einer Schockfrierung in flüssigem Stickstoff zum Teil irreversibel auszufallen, wird sie stattdessen nach der Markierung bei 4°C im Dunkeln gelagert und zeitnah für FRET-Messungen verwendet.

3.6.3 Einzelmarkierung

Für die Bestimmung des Förster-Abstands (3.7) und der smFRET-Korrekturfaktoren (3.9.4) wird eine GyrA-Mutante nur mit einem der beiden Farbstoffe einzelmarkiert. Man erhält dann die Verbindungen Protein-Donor und Protein-Akzeptor in zwei separaten Ansätzen. Gleiches gilt, wenn man die Untereinheit GyrB markieren möchte, die in Abwesenheit von GyrA monomer vorliegt. Eine Einzelmarkierung läuft genauso ab wie eine statistische Doppelmarkierung, nur mit dem Unterschied, dass das Protein mit einem fünffachen Überschuss von nur einem Farbstoff vermischt wird.

3.6.4 Analyse der Fluoreszenzmarkierung

Nachdem ein Protein mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt wurde, kann die Markierung spektroskopisch und durch PAGE unter denaturierenden Bedingungen untersucht werden⁷⁶. Ein Aliquot des Ansatzes wird mit 4 x SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95°C gekocht und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird gestoppt, bevor die blaue Laufmittelfront die Unterkante des Trenngels erreicht hat, damit eventuell vorhandener freier Farbstoff nicht aus dem Gel ausläuft. Dieses wird nach dem Ende der PAGE unter Verwendung eines *SYBR-Green*-Bandpassfilters in einer Dokuanlage fotografiert, um die Fluoreszenz der freien sowie der gekoppelten Farbstoffe zu untersuchen. Anschließend wird eine Coomassie-Färbung durchgeführt, um die Proteine in gewohnter Weise sichtbar zu machen. Das Fluoreszenzbild liefert die Information, ob die Farbstoffe lediglich in gekoppeltem Zustand oder auch in freier Form im Ansatz vorliegen. Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten aus beiden Fotos ist es darüber hinaus möglich, zu beurteilen, ab welchem Zeitpunkt in einer kinetischen Reihe die Markierung der SH-Gruppen beendet ist.

Nach der Markierung und der Entfernung von restlichen freien Farbstoffen kann ein Absorptionsspektrum von der Probe im Bereich von 230 – 700 nm aufgenommen werden. Daraus können die Konzentrationen des Donors Alexa488 ($\epsilon_{494} = 71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) sowie der Akzeptoren TMR ($\epsilon_{555} = 95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bzw. Alexa555 ($\epsilon_{556} = 158000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ermittelt werden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass TMR bzw. Alexa555 auch für einen kleinen Teil der A_{494} verantwortlich sind. Der Anteil von Alexa488 an der Absorption bei 494 nm – $A_{494}(\text{Alexa488})$ – ergibt sich aus dem Akzeptorspektrum (4.4.1) (1):

$$\text{TMR als Akzeptor:} \quad A_{494}(\text{Alexa488}) = A_{494} - 0,19 \cdot A_{555}$$

$$\text{Alexa555 als Akzeptor:} \quad A_{494}(\text{Alexa488}) = A_{494} - 0,21 \cdot A_{556}$$

Da alle Farbstoffe auch bei 280 nm eine gewisse Absorption aufweisen, muss ebenso ihr Anteil an der gesamten A_{280} herausgerechnet werden, bevor die Proteinkonzentration ermittelt werden kann. Der Proteinanteil an der Absorption bei 280 nm – $A_{280}(\text{P})$ – kann folgendermaßen bestimmt werden (2):

$$\text{TMR als Akzeptor:} \quad A_{280}(\text{P}) = A_{280} - 0,12 \cdot A_{494}(\text{Alexa488}) - 0,23 \cdot A_{555}$$

$$\text{Alexa555 als Akzeptor:} \quad A_{280}(\text{P}) = A_{280} - 0,12 \cdot A_{494}(\text{Alexa488}) - 0,08 \cdot A_{556}$$

Diese Gleichungen gelten auch im Falle von Einzelmarkierungen, bei denen nur einer der beiden Farbstoffe vorliegt. Der Akzeptorfarbstoff Alexa546 ($\epsilon_{554} = 93000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde nur zusammen mit GyrB in Einzelmarkierungen verwendet – der Proteinanteil an der A_{280} berechnet sich in diesem

speziellen Fall mit folgender Formel (3):

$$\text{Alexa546 als Akzeptor: } A_{280}(P) = A_{280} - 0,23 \cdot A_{554}$$

Aus dem Proteinanteil an der A_{280} kann bei bekanntem Extinktionskoeffizienten die vorliegende Proteinmenge, bezogen auf Monomereinheiten, berechnet werden, die im günstigsten Fall der Summe aus den Mengen an gekoppeltem Donor und Akzeptor entsprechen sollte. In der Regel ist die Markierung jedoch nicht vollständig, u. a. weil manche SH- bzw. Maleimidgruppen nicht mehr reaktiv sind. Deswegen erhält man neben den gewünschten doppelmarkierten Proteinen auch solche, die nur einzel- oder gar nicht markiert sind. Aus den gemessenen Konzentrationen des Proteins sowie der beiden Farbstoffe lassen sich unter Verwendung der folgenden Formeln die exakten Anteile aller im Ansatz enthaltenen Markierungskomponenten berechnen (4):

$$p_D = \frac{c_{\text{Donor}}}{c_{\text{Protein}}} \quad p_A = \frac{c_{\text{Akzeptor}}}{c_{\text{Protein}}} \quad p_0 = 1 - p_D - p_A$$

$$\text{Protein-Donor-Akzeptor (erwünscht): } p_{DA} = 2 \cdot p_D \cdot p_A$$

$$\text{Protein-Donor-Donor: } p_{DD} = p_D^2$$

$$\text{Protein-Akzeptor-Akzeptor: } p_{AA} = p_A^2$$

$$\text{Protein-Donor: } p_{D0} = 2 \cdot p_D \cdot p_0$$

$$\text{Protein-Akzeptor: } p_{A0} = 2 \cdot p_A \cdot p_0$$

$$\text{Unmarkiertes Protein: } p_{00} = p_0^2$$

Diese Formeln gelten nur für Doppelmarkierungen und nur unter der Annahme, dass beide Farbstoffe nicht aus sterischen Gründen eine der beiden Kopplungsstellen im Protein bevorzugen, sondern mit gleicher Wahrscheinlichkeit an beide binden. Da in GyrA₂ beide Cysteine an der gleichen Position auf zwei identischen Untereinheiten sind, darf von dieser Annahme ausgegangen werden. Ein Beispiel: Nach einer Doppelmarkierung von GyrA₂ mit Alexa488 und TMR werden die Konzentrationen $c_{\text{Protein}} = 2,49 \mu\text{M}$ (Monomere), $c_{\text{Alexa488}} = 0,49 \mu\text{M}$ und $c_{\text{TMR}} = 1,52 \mu\text{M}$ gemessen. Die Markierungseffizienzen für den Donor bzw. für den Akzeptor betragen daher 19,7 % ($p_D = 0,197$) und 61,0 % ($p_A = 0,610$), während 19,3 % aller SH-Gruppen unbesetzt sind ($p_0 = 0,193$). 24 % aller GyrA₂-Dimere sind also mit jeweils einem Donor- und einem Akzeptormolekül gekoppelt ($p_{DA} = 0,24$). Die Summe der Anteile aller sechs Markierungsspezies ergibt 1. Die gesamte Markierungseffizienz für beide Farbstoffe ist die Summe aus p_D und p_A (80,7 %), während der Quotient aus c_{Donor} und c_{Akzeptor} das Kopplungsverhältnis angibt (1:3,10).

3.7 Bestimmung des Förster-Abstands

3.7.1 Quantenausbeute

Die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors Φ_D gibt an, welcher Anteil des absorbierten Lichts in Form von Fluoreszenz wieder emittiert wird. Ein ideales Fluorophor hat demzufolge eine Quantenausbeute von 1, was jedoch in der Praxis nie erreicht wird. Stattdessen wird ein Teil der aufgenommenen Energie auf andere Weise, z. B. durch Wärme oder durch Übergang in den Triplett-Zustand, abgegeben. Die Quantenausbeute ist für ein bestimmtes Molekül charakteristisch, hängt jedoch von vielen Faktoren wie der Temperatur oder dem pH-Wert und im Fall von gekoppelten Farbstoffen von der molekularen Umgebung im Protein ab, so dass sie für jede markierte Mutante separat bestimmt werden sollte. Die Quantenausbeute ist folgendermaßen definiert⁷⁷ (1):

$$F = I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon c d}) \cdot \Phi$$

wobei F die emittierte Fluoreszenz, I_0 die eingestrahelte Lichtmenge, ε der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Lösung ist. Für verdünnte Lösungen, bei denen nur ein sehr kleiner Teil des eingestrahelten Lichts absorbiert wird, darf die Gleichung vereinfacht werden (2):

$$F \approx I_0 \cdot \ln 10 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot \Phi$$

Da die gesamte ausgestrahlte Fluoreszenz F in einem herkömmlichen Fluorimeter nicht messbar ist, wird die gemessene Donorintensität (F_D) mit der unter gleichen Bedingungen bestimmten Intensität einer Referenzsubstanz (F_R) mit bekannter Quantenausbeute verglichen. Es gilt (3):

$$\frac{F_D}{F_R} = \frac{I_0 \cdot \ln 10 \cdot \varepsilon_D \cdot c_D \cdot d \cdot \Phi_D}{I_0 \cdot \ln 10 \cdot \varepsilon_R \cdot c_R \cdot d \cdot \Phi_R} = \frac{E_D \cdot \Phi_D}{E_R \cdot \Phi_R} \quad \text{bzw.} \quad \Phi_D = \frac{F_D \cdot E_R \cdot \Phi_R}{F_R \cdot E_D}$$

Man muss daher lediglich die Extinktion E sowie die Fluoreszenz F von der Referenzsubstanz und vom Donor messen. Als Referenzlösung wird 10 nM Uranin (Na^+ -Fluorescein; $\varepsilon_{490} = 93000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 0,1 M NaOH eingesetzt, das nach Angaben des Herstellers bei einem pH-Wert im alkalischen Bereich eine stabile Quantenausbeute $\Phi_R = 0,93$ aufweist. Die Fluoreszenzintensitäten F_D und F_R werden durch die Messung zweier Emissionsspektren von jeweils 10 nM Donor bzw. Referenzlösung bei RT bestimmt. Für freies oder gekoppeltes Alexa488 gilt $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 465 - 700 \text{ nm}$, während für Uranin $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 - 700 \text{ nm}$ verwendet wird. Da die Quantenausbeute nicht von der

Anregungswellenlänge abhängt, ist es erlaubt, beide Substanzen mit einer unterschiedlichen Wellenlänge (455 nm bzw. 460 nm) zu bestrahlen. Die restlichen Parameter, d. h. die Temperatur (RT), die Integrationszeit (0,5 s) und die Bandbreite (jeweils 3 nm) sind identisch. F_D und F_R ergeben sich dann aus der Integration der beiden gemessenen Spektren im jeweiligen Wellenlängenintervall. Die Extinktionen E_D und E_R erhält man aus den Absorptionsspektren von der Donor- sowie von der Referenzlösung, die beide die gleiche Schichtdicke und Konzentration (zwischen 1 und 10 μM) aufweisen müssen. Aus den beiden Spektren kann man die jeweilige Extinktion bei derjenigen Anregungswellenlänge ablesen, mit der das entsprechende Emissionsspektrum aufgezeichnet wurde. E_D ist somit E_{460} aus dem Donorspektrum und E_R steht für E_{455} aus der Uraninmessung. Mit den experimentell ermittelten Werten lässt sich nun die gesuchte Quantenausbeute von Alexa488 (Φ_D) berechnen.

3.7.2 Überlappungsintegral

Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ gibt an, inwieweit sich das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Je mehr dies der Fall ist, desto bevorzugter läuft der Förster-Transfer ab und desto größer ist der Förster-Radius R_0 . $J(\lambda)$ besitzt die Einheit [$\text{nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] und wird durch folgendes Integral definiert⁵⁴ (1):

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda$$

Dabei steht $F_D(\lambda)$ für das normierte Donoremissionsspektrum und $\varepsilon_A(\lambda)$ für den Extinktionskoeffizienten des Akzeptors im betrachteten Wellenlängenintervall. Die Bestimmung von $\varepsilon_A(\lambda)$ erfolgt durch die Messung des Absorptionsspektrums des freien bzw. an ein Protein gekoppelten Akzeptors (1 – 10 μM). Dabei wird für TMR bzw. für Alexa555 der Bereich von 475 nm bis 620 nm betrachtet, da außerhalb dieses Abschnitts entweder keine nennenswerte Akzeptorabsorption oder keine Donoremission erfolgt. Bei Verwendung der bekannten Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{555} = 95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für TMR bzw. $\varepsilon_{556} = 158000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Alexa555 kann ε_A in Abhängigkeit von λ in 1-nm-Schritten berechnet werden. $F_D(\lambda)$ wird durch die Messung eines Emissionsspektrums von 10 nM freiem oder gekoppeltem Donor bei RT bestimmt. Als Parameter werden für Alexa488 $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 475 - 620 \text{ nm}$ bei einer Bandbreite von jeweils 3 nm, einer Schrittweite von 1 nm und einer Integrationszeit von 0,5 s verwendet. Das Spektrum wird über den verwendeten Wellenlängenbereich integriert und auf eine Gesamtfläche von 1 normiert. $J(\lambda)$ kann nun durch eine Summenbildung des Produkts $F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ berechnet werden.

3.7.3 Förster-Abstand

Der Förster-Abstand R_0 ist eine charakteristische Kenngröße für ein bestimmtes Donor-Akzeptor-Paar. Er gibt an, bei welchem Farbstoffabstand der Förster-Transfer vom Donor auf dem Akzeptor 50 % beträgt und wird durch folgende Formel definiert⁵⁴ (1):

$$R_0^6 = 8,785 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{\Phi_D \cdot \kappa^2 \cdot J(\lambda)}{n^4} [\text{Å}]$$

Dabei steht Φ_D für die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, κ^2 für den Orientierungsfaktor der Übergangsdipole, $J(\lambda)$ für das Überlappungsintegral sowie n für den Brechungsindex des umgebenden Mediums. Da die vier Parameter von der jeweiligen molekularen Umgebung der gebundenen Farbstoffe im Protein abhängen, sollte R_0 für jede markierte Mutante separat bestimmt werden. Der Orientierungsfaktor κ^2 ist eine schwer zu fassende Größe, die ein Maß für die gegenseitige Ausrichtung des Donors und des Akzeptors darstellt. Der Wert von κ^2 kann theoretisch zwischen 0 (senkrechte Orientierung) und 4 (parallele Orientierung) liegen, so dass im Extremfall jeglicher Förster-Transfer auch dann unterbunden wird, wenn der Abstand der beiden Farbstoffe gering ist. Unter der Annahme, dass die gekoppelten Farbstoffe an ihrer jeweiligen Position am Protein frei rotieren können, was aufgrund ihres Linkers anzunehmen ist, kann $\kappa^2 = 2/3$ gesetzt werden⁵⁹. Dies entspricht dem Orientierungsfaktor von freiem, d. h. beliebig rotierbarem Farbstoff. Als Brechungsindex n kann näherungsweise der Wert 1,33 für Wasser bzw. Puffer verwendet werden. Es ist allerdings zu beachten, dass der Energietransfer vom Donor zum Akzeptor je nach Farbstoffposition teilweise oder vollständig durch das Protein bzw. die DNA hindurch erfolgt, so dass der tatsächliche Brechungsindex einen höheren Wert annehmen kann. In der Literatur wird daher bisweilen ein empirischer Brechungsindex von 1,4 oder höher empfohlen⁷⁸. Diese Unsicherheit hat zur Folge, dass man Förster-Abstände niemals ganz exakt bestimmen kann.

3.8 Ensemble-FRET

3.8.1 ssFRET

Steady-State-FRET (ssFRET) in einem konventionellen Fluorimeter ist die einfachste Methode, um einen Förster-Transfer zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff zu messen. Dabei wird von einer donormarkierten Probe zuerst ein Emissionsspektrum aufgezeichnet und anschließend beobachtet, ob die Donorfluoreszenz nach der Zugabe von Akzeptor sinkt. Aus dem Ausmaß der Änderung kann die Effizienz des Energietransfers und damit der Abstand der beiden Farbstoffe berechnet werden. Die

Zugabe eines Liganden wie z. B. DNA oder ATP kann eine Konformationsänderung im Enzym auslösen und so die FRET-Effizienz und daher die Donoremission ändern. ssFRET ist eine Ensemblemethode, d. h. man erhält keine Einzelmoleküldaten, sondern nur den Durchschnitt der Konformationszustände aller Moleküle, die sich zum Zeitpunkt der Messung in der Küvette befinden. Alle ssFRET-Experimente werden bei 25°C mit den Parametern $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 - 700 \text{ nm}$, einer Bandbreite von je 4 nm sowie einer Integrationszeit von 0,1 s durchgeführt. Als Probe wird ein 60-bp-dsDNA-Fragment verwendet, bei dem der 5'-Strang mit dem Donor Alexa488 und der 3'-Strang mit dem Akzeptor Alexa555 verknüpft ist (siehe 2.7). Dieser Doppelstrang wurde zuvor durch eine Hitzebehandlung aus den beiden Einzelsträngen hergestellt (3.3.5). Es werden Emissionsspektren von folgenden Mischungen aufgezeichnet:

- (1) 100 nM ssDNA-Alexa488 (130 μl)
- (2) 100 nM ssDNA-Alexa555 (130 μl)
- (3) 100 nM dsDNA (doppelmarkiert; 130 μl)
- (4) Ansatz (3) + 5 μM GyrA WT
- (5) Ansatz (4) + 5 μM GyrB WT
- (6) Ansatz (5) + 2 mM ATP
- (7) Ansatz (3) + 5 μM GyrA WT + 5 μM GyrB WT + 2 mM AMPPNP

Für die Auswertung muss berücksichtigt werden, dass in den Messungen (4) – (7) ein Verdünnungseffekt durch die Zugabe von Enzym bzw. Ligand aufgetreten ist. Die Kurven (4) – (7) werden korrigiert, indem sie mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Messung (1) liefert das Emissionsspektrum des Donors in Abwesenheit des Akzeptors mit einem Maximum bei etwa 516 nm. Messung (2) ergibt das Akzeptoremissionsspektrum mit einem Maximum bei ca. 572 nm, das jedoch bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm sehr gering ausfällt. Durch einen Vergleich zwischen den Kurven (1) (Donor-ssDNA) und (3) (doppelmarkierte dsDNA) kann ermittelt werden, ob FRET stattfindet. Dies erkennt man daran, dass in (3) das Donorsignal (516 nm) niedriger und das Akzeptorsignal (572 nm) deutlich höher ist als in (1). Wenn dagegen das Donorsignal unverändert bleibt bzw. die Kurve (3) der Addition aus den Kurven (1) und (2) entspricht, so liegt kein Förster-Transfer vor. Um das Ausmaß der Donorintensität in jeder Messung zu bestimmen, werden alle korrigierten Kurven außer (2) zwischen 510 nm und 530 nm integriert. Dieser Wellenlängenbereich wurde gewählt, weil er weder Anregungstreulicht noch Akzeptoremission enthält. Die Intensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors (I_D) entspricht der Fläche unter der Kurve aus der Donor-ssDNA-Messung (1). Die Donorintensität in Anwesenheit des Akzeptors (I_{DA}) ergibt sich entsprechend aus der dsDNA-Kurve (3) bzw. aus den Kurven (4) – (7) nach Substratzugabe. Die FRET-Effizienz E_{FRET} ist durch folgende Gleichung definiert (1):

$$E_{FRET} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D}$$

Durch einen Vergleich der FRET-Effizienzen (4) – (7) mit der dsDNA-Effizienz (3) kann ermittelt werden, ob die Zugabe von Gyrase bzw. Nukleotid eine DNA-Konformationsänderung auslöst und sich somit der Abstand zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfarbstoff ändert.

3.8.2 Zeitaufgelöste Messungen

3.8.2.1 Aufbau

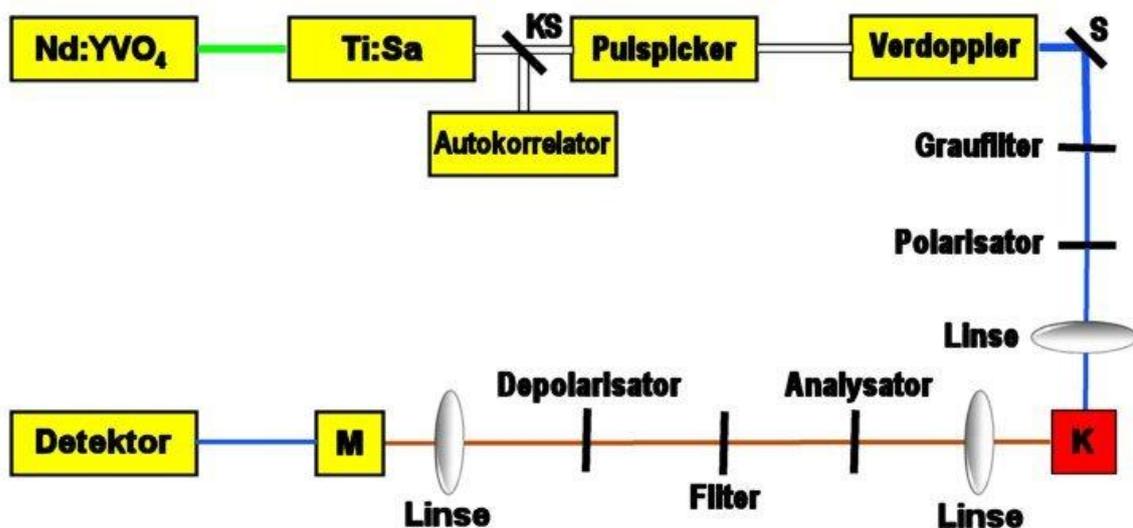


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ensemble-Aufbaus. Die einzelnen Komponenten sind im Text erklärt. Abkürzungen: KS = Klappspiegel, S = Spiegel, K = Küvettenhalter mit der Probe, M = Monochromator.

Der Ensemble-Aufbau ist schematisch in Abb. 11 und als Foto in Abb. 12 gezeigt. Die Komponenten zwischen dem Pumplaser und dem Frequenzverdoppler entsprechen denen im smFRET-Aufbau und sind in 3.9.1 beschrieben; allerdings ist nun ein Pulspicker zwischengeschaltet. Dieser befindet sich direkt hinter dem Ti:Sa-Laser und ist so eingestellt, dass er nur jeden zehnten Laserpuls passieren lässt, so dass sich eine Frequenz von 8 MHz ergibt. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Pulsen beträgt daher 125 ns. Das Laserlicht wird nach dem Verdoppler (1) und einem zunächst leeren Graufilterhalter (2) zum trFRET-Aufbau geleitet. Ein Klappspiegel (3), mit dem zwischen beiden Aufbauten umgeschaltet werden kann, muss daher umgeklappt werden. Nach einer Lochblende (zum Justieren; 4) erreicht der Strahl einen Polarisator (5) und wird von diesem auf eine Wellenebene reduziert. Das Licht wird von einer Linse mit einer Brennweite von 75 mm (6) gebündelt und regt daraufhin die zu messende Probe an, die sich in einer Fluoreszenzquarküvette im Küvettenhalter (7) befindet. Der Teil der emittierten

Fluoreszenz, der die Küvette im 90° -Winkel verlässt, wird von einer weiteren 75-mm-Linse (8) gesammelt. Es folgt der zweite Polarisator (Analysator) (9), der von einem Motor (10) je nach Messung in einem bestimmten Winkel zwischen 0° und 90° zur Ebene des ersten Polarisators eingestellt wird. Bei Bedarf kann ein weiterer Filterhalter (11) für Grau- oder Gelbfilter in den Aufbau eingesetzt werden. Der Strahl wird von einem Depolarisator (12) randomisiert und von einer 75-mm-Linse (13) in den Monochromator (14) gebündelt. Dieser lässt nur das Licht mit einer bestimmten Wellenlänge passieren, die an einem Drehrad eingestellt werden kann. Schließlich folgt ein *Photomultiplier* (15), der von einem Elektronikbauteil gesteuert wird und der den ankommenden Strahl detektiert. Die Randomisierung des Strahls durch den Depolarisator ist notwendig, da die Detektionseffizienz von der Polarisationssebene des einfallenden Lichts abhängig ist.

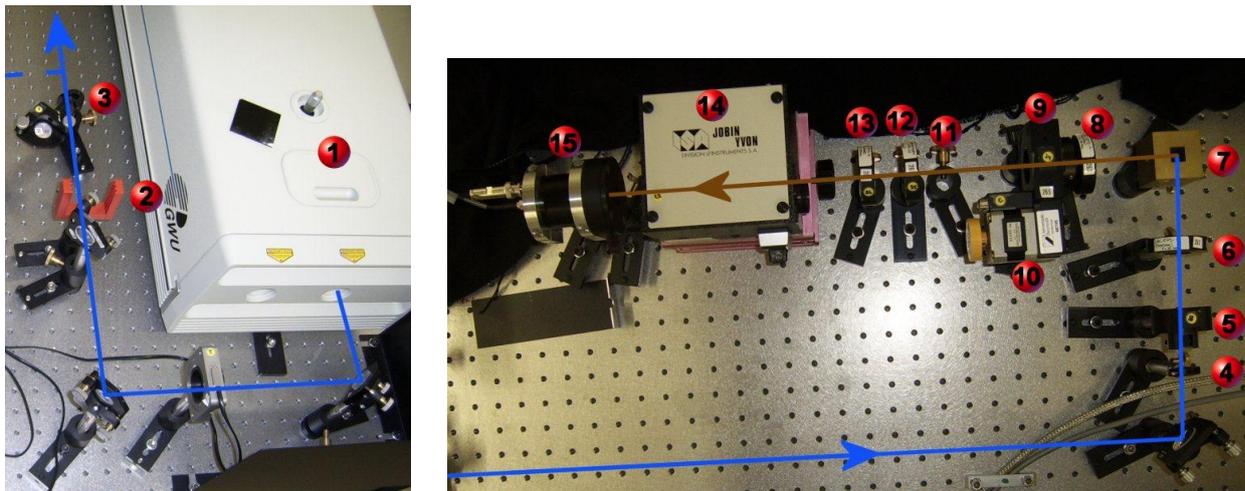


Abbildung 12: Fotografische Darstellung des Ensemble-Aufbaus. Die einzelnen Komponenten wurden nummeriert und sind im Text erläutert. Zur Veranschaulichung ist der Strahlengang durch eine farbige Linie in das Foto eingezeichnet.

3.8.2.2 Messung der IRF

Die Instrumentenfunktion bzw. *instrument response function* (IRF) entsteht durch die Tatsache, dass der Photomultiplier eine bestimmte Verzögerungszeit benötigt, um ein eingegangenes Photon zu detektieren. Ein solcher Lichtquant löst im Detektionsbereich eine Elektronenkaskade zwischen den Elektroden aus, die sich unterschiedlich schnell voranbewegt und erst nach wenigen ns wieder abflaut. Der genaue Zeitpunkt der Signaldetektion wird somit in einem entsprechend langen Intervall gestreut. Bei einer Lebensdauer- oder Anisotropiemessung erhält man deswegen eine Kurve, die sich nicht ausschließlich durch eine Exponentialfunktion in Abhängigkeit von der Zeit beschreiben lässt, sondern besonders am Anfang von dem Nebeneffekt überlagert wird, der durch die Signalkaskade entsteht. Dies kann ausgeglichen werden, indem man eine trFRET-Messung mit der Instrumentenfunktion korrigiert. Eine IRF erhält man durch eine Messung mit reinem H_2O , in dem sich keine Fluorophore befinden. Unter

Verwendung derselben Wellenlänge für die Anregung und für die Detektion wird das elastisch gestreute Anregungslicht vom Photomultiplier gemäß dem oben beschriebenen Kaskadeneffekt detektiert, was eine IRF-Kurve ergibt. Bei einer derartigen Messung wird der Analysator parallel (0°) gegenüber dem ersten Polarisator eingestellt, wobei in diesem Fall aber auch jeder andere Winkel eine gleichartige IRF-Kurve liefert. Genau wie bei einer smFRET-Messung muss der Hauptlaser mindestens 3 h in Betrieb sein, damit er temperiert ist und eine konstante Leistung erbringt. Außerdem muss das System vor der Benutzung derart justiert werden, dass der Strahl mittig durch alle Blenden und in die Photodiode verläuft und die Detektionseffizienz maximal ist. Die Messung erfolgt 5 min bei einer Anregungs- und Detektionswellenlänge von 475 nm unter Verwendung eines 2,0-OD-Graufilters, der die Intensität des eingestrahnten Lichts auf ein Hundertstel verringert. Als Detektionsspannung wird ein Wert von 3 kV eingestellt, so dass die gemessene Zählrate ca. 10000 Hz beträgt. Die exakte Amplitude der IRF am Ende der Aufzeichnung spielt für die Korrektur der Lebensdauer- oder Anisotropieergebnisse keine Rolle, da es nur auf die Form der Kurve ankommt. Um systembedingte längerfristige Schwankungen auszugleichen, sollte die Messung der IRF einmal täglich durchgeführt werden.

3.8.2.3 Messung der Donor-Lebensdauer

Der Donorfluoreszenzfarbstoff Alexa488 hat in freier Form in H_2O eine Lebensdauer τ von $4,1 \text{ ns}^{70}$. Nach einer Anregung lässt sich der Rückgang in den energetischen Grundzustand also durch eine Exponentialkurve mit dieser Halbwertszeit darstellen. Der Wert von 4,1 ns kann sich jedoch ändern, wenn der Farbstoff an ein Protein gekoppelt wird, da die Zerfallsrate von seiner molekularen Umgebung abhängig ist. Um die Lebensdauer des Donors zu messen, werden 130 μl einer Lösung von 100 nM Alexa488 in FRET-Puffer in eine Fluoreszenzküvette pipettiert und in den trFRET-Aufbau eingesetzt. Die τ -Bestimmung kann sowohl mit freiem Farbstoff als auch mit Alexa488, das über Cysteine an verschiedene Gyrase-Mutanten gekoppelt ist, erfolgen. Die Messung findet bei $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ und einer Detektionsspannung von 3 kV in einem Zeitraum von etwa 30 min bei RT statt, so dass am Ende im Messprogramm eine glatte exponentielle Zerfallskurve zu sehen ist. Die gemessene Zählrate soll etwa 20000 Hz betragen, was bei einer Anregungsintensität von ca. 500 μW erreicht wird. Der Analysator ist dabei im magischen Winkel von $54,7^\circ$ zur Ebene des ersten Polarisators eingestellt (isotrope Messung). Dadurch ist sichergestellt, dass die Lebenszeit des Donors nicht von seiner Anisotropie abhängt. Für die trFRET-Messung werden zwei Filter benötigt: Ein 2,0-OD-Graufilter reduziert die Anregungsintensität auf ein Hundertstel und ein Gelbfilter hinter der Probe, der nur Fluoreszenz ab 515 nm transmittiert, beseitigt elastisch gestreutes Anregungslicht.

Zur Auswertung muss berücksichtigt werden, dass die gemessene Exponentialkurve das Ergebnis einer Konvolution (Faltung) der theoretischen Idealfunktion mit der IRF ist. Die ideale Lebensdauerkurve

würde man erhalten, wenn die Detektion der Fluoreszenz in einem unendlich kurzen Zeitpunkt erfolgen würde, was in der Praxis nicht möglich ist. Stattdessen wird die gemessene Kurve insbesondere im Bereich der ersten 5 – 10 ns verzerrt, da der Photomultiplier die Photonen innerhalb eines entsprechenden Zeitintervalls detektiert. Um die exakte Lebenszeit des Donors durch eine Kurvenanpassung aus der Idealkurve zu erhalten, müsste man daher die Messkurve zuerst mit der IRF dekonvolvieren (entfalten). Bei einer derartigen Dekonvolution wird, vereinfacht gesagt, jedes Zeitintervall der Messkurve abgetastet und mit jedem Intervall der IRF verknüpft, wodurch sich eine Idealkurve ergibt, die um den Photomultipliereffekt bereinigt ist. Da eine Entfaltung jedoch eine mathematisch sehr komplexe und äußerst zeitaufwändige Operation wäre, wird stattdessen der umgekehrte Weg gewählt: Während der Fitprozedur wird vom Auswertungsprogramm schrittweise eine Idealkurve erzeugt, die solange verändert und jedesmal mit der IRF konvolviert wird, bis sie möglichst gut mit der Messkurve übereinstimmt. Eine derartige Kurvenanpassung läuft signifikant schneller ab, da eine mathematische Faltung deutlich einfacher ist als der inverse Vorgang. Das Auswertungsprogramm verwendet für die Fitprozedur eine Exponentialgleichung mit wahlweise einem, zwei oder drei Exponenten (1):

$$I(t) = A_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \left(+ A_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \left(+ A_3 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_3}\right) \right) \right)$$

Die Intensität I pro Zeiteinheit t wird also durch maximal drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 und durch die zugehörigen Amplituden A_1 , A_2 bzw. A_3 ausgedrückt. Idealerweise sollte eine einfache Funktion ausreichend sein, um unter Berücksichtigung der leichten Hintergrundstrahlung die gemessene Lebensdauerkurve gut zu beschreiben. Durch energetische Zwischenstufen vor der Fluoreszenzemission, intramolekulare Umlagerungen oder Bleichung des Farbstoffs kann jedoch die Einführung eines zweiten oder dritten Exponenten erforderlich sein, um diese Vorgänge durch unterschiedliche Ratenkonstanten zu berücksichtigen. Bei einer Zunahme der Freiheitsgrade wird der Fit grundsätzlich besser, allerdings sollte die Einführung weiterer Exponenten auch begründet werden. Die Qualität der Kurvenanpassung kann durch eine Auftragung der Differenz zwischen der Fit- und der Messkurve gegen die Zeit beurteilt werden. Je eher die Differenzkurve der Nulllinie entspricht, desto besser kann die experimentell bestimmte Lebensdauerkurve durch eine Anpassung mit der jeweiligen Anzahl von Exponenten beschrieben werden. Letztendlich muss jedoch manuell entschieden werden, wie viele Exponenten mindestens erforderlich sind, um die Daten zufriedenstellend zu beschreiben. Als Ergebnis erhält man 1 – 3 Zeitkonstanten τ_i , von denen ein Wert (in der Regel derjenige mit der höchsten Amplitude A_i) die gesuchte Lebensdauer des Donors darstellt und die anderen Werte, falls vorhanden, auf Nebenvorgänge zurückzuführen sind, die im Zusammenhang mit der Fluoreszenzemission eine Rolle spielen.

3.8.2.4 Messung der Rotationskorrelationszeit

Ein Farbstoff, der an ein Protein gebunden ist, sollte aufgrund seines C₆-Linkers in der Lage sein, an der Kopplungsstelle frei zu rotieren und alle beliebigen räumlichen Orientierungen einzunehmen. Dies ist wichtig, da nur so der Orientierungsfaktor κ^2 mit dem Wert für freien Farbstoff (2/3) gleichgesetzt werden kann und sich ein definierter Förster-Abstand R_0 ergibt. Wird ein Fluorophor dagegen durch die molekulare Umgebung sterisch behindert, kann die gemessene FRET-Effizienz zwischen dem Donor und dem Akzeptor nicht auf einen bestimmten Abstand zwischen beiden Farbstoffen zurückgeführt werden. Die freie Rotation des gekoppelten Fluorophors kann durch eine Messung seiner Anisotropie r mit dem Ensemble-Aufbau untersucht werden. Diese Bestimmung kann grundsätzlich mit den gleichen Proben wie bei der Lebensdauermessung erfolgen, d. h. man vergleicht den Anisotropiezerfall von Alexa488, das an verschiedene Cysteinmutanten der Gyrase gekoppelt ist, mit dem des freien Donors. 130 μ l einer Probe mit 100 nM Alexa488 (Farbstoffkonzentration) werden bei RT in den Ensemble-Aufbau eingesetzt und mit etwa 500 μ W bei $\lambda_{\text{ex}} = 475$ nm angeregt. Die Detektion erfolgt mit einer Spannung von 3 kV bei $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm, was eine Zählrate von ca 20 kHz ergibt. Wie bei der isotropen Messung werden auch hier ein 2,0-OD-Graufilter sowie ein 515-nm-Gelbfilter im Detektionsbereich eingesetzt. Für die Bestimmung der Anisotropie ist es erforderlich, dass zwei Zerfallskurven (parallel und senkrecht) aufgezeichnet werden, wobei der Analysator in einem Winkel von 0° (parallel) bzw. 90° (senkrecht) relativ zur Ebene des ersten Polarisators eingestellt sein muss. Dazu wird der Analysator durch einen Schrittmotor in 20 Zyklen zwischen den beiden Positionen hin- und herbewegt. Die Messung erfolgt 35 s in der einen und danach 35 s in der anderen Position, was 20mal wiederholt wird, und die ermittelten Intensitäten werden (getrennt nach parallel und senkrecht) summiert. Durch diese alternierende Messung wird praktisch verhindert, dass sich, beispielsweise durch Temperaturschwankungen, unterschiedliche Messbedingungen für die beiden Positionen ergeben.

Die Auswertung erfolgt vergleichbar zur Lebensdauermessung, wobei jetzt zwei verschiedene Exponentialkurven für die parallele und für die senkrechte Analysatorposition vorliegen. Das Evaluationsprogramm erstellt zunächst unter Berücksichtigung der Hintergrundstrahlung zwei (ideale) Fitkurven, die nach einer Konvolution mit der IRF mit den gemessenen Intensitätskurven übereinstimmen. Der Anisotropiezerfall $r(t)$ ist durch folgende Gleichung definiert (1):

$$r(t) = \frac{I_p(t) - I_s(t)}{I_p(t) + 2 \cdot I_s(t)}$$

Dabei ist $r(t)$ die Anisotropie des Farbstoffs in Abhängigkeit von der Zeit und $I_p(t)$ und $I_s(t)$ sind die IRF-bereinigten zeitlichen Intensitäten in paralleler bzw. senkrechter Analysatorposition. $r(t)$ lässt sich durch

eine Exponentialgleichung der Form (2)

$$r(t) = A_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{c1}}\right) \left(+ A_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{c2}}\right) + A_3 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{c3}}\right) \right)$$

mit wahlweise einem, zwei oder drei Summanden darstellen. Darin sind die Parameter τ_{ci} die auftretenden Rotationskorrelationszeiten (in ns) mit den entsprechenden Amplituden A_i . Die Qualität der Kurvenanpassung kann, wie bei der Lebensdauermessung, durch eine Auftragung der Fitdifferenzkurve gegen die Zeit beurteilt werden. Für die Beschreibung des Anisotropiezerfalls von freiem Alexa488 sollte ein Exponent ausreichen, da das Molekül in alle Richtungen gleichermaßen frei rotieren kann. Bei gekoppelten Farbstoffen erwartet man theoretisch zwei Exponenten für einen schnellen und für einen langsamen Rotationsvorgang. Diese kommen dadurch zustande, dass sich das Fluorophor schnell um die eigene Achse dreht, aber gleichzeitig seine Bewegung einer globalen (langsameren) Rotation des sehr viel größeren Proteins unterworfen ist. Weicht die Form des Enzyms deutlich von der idealen Kugelform ab (was bei der Gyrase der Fall ist), so findet diese langsame Drehung entlang bestimmten Achsen bevorzugt statt. Durch dieses richtungsabhängige Rotationsvermögen kann zur Beschreibung des Anisotropiezerfalls von gebundenen Farbstoffen ein dritter Exponent erforderlich sein. Wenn nun die kürzeste ermittelte Rotationskorrelationszeit in der gleichen Größenordnung wie diejenige von freiem Alexa488 liegt, kann davon ausgegangen werden, dass das Fluorophor an seiner Kopplungsstelle frei rotiert und alle möglichen räumlichen Orientierungen gleichermaßen einnehmen kann.

3.9 Einzelmolekül-FRET

3.9.1 Aufbau

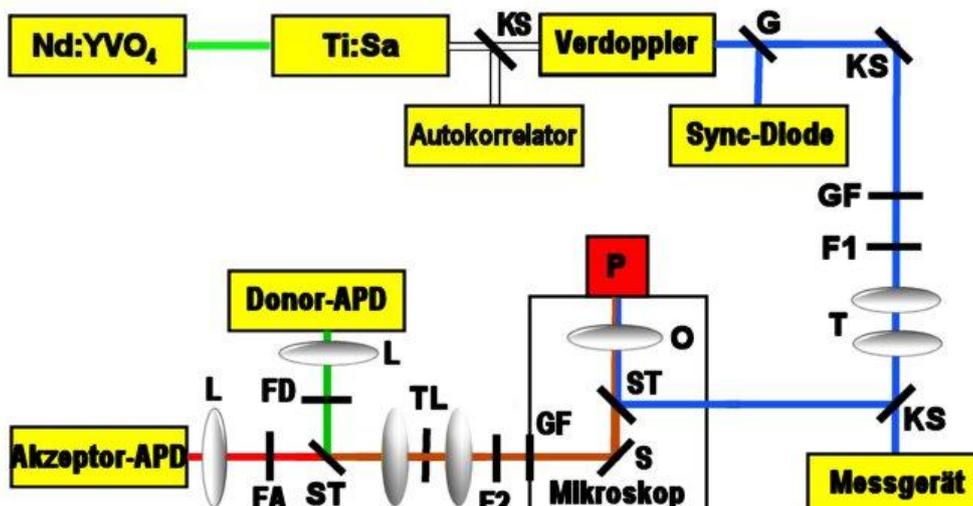


Abbildung 13: Schematische Darstellung des smFRET-Aufbaus. Die einzelnen Komponenten sind im Text erklärt. Abkürzungen: KS = Klappspiegel, G = Glasplättchen, GF = Graufilter, F1 = Bandpassfilter F1 (BP470-490), T = 1:1-Teleskop, ST = Strahlteiler, O = Objektivlinse, P = Probe, S = Spiegel, F2 = Sperrfilter F2 (HQ490LP), TL = 3:1-Teleskop mit Lochblende, FD = Filter für Donordetektion (D535/40), L = Linse, FA = Filter für Akzeptordetektion (E570LP).

Der konfokale Einzelmolekül-FRET-Aufbau ist schematisch in Abb. 13 und als Foto in Abb. 14 gezeigt. Ein diodengepumpter Neodym-Yttrium-Vanadat-Laser (Nd:YVO₄) emittiert einen kohärenten Strahl mit einer Wellenlänge von 1032 nm, der intern auf 516 nm frequenzverdoppelt wird. Der Strahl, dessen Intensität 9,03 W beträgt, pumpt daraufhin einen modengekoppelten Titan-Saphir-Festkörperlaser (Ti:Sa). Dieser Hauptlaser kann Licht zwischen 700 und 1100 nm emittieren und wird auf eine Infrarot-Wellenlänge von 950 nm eingestellt. Der auf 18°C temperierte Laser, in dem eine Stickstoffatmosphäre angelegt wird, arbeitet mit einer Pulsfrequenz von 80 MHz. Das emittierte Licht hat hier nur noch eine Intensität von etwa 1 W und besteht aus Pulsen mit einer Halbwertsbreite von ca. 2,5 ps. Ein Klappspiegel leitet das Licht bei Bedarf zu einem Autokorrelator und zu einer CCD-Kamera, um die Pulsfunktion bzw. die Wellenlänge zu kontrollieren. Der Strahl wird nun mit einem Frequenzverdoppler (1) auf eine Anregungswellenlänge von 475 nm eingestellt, wodurch die Intensität weiter auf ca. 30 mW abfällt. Ein Glasplättchen (2) reflektiert einen kleinen Teil des Strahls zu einer Synchronisationsdiode (3), die die ankommenden Pulse als zeitliche Referenz detektiert. In einen Filterhalter (4) wird ein 1,0-OD-Graufilterplättchen eingesetzt, um die Laserleistung auf ein Zehntel (ca. 3 mW) zu verringern. Ein Klappspiegel (5) wird verwendet, um zwischen dem Einzelmolekül- und dem zeitaufgelösten Aufbau umzuschalten. Der Strahl passiert einen variablen drehbaren Graufilter (6) zur Einstellung der exakten Intensität für die Probenanregung (im μW -Bereich) und einen Bandpassfilter F1 (7) mit einem Transmissionsbereich von 470 – 490 nm. Durch ein 1:1-Teleskop (8), welches aus zwei Sammellinsen mit identischer Brennweite (50 mm) besteht, soll die leichte Divergenz des Laserstrahls nach der Frequenzverdopplung ausglich werden. Das Licht wird über einen weiteren Klappspiegel (9) entweder zum Intensitätsmessgerät (10) oder durch eine Apertur in das konfokale Mikroskop (11) geleitet. In diesem wird der Strahl von einem dichroitischen Strahlteiler M (DM505; Grenzwellenlänge 505 nm) nach oben reflektiert und durch ein Objektiv in die Probe fokussiert. Eine CCD-Kamera (12) wird eingesetzt, um die Reflexion des Anregungslichts an der Oberfläche des Deckgläschens zu beobachten, damit so die optimale Höhe der Fokalebene eingestellt werden kann. Die emittierte Fluoreszenz wird von demselben Objektiv gesammelt, durch M transmittiert (wobei Raman-Streulicht herausgefiltert wird) und in den Detektionsteil geleitet. Ein variabler Graufilter schluckt zur Schonung der APDs bei hohen Zählraten je nach Einstellung zwischen 0 % und 99 % des einfallenden Lichts. Der Strahl durchläuft zuerst einen Sperrfilter F2 (13), der elastisch gestreutes Anregungslicht blockiert und nur die Fluoreszenz (ab 490 nm) passieren lässt, und danach ein 3:1-Teleskop, das aus zwei Linsen mit den Brennweiten 150 mm (14) bzw. 50 mm (16) besteht und eine 100- μm -Lochblende (15) im Brennpunkt hat. Diese Blende sorgt dafür, dass nur der Anteil des Strahls weitergeleitet wird, der direkt aus der Anregungsebene

stammt, wodurch das Prinzip der konfokalen Mikroskopie implementiert wird. Der Strahlteiler D (Q565LP; 17) trennt die Fluoreszenz in zwei Kanäle, indem er Donorlicht (unter 565 nm) reflektiert und Akzeptorlicht (über 565 nm) passieren lässt. Der Donorteil wird über einen Bandpassfilter (515 – 555 nm; 18d) und eine 50-mm-Linse (19d) zur Donor-APD (20d) geleitet. Der Akzeptorstrahl läuft dagegen über einen Sperrfilter mit einer Transmission ab 570 nm (18a) über eine Linse (19a) zur Akzeptor-Photodiode (20a). Die beiden Detektoren senden für jedes einfallende Photon ein Signal über einen Router an eine Zählkarte, wobei die Totzeit etwa 150 ns beträgt.

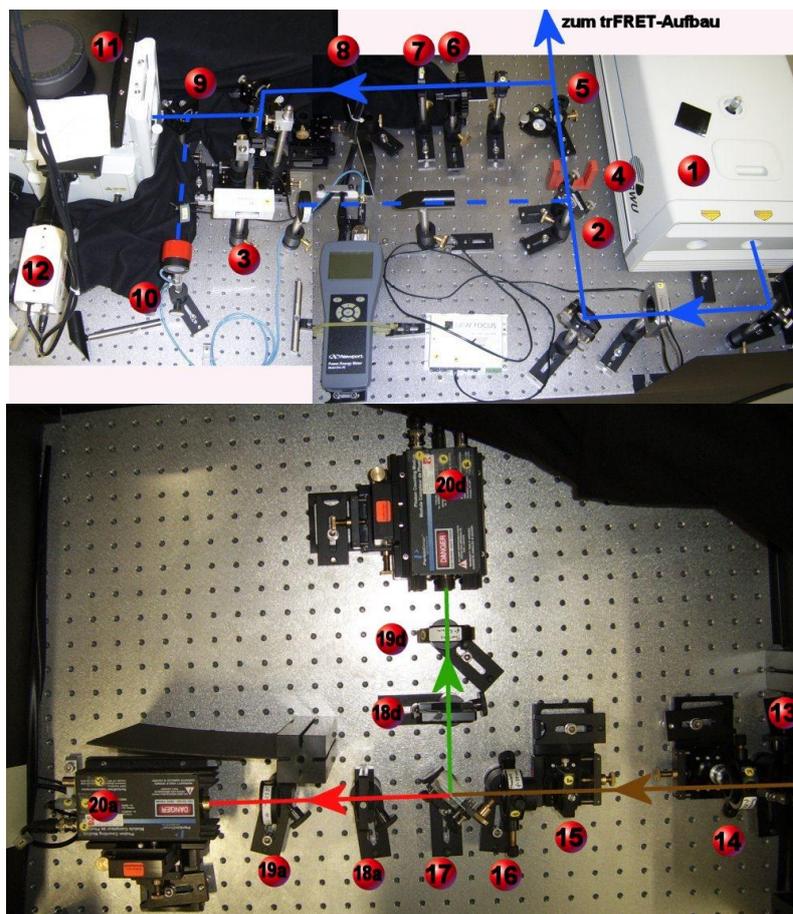


Abbildung 14: Fotografische Darstellung des smFRET-Aufbaus. Die einzelnen Komponenten wurden nummeriert und sind im Text erläutert. Zur Veranschaulichung ist der Strahlengang durch eine farbige Linie in das Foto eingezeichnet. Der Klappspiegel (5) ist in der Abbildung in der trFRET-Stellung und muss für eine Einzelmolekülmessung nach oben geklappt werden. Das 1:1-Teleskop (8) war zum Zeitpunkt der Aufnahme nicht montiert.

3.9.2 Einzelmolekülmessung

Für smFRET-Messungen wird FRET-Puffer verwendet, bei dem es sich um besonders reinen Markierungspuffer, d. h. Proteinpuffer ohne β -Mercaptoethanol, handelt. Etwa 50 ml dieses Puffers werden ÜN bei RT mit etwas Aktivkohlepulver gerührt, so dass fluoreszierende Verunreinigungen

gebunden werden. Anschließend wird die Lösung 10 min stehen gelassen, damit die Aktivkohle sich absetzt, und danach mit einer geeigneten Spritze durch eine 0,22- μm -Membran filtriert. Ein auf diese Art gereinigter Puffer kann einige Wochen lang als Messpuffer verwendet werden, bevor die Menge an fluoreszierenden Kontaminanten durch Pipettieren wieder überhand nimmt. 50 ml H_2O für das Objektiv werden auf die gleiche Art behandelt (FRET- H_2O).

Der Hauptlaser muss nach dem Einschalten mindestens 3 h aufwärmen, damit er eine konstante Leistung erbringt und die Messung nicht beeinträchtigt wird. Nach Ablauf dieser Zeit wird das System justiert, d. h. alle Spiegel werden so eingestellt, dass der Strahl mittig auf alle Blenden und Detektoren trifft, so dass die Effizienz der Messung maximal ist. Diese Prozedur sollte täglich durchgeführt werden, da schon kleinste Verschiebungen des optischen Aufbaus zu einer deutlichen Änderung des Detektionsvermögens führen können. Zur Feinjustierung des Systems werden 2 μl einer Justierlösung in 198 μl FRET-Puffer in einer BSA-gesättigten Messzelle (siehe unten) verwendet. Bei dieser Lösung handelt es sich um eine Mischung aus 1 μM β -Mercaptoethanol-Alexa488 und 5 μM β -Mercaptoethanol-TMR in FRET-Puffer. Die beiden Komponenten werden bei RT durch Zugabe von β -Mercaptoethanol im Überschuss, das eine reaktive SH-Gruppe besitzt, zu den freien Farbstoffen hergestellt. Eine solche Lösung kann bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt und praktisch unbegrenzt lange verwendet werden. Die Justierlösung wird mit einer Intensität von 10 μW angeregt und sollte bei einer optimalen Ausrichtung des Detektionssystems in beiden Kanälen zu einer Zählrate von jeweils 130000 – 150000 Hz führen.

Die Messung findet in einer Küvette statt, die aus einem Deckglas mit einer Dicke von 140 μm und aufgeklebten Plastikkammern besteht. Die Oberfläche wird zuerst mindestens 30 min mit 300 μl 500 $\mu\text{g/ml}$ BSA (in FRET-Puffer) gesättigt, um zu verhindern, dass das markierte Protein an die Kammer bindet und somit für die Messung verloren geht. Anschließend wird die Küvette mit 400 μl FRET-Puffer gespült, um freies BSA zu entfernen, und kann dann für eine Einzelmolekülmessung verwendet werden. Dazu wird zuerst frischer FRET-Puffer vorgelegt und danach die markierte Probe in einer Standardkonzentration von 75 pM zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 200 μl in der Kammer befindet. Da die markierten Proteine in einer Konzentration im einstelligen μM -Bereich vorliegen, müssen geeignete Vorverdünnungen in FRET-Puffer hergestellt werden. Diese sollten zügig und nur einmal verwendet werden, da damit zu rechnen ist, dass die gekoppelten Farbstoffe mit der Zeit an die Wand der Plastikgefäße binden, was die Konzentration in der Lösung verfälschen würde. Auf das Objektiv des Mikroskops wird nun ein Tropfen FRET- H_2O (s. o.; ca. 30 μl) pipettiert und anschließend die Probenkammer darauf gelegt und abgedeckt. Bei Bedarf kann die Messzelle mit einem speziell angefertigten Aufsatz temperiert werden. Mit Hilfe einer ans Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera wird die Fokalebene auf die Oberseite des Deckgläschens eingestellt, so dass keine Beugungsmuster auf dem Schirm zu sehen sind. Durch Betätigen eines Drehreglers wird der Fokus anschließend um 100 μm

nach oben, d. h. in die Probenlösung hinein, verschoben und der Objektivverschluss entfernt, damit die Aufzeichnung der Photonen gestartet werden kann. Alle Messungen werden 30 min bei RT in einem abgedunkelten Raum mit einer Anregungsintensität von 75 μ W durchgeführt. Eine typische Messreihe sieht folgendermaßen aus, wobei die Substrate bzw. die Konzentrationen der einzelnen Komponenten bei Bedarf verändert werden können:

- (1) 200 μ l 75 pM GyrA-Alexa488-TMR in FRET-Puffer
- (2) Ansatz (1) + 2 μ M GyrB WT
- (3) Ansatz (2) + 150 nM pUC18 (ethanolgefällt)
- (4) Ansatz (3) + 2 mM ATP (oder AMPPNP oder Inhibitor)

In verschiedenen Vorversuchen wurden einige Parameter wie beispielsweise die Konzentration des markierten Proteins oder die Anregungsintensität variiert und optimiert, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse aus den smFRET-Messungen zu erhalten. Statt ATP bzw. pUC18 können auch andere Nukleotide wie ADP oder AMPPNP bzw. lineare Kalbsthymus-DNA eingesetzt werden. pUC18 muss vor der smFRET-Messung (maximal einige Tage zuvor) ethanolgefällt und in aktivkohlegereinigtem Wasser (FRET-H₂O) aufgenommen werden, da es andernfalls ein riesiges Hintergrundsignal bei der Messung produzieren würde. Das Gesamtvolumen der zugegebenen Substrate sollte 20 μ l nicht überschreiten, da ansonsten der auftretende Verdünnungseffekt nicht mehr vernachlässigbar wäre. Im Ergebnisteil ist jeweils angegeben, welche Substrate, Konzentrationen und sonstige Bedingungen in der entsprechenden Messreihe verwendet wurden.

3.9.3 Auswertung

3.9.3.1 Zeitdiagramme

Eine smFRET-Messung liefert eine Datei, in der alle Photonen mit ihrer Makrozeit (Zeit seit Messbeginn in 50-ns-Schritten), Mikrozeit (Zeit seit Eingang des Anregungspulses in 48,8-ps-Schritten) und dem Kanal (Donor oder Akzeptor) verzeichnet sind. Daraus kann im Evaluationsprogramm ein Zeitdiagramm erstellt werden, d. h. die Photonen werden für beide Kanäle in bestimmten Zeiteinheiten (z. B. 1-ms-Schritte) integriert und gegen die Messzeit aufgetragen. Die von der Donor-APD detektierten Photonen werden mit einer grünen Linie angegeben, während für Akzeptorphotonen eine rote Farbe verwendet wird. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird der Akzeptorverlauf mit dem Faktor -1 multipliziert und unterhalb der Zeitachse, d. h. spiegelsymmetrisch zur Donorlinie, eingezeichnet. Die Anzahl der Photonen, die pro Sekunde im Donor- bzw. im Akzeptorkanal eingehen, ergeben die Donor- bzw. Akzeptorzählrate sowie insgesamt eine Gesamtzählrate in Hz. Im Zeitdiagramm erkennt man eine

ständige Hintergrundaktivität, die v. a. durch Restlicht im Raum erzeugt wird, und im Durchschnitt etwa 1 – 2 *Bursts* (kurzzeitige Photonenanhäufungen) pro Sekunde. Diese Signale entstehen, wenn ein fluoreszenzmarkiertes Molekül (aber auch eine fluoreszierende oder streuende Kontamination) durch den Laserfokus wandert und vom Licht angeregt wird. Weiterhin erkennt man gelegentlich sogenannte 20-Hz-Signale, die aus auffallend photonenreichen *Bursts* im Abstand von exakt 50 ms bestehen und beide Kanäle gleichermaßen betreffen. Ihr Ursprung konnte nicht genau geklärt werden – möglicherweise handelt es sich um ein defektes Kabel, das periodische Störungen sendet. 20-Hz-Probleme können durch das Evaluationsprogramm sichtbar gemacht und herausgeschnitten werden. Zeitdiagramme sind geeignet, um die smFRET-Messung vorläufig zu bewerten, um Störsignale herauszufiltern und um interessante Einzelmolekülereignisse zu evaluieren.

3.9.3.2 FRET-Histogramme

Zur weiteren Auswertung der smFRET-Messung muss zunächst die Hintergrundzählrate während der Messung bestimmt werden. Der Algorithmus ermittelt nach Kanälen getrennt für jedes Photon eine lokale Zählrate, d. h. den Kehrwert der zeitlichen Differenz zwischen dem jeweiligen Photon und seinen vier Nachfolgern. Da eine 30-min-Messdatei etwa 10^7 Photonen verzeichnet und die Bestimmung aller lokalen Zählraten zu zeitaufwändig wäre, betrachtet der Algorithmus nur die ersten 500000 Photonen aus der Messung. Aus den lokalen Zählraten wird in 100er-Schritten ein Histogramm gebildet und (durch eine interne Kurvenanpassung) das Maximum ermittelt, das bei einer durchschnittlichen *Burstanzahl* der Hintergrundzählrate entspricht. Für die folgende Auswertung werden die einzelnen Hintergrundzählraten für beide Kanäle sowie die Gesamtrate bestimmt, wobei dieser Wert mit der Summe aus den beiden Einzelraten übereinstimmen sollte.

Ein weiterer Algorithmus ist für die Detektion der *Bursts*, also der gesuchten Signale der fluoreszierenden Probe, zuständig. Für jedes Photon werden wiederum lokale Zählraten zwischen ihm und seinen M Nachfolgern bestimmt – dieses Mal jedoch unabhängig vom Detektionskanal. Für alle Auswertungen wurde der Parameter M auf den Wert 3 gesetzt. Aus Symmetriegründen erfolgt die Bestimmung der lokalen Zählrate für jedes Photon in beide Richtungen. Sobald die lokale Rate eines Photons mindestens K-mal so hoch ist wie die zuvor bestimmte Hintergrundzählrate, liegt ein *Burst* (Photonenereignis) vor. In der Regel gilt $K = 3$, allerdings wurde der Wert für einige kritische Messungen zur besseren Signaldetektion auf 2 herabgesetzt, was im Ergebnisteil an der entsprechenden Stelle angegeben ist. Alle folgenden Photonen werden solange zum jeweiligen *Burst* dazugerechnet, bis die lokale Zählrate wieder geringer ist als die K-fache Hintergrundrate. Jedes Photonenereignis hat somit eine bestimmte Länge (in ms) sowie eine bestimmte Quantenanzahl in beiden Kanälen. Diese Zahl wird um die mittlere Hintergrundaktivität im Donor- bzw. im Akzeptorkanal korrigiert. Für die weitere Auswertung werden

nur noch solche *Bursts* berücksichtigt, deren Gesamtphotonenanzahl einen bestimmten Schwellenwert (Photonenschwelle) übersteigt, um einen großen Teil der Kontaminationssignale herauszufiltern. Diese Schwelle wird für jede Auswertung je nach Messbedingungen unterschiedlich gesetzt (ca. 50 – 200) und ist im Ergebnisteil jeweils angegeben.

Die FRET-Effizienz E_{FRET} eines einzelnen Photonenergebnisses ergibt sich aus dem Verhältnis der Photonenzahlen im Donor- bzw. Akzeptorkanal (I_D bzw. I_A). Dabei ist zu berücksichtigen, dass in einer smFRET-Messung verschiedene Störeffekte auftreten, die sich nicht vermeiden lassen und die durch sogenannte Korrekturparameter ausgeglichen werden. Die auftretenden Parameter α , β bzw. γ werden im Unterkapitel 3.9.4 definiert und ihre Bestimmung erklärt. Die Effizienz des Förster-Transfers in einem Photonenergebnis (*Burst*) ist durch folgende Gleichung definiert (1):

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

Die Transfereffizienzen aller Ereignisse aus einer Messung werden in einem FRET-Histogramm zusammengefasst. Die annähernd Gauß-förmigen Maxima in diesen Histogrammen geben die FRET-Effizienzen der verschiedenen Konformationszustände an, die während der Messung im Laserfokus aufgetreten sind. Außerdem wird in jeder Messung ein sogenanntes 0-Signal bei $E_{FRET} = 0$ erzeugt. Dieses stammt von Proteinen, die mit zwei Donorfarbstoffen markiert sind und keinen Akzeptor enthalten, so dass in diesem Molekül kein Förster-Transfer stattfinden kann. Falls also alle Proteine in der Lösung die gleiche Konformation besitzen und somit der Abstand der beiden Fluorophore immer gleich ist, erhält man ein Histogramm mit einem 0-Signal und einem weiteren Maximum bei der entsprechenden FRET-Effizienz. Wenn durch eine Substratzugabe eine Konformationsänderung im Enzym ausgelöst wird, sollte ein weiteres Maximum erkennbar sein. Aus E_{FRET} kann durch folgende Gleichung der Abstand R zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfarbstoff bestimmt werden (2):

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6} \quad \text{bzw.} \quad R = R_0 \cdot \sqrt[6]{\frac{1 - E_{FRET}}{E_{FRET}}}$$

R_0 ist der Förster-Abstand, d. h. derjenige Abstand zwischen den beiden Fluorophoren, der zu einer Transfereffizienz von 50 % führt. Er ist für ein bestimmtes Donor-Akzeptor-Paar charakteristisch und seine Bestimmung wird in 3.7 erklärt. Zur Veranschaulichung der Abstandsverhältnisse im Protein kann ein Abstands-FRET-Histogramm erstellt werden, in dem die Anzahl der Ereignisse nicht gegen E_{FRET} , sondern gegen R aufgetragen ist.

3.9.3.3 Einzelmolekülereignisse

Aus einem FRET-Histogramm lassen sich nur die unterschiedlichen Enzymzustände ableiten, die in der Probe auftreten, aber noch keine Konformationsdynamik. Um diese sichtbar zu machen, werden einzelne Photonenergebnisse (*Bursts*) näher betrachtet. Von einem solchen Ereignis kann ein zeitliches FRET-Diagramm erstellt werden, in dem E_{FRET} über bestimmte Zeitschritte (z. B. 1 ms) integriert und gegen die Zeit (seit dem Beginn des *Bursts*) aufgetragen wird. Wenn ein Enzym seine Konformation nicht ändert, solange es sich im Fokus befindet, erhält man einen Graphen, der relativ gerade auf Höhe von E_{FRET} verläuft und wegen der begrenzten Photonenzahl pro ms um 0,1 – 0,2 Einheiten schwanken kann. Tritt hingegen im Fokus eine Konformationsänderung auf, so ändert sich innerhalb von 1 ms der Abstand der beiden Farbstoffe, so dass die Linie zu einem anderen Niveau springt und dort weiter verläuft. Durch Artefakte (fluoreszierende Kontaminanten) werden dagegen eher FRET-Diagramme erzeugt, die deutlich stärker schwanken und bei denen keine eindeutigen Niveaus erkennbar sind. 20-Hz-Problemsignale erzeugen wegen der hohen Photonenzahl in beiden Kanälen kaum schwankende Verläufe bei etwa $E_{\text{FRET}} = 0,5$, können jedoch an der 50-ms-Periodizität erkannt und herausgefiltert werden.

Das Evaluationsprogramm verwendet einen weiteren Algorithmus zur automatischen Erkennung von *Bursts*, die in ihrem Verlauf einen Sprung zwischen zwei unterschiedlichen Niveaus aufweisen und deshalb eine mögliche Konformationsänderung des Enzyms andeuten. Das Programm betrachtet in jedem *Burst* die 1-ms-Zeitschritte und sucht jeweils nach den beiden ms-Schritten mit der fünfthöchsten und der fünftniedrigsten ($N = 5$) FRET-Effizienz. Wenn die Differenz der beiden E_{FRET} -Werte höher ist als $\Delta = 0,4$, so ist zu vermuten, dass während des Ereignisses ein deutlicher Sprung aufgetreten ist. Allerdings werden auch einige Artefakte von diesem Algorithmus als interessant erkannt, so dass es sich nur um eine Vorauswahl handelt, die man anschließend manuell beurteilen kann. Bei Bedarf können die Parameter N und Δ auch geändert werden.

3.9.3.4 Beurteilung der Photonenergebnisse

Ein einzelnes Photonenergebnis (bzw. Fluoreszenzereignis) ist das Signal eines markierten Proteins, das den Laserfokus durchquert und eventuell währenddessen eine Konformationsänderung begangen hat. Leider wird die Evaluation durch Sekundärereignisse erschwert, die von den gewünschten Signalen getrennt werden müssen. Ein in diesem Zusammenhang wichtiger Effekt ist die Bleichung eines der beiden Farbstoffe⁵⁹, d. h. das Fluorophor ist nicht mehr in der Lage, Fluoreszenz zu emittieren. Tritt während der Laseranregung eines doppelmarkierten Proteins eine Bleichung des Akzeptorfarbstoffs auf, so ist der Förster-Transfer unabhängig von der Farbstoffdistanz beendet und es wird eine apparente FRET-Effizienz $E_{\text{FRET}} = 0$ gemessen. Im zeitlichen FRET-Diagramm ist dann ein entsprechender

Niveausprung erkennbar, der jedoch nichts mit einer Konformationsdynamik des Proteins zu tun hat. Bei einer plötzlichen Bleichung des Donors tritt das Enzym in einen Zustand mit der scheinbaren Transfereffizienz $E_{\text{FRET}} = 1$ über.

Um echte von unechten FRET-Sprüngen zu unterscheiden, kann die Mikrozeit der Donorphotonen in die Evaluation einbezogen werden. Dabei handelt es sich um die Zeit (in 48,8-ps-Schritten), die seit der Anregung durch den Laserpuls vergangen ist, wenn ein einzelnes Photon von einer APD detektiert wird. Der verwendete Donor Alexa488 hat in freier Form eine Lebensdauer τ_D von 4,1 ns (3.8.2.3). In Anwesenheit eines Akzeptors nimmt diese Lebensdauer je nach Abstand der beiden Fluorophore ab, da in ungebleichten Systemen ein Förster-Transfer auftritt. Somit entspricht jeder Abstand R zwischen Donor und Akzeptor bzw. jede Transfereffizienz E_{FRET} einer bestimmten Donor-Lebensdauer τ_{DA} (1):

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_D}$$

Im Falle einer Bleichung verschiebt sich E_{FRET} bei gleichbleibendem Abstand R und ist daraufhin nicht mehr an τ_{DA} gekoppelt. Zur Beurteilung eines einzelnen Photonenergebnisses wird ein Histogramm aus den Mikrozeiten aller Donorphotonen erstellt und dieses mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst, um die mittlere Alexa488-Lebensdauer in diesem *Burst* zu bestimmen. Dabei werden aufgrund der Detektionsverzögerung nach dem Laserpuls die ersten 62 von 256 Zeitschritten verworfen, was im Evaluationsprogramm eingestellt werden kann. Die Kurvenanpassung zur τ_{DA} -Ermittlung beginnt daher standardmäßig ab dem 63. Wert (Abweichungen hiervon sind im Ergebnisteil an der entsprechenden Stelle angegeben). Wenn die so bestimmte Lebensdauer mit der gemessenen Transfereffizienz E_{FRET} nach obiger Gleichung vereinbar ist, kann man davon ausgehen, dass es sich um ein Ereignis handelt, in dem ausschließlich FRET aufgetreten ist. Weichen die Werte dagegen deutlich voneinander ab, ist vermutlich einer der beiden Farbstoffe während der Messung gebleicht worden. Zur Beurteilung der gesamten Messung werden für alle *Bursts* der gemessene Donor-Akzeptor-Abstand R gegen die mittlere Lebenszeit τ_{DA} in ein 3D-Histogramm eingetragen (Multiparameteranalyse⁶⁴⁻⁶⁶). Ein Contourbild, in dem die Anzahl der Ereignisse pro Flächeneinheit durch verschiedene Graustufen dargestellt ist, macht ähnlich wie ein FRET-Histogramm die einzelnen Konformationszustände sichtbar, die in der Probe vorhanden sind. In das 3D-Histogramm wird außerdem eine Ideallinie eingezeichnet, die durch eine Berechnung von R in Abhängigkeit von τ_{DA} entsteht (2):

$$R = R_0 \cdot \sqrt[6]{\frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_D - \tau_{\text{DA}}}}$$

Je näher ein einzelnes Photonenergebnis an dieser Linie liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein echtes FRET-Signal handelt und nicht durch eine Farbstoffbleichung beeinträchtigt wurde.

3.9.4 Bestimmung der Korrekturparameter

3.9.4.1 Kreuzdetektion

Das smFRET-Detektionssystem ist in der Lage, die von der Probe emittierte Fluoreszenz getrennt nach Herkunft (Donor oder Akzeptor) zu erkennen. Dazu ist ein Strahlteiler im Strahlengang eingebaut, der Photonen unterhalb von 565 nm zur Donor-APD reflektiert und Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 565 nm zur Akzeptor-APD durchlässt. Diese Trennung ist leider nicht vollständig, da Alexa488 zu einem bestimmten Teil oberhalb dieser Grenze emittiert, während alle Akzeptorfluorophore zu einem geringen Teil auch darunter fluoreszieren. In beiden Fällen werden die Photonen vom Strahlteiler zur jeweils falschen APD gelenkt. Würde man einen anderen Teiler mit einer höheren bzw. niedrigeren Grenzwellenlänge verwenden, hätte man das Problem nicht gelöst, da in jedem Fall der eine Effekt zu- und der andere abnehmen würde. Um diese sogenannte Kreuzdetektion in der smFRET-Auswertung zu berücksichtigen, werden zwei Korrekturparameter α und β eingeführt. α gibt hierbei an, welcher Anteil der Photonen, die vom Donor emittiert wurden, fälschlicherweise im Akzeptorkanal landen, während β den umgekehrten Fall beschreibt. Zur Bestimmung der Kreuzdetektion werden smFRET-Messungen mit einzelmarkierten Proteinen durchgeführt, die entweder nur mit dem Donor Alexa488 oder nur mit einem Akzeptor gekoppelt sind. 200 μ l 10 nM Protein-Alexa488 (Farbstoffkonzentration) in FRET-Puffer werden bei RT bei einer Wellenlänge von 475 nm angeregt und in einem Zeitraum von etwa 30 s die Zählraten in beiden Kanälen gemessen. Die gleiche Messung wird anschließend bei den gleichen Bedingungen mit 10 nM Protein-Akzeptor sowie zur Kontrolle mit reinem FRET-Puffer durchgeführt. Als Anregungsintensität verwendet man 75 μ W, was der Intensität in normalen smFRET-Messungen mit doppelmarkierten Proteinen entspricht. Um zu verhindern, dass ein Teil der einzelmarkierten Proteine fest an die Wand der smFRET-Küvette bindet, muss diese zuvor mit BSA gesättigt werden. Weiterhin muss für die Messung ein 1,6-OD-Graufilter direkt nach dem konfokalen Mikroskop in den Strahlengang eingesetzt werden, um die APDs zu schonen. Als Messergebnis erhält man sechs verschiedene Intensitäten I_{DD}/I_{DA} (Zählrate bei der Donormessung im Donor-/Akzeptorkanal), I_{AD}/I_{AA} (Zählrate bei der Akzeptormessung im Donor-/Akzeptorkanal) und I_{PD}/I_{PA} (Puffermessung). Zur Auswertung werden alle sechs gemessenen Intensitäten zuerst durch die jeweilige Messzeit dividiert, um die Zählraten in Hz zu erhalten. Um den Effekt der Hintergrundstrahlung zu berücksichtigen, werden die Zählraten aus der Puffermessung von den Intensitäten aus den Proteinmessungen abgezogen: I_{PD} wird von I_{DD} und I_{AD} subtrahiert, während I_{DA} und I_{AA} um I_{PA} korrigiert werden. Die gesuchten Korrekturparameter α und β sind dann folgendermaßen definiert (1):

$$\alpha = \frac{I_{DA}}{I_{DD}} \quad \text{bzw.} \quad \beta = \frac{I_{AD}}{I_{AA}}$$

Bei optimaler Trennung der Fluoreszenz hätten beide Parameter somit den Wert 0, was in der Praxis nicht erreicht wird. Da die spektralen Eigenschaften der gekoppelten Farbstoffe zu einem gewissen Grad von ihrer molekularen Umgebung im Protein abhängen, ist es sinnvoll, α und β für jede markierte Gyrase-Mutante separat zu bestimmen.

3.9.4.2 Quantenausbeute und Detektionseffizienz

Bei der Auswertung einer smFRET-Messung ist weiterhin zu berücksichtigen, dass Donor- bzw. Akzeptorfluorophore, die durch das konfokale Volumen wandern, nicht gleich gut erkannt werden. Dies liegt einerseits an der unterschiedlichen Quantenausbeute der beiden Farbstoffe und andererseits an der abweichenden Detektionseffizienz, die durch die Auswahl der Filter und der Strahlteiler im Einzelmolekülaufbau bedingt ist. Beide Effekte werden gemeinsam mit dem Korrekturparameter γ erfasst, der folgendermaßen definiert ist (1):

$$\gamma = \frac{\eta_A \Phi_A}{\eta_D \Phi_D}$$

Die Formel enthält sowohl die beiden Detektionseffizienzen für den Donor η_D und für den Akzeptor η_A sowie die entsprechenden Quantenausbeuten Φ_D und Φ_A . Bei einer gleichwertigen Detektion beider Farbstoffe hätte γ den Wert 1. Während man Φ_D und Φ_A noch relativ einfach bestimmen könnte, ist die direkte Messung der Effizienzen η_D und η_A sehr schwierig. Um den Wert γ für das vorliegende smFRET-System zu ermitteln, wird es daher stattdessen mit einem detektionskalibrierten Fluorimeter verglichen, welches Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlänge gleich gut erkennen kann. Dabei wird eine Mischung aus einzelmarkierten Proteinen (die gleiche Mutante mit Donor bzw. mit Akzeptor gekoppelt) nacheinander in beide Geräte eingesetzt. γ kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werden (2):

$$\frac{Z_D}{Z_A} = \gamma \cdot \frac{I_D - \beta \cdot I_A}{I_A - \alpha \cdot I_D}$$

Z_D und Z_A sind die Anzahl der absorbierten Photonen, die der Donor bzw. der Akzeptor zur Verfügung haben, um sie als Fluoreszenz wieder emittieren zu können. Beim Donor ist es diejenige Strahlung, die er vom Laser aufgenommen, aber nicht an den Akzeptor transferiert hat. Im Falle des Akzeptors handelt es

sich um die Strahlung, die er vom Donor erhalten hat, sowie die Energie aus seiner direkten Anregung durch das Laserlicht. I_D und I_A sind die (hintergrundbereinigten) Intensitäten im Donor- bzw. Akzeptorkanal, die mittels α und β um die Kreuzdetektion korrigiert werden. Für die Ermittlung des Quotienten Z_D/Z_A wird ein detektionskalibriertes Fluorimeter verwendet, während der rechte Teil der Gleichung durch Messungen mit dem smFRET-Aufbau bestimmt wird. Eine Mischung aus 50 nM Protein-Donor und 500 nM Protein-Akzeptor (200 μ l; jeweils Farbstoffkonzentration) wird zuerst bei einer Intensität von 10 μ W und $\lambda_{ex} = 475$ nm bei RT in einem Zeitraum von etwa 30 s im Einzelmolekülaufbau angeregt. Die ermittelten Zählraten im Donor- bzw. Akzeptorkanal I_D und I_A (pro Sekunde) werden um die Hintergrundstrahlung korrigiert, indem die entsprechenden Zählraten aus einer reinen FRET-Puffer-Messung subtrahiert werden. Wichtig ist auch bei dieser Messung die vorherige Sättigung der FRET-Küvette durch BSA sowie die Verwendung eines geeigneten Graufilters (OD 1,0) direkt nach dem konfokalen Mikroskop. Die gleiche Mischung aus Protein-Donor und -Akzeptor wird nun in ein Fluorimeter eingesetzt, wo bei RT und $\lambda_{ex} = 475$ nm ein (korrigiertes) Emissionsspektrum von 480 – 700 nm aufgezeichnet wird. Außerdem werden zwei separate Emissionsspektren von 100 nM Protein-Donor sowie Protein-Akzeptor jeweils mit $\lambda_{ex} = 500$ nm und $\lambda_{em} = 505 - 700$ nm bei RT gemessen. Die Anregungswellenlänge ist so gewählt, dass beide Farbstoffe ähnlich gut angeregt werden. Die Konzentration von Protein-Akzeptor muss so hoch sein, dass diese Lösung die gleiche A_{500} hat wie 100 nM Protein-Donor (entspricht ca. 250 – 350 nM Protein-Akzeptor). Beide Einzellösungen sind also bei $\lambda_{ex} = 500$ nm in der Lage, gleich viele Photonen von der Lichtquelle zu absorbieren, um sie anschließend in Form von Fluoreszenz wieder zu emittieren. Der Quotient aus Z_D und Z_A lässt sich durch einen Vergleich der drei Emissionsspektren ermitteln, indem untersucht wird, welchen Anteil beide Einzelspektren $F_D(\lambda)$ bzw. $F_A(\lambda)$ am Mischungsspektrum $F_{DA}(\lambda)$ haben. $F_{DA}(\lambda)$ setzt sich aus den beiden Einzelspektren und den Koeffizienten d und a zusammen (3):

$$F_{DA}(\lambda) = a \cdot F_A(\lambda) + d \cdot F_D(\lambda)$$

Es handelt sich dabei um ein Extremwertproblem mit den Lösungen (4)

$$d = \frac{\sum F_D F_{DA} - \frac{\sum F_D F_A}{\sum F_A^2} \sum F_A F_{DA}}{\sum F_D^2 - \frac{(\sum F_D F_A)^2}{\sum F_A^2}} \quad \text{bzw.} \quad a = \frac{\sum F_A F_{DA} - \frac{\sum F_D F_A}{\sum F_D^2} \sum F_D F_{DA}}{\sum F_A^2 - \frac{(\sum F_D F_A)^2}{\sum F_D^2}}$$

Für die Summenbildung werden dabei die Flächen aller drei Spektren zwischen 505 und 700 nm berücksichtigt. Der Quotient d/a gibt das Verhältnis der Anteile an, mit denen beide Einzelspektren zum

Mischungsspektrum beitragen, und entspricht dem Quotienten Z_D/Z_A aus der theoretischen γ -Gleichung. Da die genauen Werte für Z_D und Z_A bei der Auswertung nicht relevant sind, sondern lediglich deren Verhältnis von Interesse ist, spielt es keine Rolle, dass die Farbstoffkonzentrationen bei $F_{DA}(\lambda)$ sich von denen bei $F_D(\lambda)$ bzw. $F_A(\lambda)$ unterscheiden. Wichtig ist nur, dass für die Messung der gemischten Probe im Fluorimeter und im smFRET-Aufbau die gleiche Lösung eingesetzt wird. Unter Verwendung von d/a , I_A , I_D sowie den bereits bekannten Korrekturwerten für die Kreuzdetektion α und β lässt sich nun der gesuchte Parameter γ berechnen (5):

$$\gamma = \frac{\frac{d}{a}}{\frac{I_D - \beta \cdot I_A}{I_A - \alpha \cdot I_D}}$$

Da die molekulare Umgebung der Fluorophore einen Einfluss auf deren Quantenausbeute haben kann, ist es sinnvoll, γ für jede markierte Gyrase-Mutante separat zu bestimmen.

3.9.4.3 Direkte Anregung

Ein weiteres Problem, das in Einzelmolekül-FRET-Messungen auftritt, ist die direkte Anregung des Akzeptors durch den Laser. So zeigt beispielsweise das Absorptionsspektrum von TMR bei der Donoranregungswellenlänge von 475 nm eine Photonenaufnahme, die etwa 5 – 10 % des Maximums bei 555 nm entspricht. Dieser Störeffekt wird mit dem Korrekturparameter δ bezeichnet und sollte bei der Auswertung von smFRET-Messungen berücksichtigt werden. Der Wert δ ist definiert als das Verhältnis zwischen der Photonenzahl, die der Akzeptor direkt vom Laser (bzw. allgemein von der Lichtquelle) absorbiert, und der Photonenzahl, die der Donor von diesem aufnimmt. Die direkte Anregung des gekoppelten Akzeptors ist je nach verwendeter Gyrasemutante leicht unterschiedlich und kann im Prinzip auf zwei Arten – mit dem smFRET-Aufbau und mit einem Absorptionsspektrometer – erfasst werden.

Bei der Bestimmung der Kreuzdetektionskorrekturparameter α und β werden zwei smFRET-Messungen mit einzelmarkierten Mutanten durchgeführt. Die dort ermittelten und um den Hintergrundeffekt bereinigten Zählraten in beiden Kanälen können auch (gemäß obiger Definition) für die δ -Bestimmung eingesetzt werden (1):

$$\gamma \cdot \delta = \frac{I_{AA}}{I_{DD}}$$

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die unterschiedliche Quantenausbeute sowie die abweichende Detektionseffizienz von Donor und Akzeptor in die gemessenen Zählraten einfließen, was durch den Parameter γ in der Formel ausgeglichen wird. Bei einer separaten Bestimmung von γ kann δ somit durch eine einfache Division berechnet werden (und andersherum).

Ein alternativer Weg zur Bestimmung der direkten Anregung ist die Betrachtung der Absorptionsspektren von einzelmarkierten Lösungen aus Protein-Donor bzw. Protein-Akzeptor. Verwendet man eine Donor- und eine Akzeptorlösung mit den Farbstoffkonzentrationen c_D bzw. c_A , kann δ aus der jeweiligen Absorption A_D bzw. A_A bei der Laseranregungswellenlänge (475 nm) mit folgender Formel berechnet werden (2):

$$\delta = \frac{A_A \cdot c_D}{A_D \cdot c_A}$$

Nach der Bestimmung von δ kann man die bereits bekannten Korrekturparameter α und γ zu α' und γ' umrechnen, um die direkte Akzeptoranregung durch den Laser zu berücksichtigen (3):

$$\alpha' = \frac{\alpha + \gamma \cdot \delta}{1 + \beta \cdot \gamma \cdot \delta} \quad \text{bzw.} \quad \gamma' = \frac{\gamma + \gamma \cdot \delta}{1 + \beta \cdot \gamma \cdot \delta}$$

Der Kreuzdetektionsparameter β wird durch δ dagegen nicht beeinflusst. Die Werte α (bzw. α'), β und γ (bzw. γ') können nun zur Ermittlung von FRET-Effizienzen und zur Erstellung von Histogrammen und zeitlichen FRET-Diagrammen verwendet werden.

3.9.5 FCS

3.9.5.1 Theorie

Bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)⁸⁰ versucht man, aus Fluktuationen der Intensität von fluoreszierenden Partikeln Informationen über ihre Diffusion zu gewinnen. Die Grundlage der FCS ist ein konfokales Mikroskop mit einer anschließenden Detektion von Einzelphotonen, so dass der vorliegende smFRET-Aufbau für diese Methode verwendet werden kann. Die fluoreszierenden Teilchen in der Probe benötigen eine bestimmte Zeit, um den Anregungsfokus des Lasers zu durchqueren. Somit besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass sich zu zwei verschiedenen Zeitpunkten während der Messung dasselbe oder zwei verschiedene Partikel dort befinden. Diese zeitliche Korrelation der Fluoreszenzintensitäten wird durch die sogenannte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ausgedrückt. Ein Zeitdiagramm aus einer

smFRET-Messung mit einer markierten Probe, das in bestimmten Abständen *Bursts* enthält, kann zu einer Autokorrelationskurve transformiert werden. Diese gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass sich zum Zeitpunkt $t = \tau$ ein Teilchen im Anregungsfokus des Lasers befindet, wenn bei $t = 0$ bereits eines dort war. $G(\tau)$ kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werden (1):

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N \cdot \left(1 + \frac{4 \cdot D \cdot \tau}{\omega_{xy}^2}\right) \cdot \sqrt{1 + \frac{4 \cdot D \cdot \tau}{\omega_z^2}}}$$

In dieser Gleichung ist N die mittlere Teilchenzahl im Anregungsfokus des Lasers, d. h. im konfokalen Volumen. Dieses ist annähernd ein Ellipsoid mit der Länge ω_z (entlang der optischen Achse z) und dem Durchmesser ω_{xy} . Außerdem ist die Diffusionskonstante D des Teilchens (in $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) in der Formel enthalten. Die Autokorrelationskurve einer smFRET-Messung wird mit einer logarithmischen Zeitachse aufgetragen und zeigt im μs -Bereich ein Plateau bei $G(\tau) > 1$, dessen Höhe umgekehrt proportional zur mittleren Teilchenanzahl im Fokus N ist. Eine unvermeidliche Hintergrundaktivität während der Messung sorgt allerdings für eine gewisse Reduzierung der Amplitude. Bei höheren Zeitskalen nähert sich die Kurve einem Endwert von $G(\tau) = 1$ an. Unterhalb von wenigen μs wird die gemessene Autokorrelation durch die Totzeit der APDs (150 ns) sowie durch das sogenannte Nachpulsen verzerrt. Bei diesem Störeffekt sendet eine APD nach der Detektion eines Photons mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit direkt anschließend ein zweites Signal an die Zählkarte. Somit wird für FCS nur der Teil der Autokorrelationskurve oberhalb von 10 μs betrachtet. Der Zeitpunkt $\tau = \tau_D$, bei dem die Kurve auf 50 % des Anfangswerts abgefallen ist, wird als Diffusionszeit bezeichnet. τ_D gibt an, wie lange ein einzelnes fluoreszierendes Teilchen durchschnittlich benötigt, um den Laserfokus zu durchqueren (2):

$$\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4 \cdot D}$$

Das smFRET-System ist in der Lage, Donor- und Akzeptorphotonen in zwei verschiedenen Detektionskanälen zu erfassen. Somit werden zwei getrennte Autokorrelationskurven für die Donor- und Akzeptorfluoreszenz berechnet. Außerdem kann eine Kreuzkorrelationskurve erstellt werden, die die Wahrscheinlichkeit angibt, dass zum Zeitpunkt $t = \tau$ ein Akzeptorsignal empfangen wird, wenn bei $t = 0$ ein Donormolekül im Fokus ist (und andersherum). Aus dieser Kurve lässt sich ablesen, ob gleichzeitig Donor- und Akzeptorfarbstoffe durch das Anregungsvolumen wandern, d. h. ob es sich bei der Probe tatsächlich um ein mit beiden Fluorophoren doppelmarkiertes Protein handelt. Allerdings wird die Kreuzkorrelation durch die Kreuzdetektion (Korrekturparameter α und β) beeinflusst, so dass sie auch

dann vorliegt, wenn nur eines der beiden Fluorophore in der Lösung enthalten ist. Mischt man einzelmarkierte Komponenten (Protein-Donor und Protein-Akzeptor) miteinander, so ändert sich die Kreuzkorrelation, wenn die beiden Partner dimerisieren. Wenn sie dagegen keine Verbindung eingehen und getrennt durch den Fokus wandern, entspricht die Kreuzkorrelation derjenigen von Protein-Donor allein in Abwesenheit von Akzeptor.

3.9.5.2 Bestimmung des konfokalen Volumens

Das konfokale Volumen, in dem fluoreszierende Partikel durch das Laserlicht angeregt werden, ist annähernd ein Ellipsoid mit dem radialen Durchmesser ω_{xy} und dem axialen Durchmesser ω_z . Durch eine smFRET-Messung mit einem Fluorophor, dessen Diffusionskoeffizient D bekannt ist, können diese Abmessungen durch eine Kurvenanpassung mit der Autokorrelationsgleichung (für den Donorkanal) bestimmt werden. Als Referenzverbindung wird in diesem Fall Uranin (Na^+ -Fluorescein) gewählt, da es einen hohen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{490} = 93000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und im alkalischen Bereich eine günstige Quantenausbeute ($\Phi = 0,93$) aufweist. Mit einer Lösung aus 4 nM Uranin in 0,1 M NaOH (200 μl) wird in einem Zeitraum von 30 min bei RT eine smFRET-Messung ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$, Anregungsintensität = 75 μW) durchgeführt, so dass sich eine glatte Donorautokorrelationskurve ergibt. Die hohe Konzentration des Fluorophors wurde gewählt, um den störenden Effekt des Hintergrundrauschens zu minimieren. Als Diffusionskonstante D wird $280 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ angenommen, was dem Wert von TMR entspricht⁷⁹. Diese Gleichsetzung ist zulässig, da die beiden Farbstoffe TMR und Uranin ein ähnliches Molekulargewicht und eine ähnliche Struktur aufweisen. Aus den Dimensionen ω_{xy} und ω_z , die durch die Kurvenanpassung ermittelt wurden, kann das Volumen des ellipsoiden Anregungsfokus V_k berechnet werden (1):

$$V_k = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \omega_{xy}^2 \cdot \omega_z$$

3.9.5.3 Bestimmung von Diffusionskonstanten

Die Bestimmung von Diffusionskonstanten erfolgt durch eine smFRET-Messung mit der Probe und anschließender Autokorrelationsbetrachtung. Dazu müssen die genauen Abmessungen des konfokalen Volumens ω_{xy} und ω_z bekannt sein. Die FCS-Messung wird mit einer hohen Probenkonzentration durchgeführt, um den störenden Einfluss der Hintergrundzählrate zu minimieren. Im vorliegenden Experiment soll geprüft werden, ob die Diffusion eines markierten Proteins nach der Zugabe von Plasmid-DNA abnimmt, d. h. ob bei den vorliegenden Konzentrationen eine Substratbindung durch das Enzym erfolgt. Nach der Theorie skaliert die Diffusionsrate ungefähr mit dem Kehrwert der dritten Wurzel des Molekulargewichts⁸¹, so dass sich eine Anlagerung des fünfmal schwereren Plasmids an die

Gyrase in einer FCS-Messung deutlich bemerkbar machen sollte. 4 nM GyrA oC T408C (4.1.6), das mit dem Donorfarbstoff Alexa488 markiert wurde (4.4.3), wird in einer smFRET-Messung bei RT und $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$ 30 min bei 75 μW angeregt und die Donorautokorrelationskurve aufgezeichnet. Die Konzentration von 4 nM bezieht sich auf die Menge des gekoppelten Farbstoffs im Ansatz, da unmarkierte Proteine in der FCS-Messung nicht detektiert werden. Aus der gemessenen Kurve können durch eine Anpassung mit der Autokorrelationsgleichung die Diffusionskonstante D von GyrA (Einheit: $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) sowie die mittlere Teilchenanzahl im Laserfokus N bestimmt werden. Die Messung wird nach Zugabe von 1 μM GyrB WT bzw. einer unterschiedlichen Menge an ethanolgefälltem pUC18 jeweils wiederholt, um den Einfluss der Liganden auf die GyrA-Diffusion zu untersuchen. Trägt man D gegen die pUC18-Konzentration auf, so erhält man eine Kurve, die zuerst fällt und danach in einen Sättigungsbereich übergeht. Aus diesem Diagramm lässt sich durch eine Kurvenanpassung die Dissoziationskonstante K_D (Gyrase/pUC18) abschätzen. Die dafür notwendige Gleichung ergibt sich aus einem einfachen 1:1-Bindungsmodell und wird in 7.2.1 hergeleitet. Die gemessene Diffusionsrate lässt sich folgendermaßen beschreiben (1):

$$D = D_0 - \Delta D \cdot \frac{[ES]}{[E]_0}$$

$$D = D_0 - \frac{\Delta D}{[E]_0} \cdot \left(\frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2} \right)^2 - [E]_0 \cdot [S]_0} \right)$$

Darin sind $[E]_0$ und $[S]_0$ die eingesetzten Enzym- bzw. Substratkonzentrationen in jedem Ansatz, $[ES]$ die Konzentration des Gyrase-pUC18-Komplexes, D_0 der Diffusionskoeffizient von Gyrase in Abwesenheit von pUC18 und ΔD die maximale Änderung der Diffusion im Sättigungsbereich. Im Gegensatz zu einer Fluoreszenz- bzw. Anisotropietitration wird in der FCS-Messung nicht das Enzym, sondern das Substrat im Überschuss hinzugegeben, so dass die Sättigung dann vorliegt, wenn $[ES]$ der eingesetzten Enzymmenge $[E]_0$ entspricht. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass diese Auswertung durch eine vermutlich auftretende Bindung von mehreren Gyrasemolekülen an dasselbe Plasmid beeinträchtigt ist. Die beschriebene FCS-Messung mit markierter Gyrase erlaubt daher (ähnlich wie GEMSA) nur die Bestimmung der Größenordnung der Bindungskonstante.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinreinigung

4.1.1 Vorbehandlung

Die beiden Untereinheiten der Gyrase wurden in separaten Ansätzen hergestellt und gereinigt. GyrA und GyrB wurden jeweils in 1 l AIM ÜN bei 37°C heterolog in *E. coli*-Zellen überproduziert und diese danach vorzugsweise mit dem *Microfluidizer* aufgeschlossen, da er eine höhere Ausbeute liefert als ein Ultraschallstab. Das Protein kann ebenso in einer Fermenterflasche mit 4 l LB-Medium produziert werden, allerdings sind die viermal kleineren AIM-Kolbenansätze zeit- und arbeitstechnisch deutlich komfortabler. Der Rohextrakt von GyrA (ca. 30 – 50 ml) darf unter keinen Umständen mit Ammoniumsulfat gefällt werden, da dies zu einer vollständigen und irreversiblen Denaturierung der Untereinheit führt. Diese Lösung muss daher direkt unter Verwendung eines 50-ml-*Superloops* auf die Heparin-Sepharose aufgetragen werden. Dagegen kann der GyrB-Rohextrakt ohne Verlust der Stabilität mit 50 % Ammoniumsulfat gefällt und auf ein kleines Volumen (3 – 4 ml) reduziert werden, das anschließend bequem mit einer 5-ml-Schleife auf die Säule geführt werden kann. Fällungen mit PEI bzw. Streptomycinsulfat sind zwar prinzipiell mit beiden Untereinheiten möglich, führen jedoch zu keiner vollständigen Beseitigung der DNA. Da diese Komponente sowie andere Nukleotide auch durch die später verwendeten Heparin- bzw. S200-Säulen abgetrennt werden können, wurde auf derartige Fällungen im Reinigungsprotokoll schließlich verzichtet. In jedem Fall müssen GyrA und GyrB vor der ersten Chromatographie in Heparin-A-Puffer dialysiert werden, um die NaCl-Konzentration auf 0,2 M zu reduzieren und eine Anlagerung an das Säulenmaterial zu ermöglichen.

4.1.2 Heparin-Sepharose

Der GyrA-Rohextrakt wurde in Heparin-A-Puffer (mit 0,2 M NaCl) auf eine 5-ml-Heparinsäule geleitet und mit dem gleichen Puffer nachgespült, bis keine Absorption bei 280 nm mehr detektiert werden konnte. Anschließend wurde ein linearer 100-ml-Gradient zu Heparin-B-Puffer (mit 2 M NaCl) gefahren und das Protein in 1-ml-Fractionen eluiert. Abb. 15 (obere Reihe) zeigt das Chromatogramm der Elution, die während den ersten 50 ml des Gradienten stattfindet. Das nebenstehende Foto zeigt einzelne Fractionen, die zur Reinheitskontrolle mit 10%iger SDS-PAGE analysiert wurden. Ein Vergleich der Spuren, die den Rohextrakt bzw. den Durchlauf enthalten, zeigt, dass die meisten Fremdproteine bei 0,2 M NaCl durch die Säule hindurchlaufen, ohne daran zu binden. Die gewünschte Gyrase-Untereinheit besitzt dagegen eine relativ hohe Affinität zur Heparin-Sepharose. Der Wildtyp und alle stabilen Mutanten von GyrA zeigen anschließend einen charakteristischen A_{280} -Elutionsverlauf mit einem

größeren Signal (Breite ca. 30 ml), bei dem es sich um eine Überlagerung aller Einzelkomponenten handelt. GyrA eluiert hauptsächlich bei der Spitze und im rechten Teil des Signals, was einer Salzkonzentration von ca. 0,6 – 0,8 M NaCl entspricht. Im Gelbild sind an dieser Stelle äußerst starke GyrA-Banden bei etwa 90 – 95 kDa sichtbar (Theorie: 92,1 kDa), wobei der Bereich um das Absorptionsmaximum herum noch relativ deutlich mit Fremdproteinen kontaminiert ist. Rechts von der Spitze liegt der manuell abgelesene GyrA-Anteil im Extrakt dagegen oberhalb von 90 %. Gegen Ende des Signals befinden sich dann praktisch keine störenden *E. coli*-Proteine mehr in den Fraktionen. Am Ende der Chromatographie werden die Fraktionen, die im Foto sowie im Chromatogramm durch graue Linien gekennzeichnet sind, vereinigt (ca. 10 – 12 ml) und weiterverarbeitet. Ein gewisser Teil von GyrA (in Fraktion „B“) geht bei dieser Methode leider verloren, was man jedoch angesichts der hervorragenden Reinigungseffizienz in Kauf nehmen kann. Heparin-Sepharose ist in der Lage, aus einem unbehandelten Rohextrakt die Untereinheit GyrA in großer Menge und mit mindestens 90%iger Reinheit zu extrahieren.

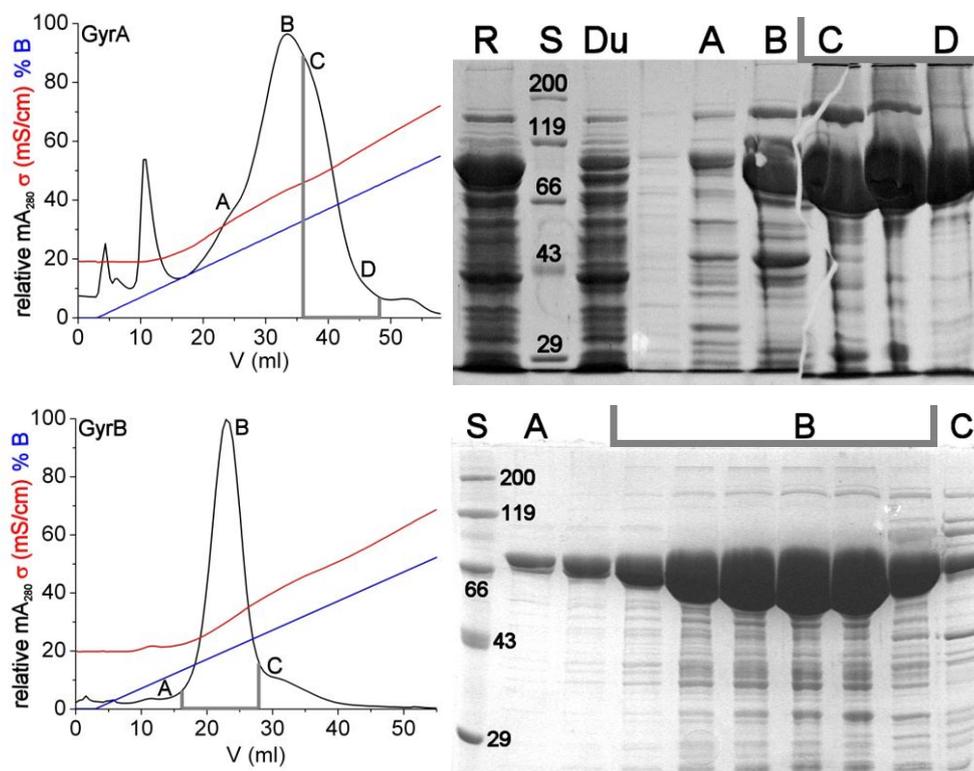


Abbildung 15: Separate Reinigung von GyrA (obere Reihe) bzw. GyrB (untere Reihe) mit Heparin-Sepharose. Die beiden Chromatogramme zeigen den relativen Verlauf der A_{280} (schwarze Linie) im Bereich der Proteinelution. Außerdem sind der Gradient (in % Heparin-B-Puffer; blaue Linie) und die Leitfähigkeit σ (in mS/cm; rote Linie) eingezeichnet. A, B, C bzw. D deuten die Position derjenigen Fraktionen an, die im dazugehörigen Gelbild (10 % SDS-PAGE) analog beschriftet sind. Die Spuren R bzw. Du enthalten den aufgetragenen GyrA-Rohextrakt bzw. eine Fraktion des Durchlaufs. S bezeichnet den Molekulargewichtsstandard (die Zahlen geben die Größe der Proteine in kDa an). Beide Untereinheiten können durch eine Chromatographie mit Heparin-Sepharose schön von den übrigen Bestandteilen des jeweiligen Rohextraktes getrennt werden. Graue Linien zeigen die Fraktionsbereiche an, die anschließend vereinigt und weiterverarbeitet wurden.

Die Reinigung von GyrB über die Heparinsäule unterscheidet sich von der GyrA-Prozedur v. a. dadurch, dass während des Auftrags eine DEAE-Säule vor die Heparinsepharose geschaltet wurde. DNA lässt sich durch die Verwendung dieses schwachen Anionenaustauschers größtenteils aus dem Rohextrakt beseitigen, während GyrB und die meisten Kontaminanten bei pH = 7,5 hindurchwandern. Die gewünschte Gyrase-Untereinheit zeigt daraufhin eine deutliche Affinität zu Heparin, wenn auch nicht ganz so hoch wie GyrA. Der größte Teil der *E. coli*-Proteine wandert bei einer niedrigen Salzkonzentration (0,2 M NaCl) – analog zur GyrA-Reinigung – durch die Säule, ohne daran zu binden. Vor dem Beginn des linearen Gradienten (100 ml von Heparin-A- bis Heparin-B-Puffer) muss die DEAE-Säule unbedingt entfernt werden, da GyrB ansonsten sehr breit und schlecht definierbar eluiert. Abb. 15 (untere Reihe) zeigt das Chromatogramm der Elution sowie das dazugehörige Gelfoto mit ausgewählten Fraktionen (10%ige SDS-PAGE). Das rekombinante Protein erzeugt starke Gelbanden bei ca. 70 kDa (Theorie: 71,5 kDa), die hauptsächlich bei einer Salzkonzentration von 0,3 – 0,5 M NaCl erscheinen. Bei fast der gesamten Gradientenbreite liegt eluiertes GyrB schon mit einer Reinheit von über 90 % vor, während gegen Ende der Elution (bei etwa 50 % Heparin-B-Puffer) der relative Anteil der Kontaminanten wieder leicht zunimmt. Diejenigen Fraktionen, die im Foto bzw. im Chromatogramm mit grauen Linien gekennzeichnet sind, werden vereinigt und weiterverarbeitet, wobei die GyrB-Reinheit einen Wert von 95 % der Gesamtproteinmenge übersteigt.

4.1.3 Blaue Sepharose

Das vereinigte GyrB-Eluat aus der Heparinreinigung wurde auf eine blaue Sepharosesäule aufgetragen. Da diese Untereinheit eine ATPase-Domäne besitzt, sollte sie hochaffin an den Farbstoff *Cibacron blue* binden, der Adeninnukleotide imitiert. Tatsächlich lagert sich die Untereinheit bei niedriger Salzmenge (0,2 M NaCl) an das Säulenmaterial an und bleibt auch dort, bis die NaCl-Konzentration durch einen linearen Gradienten (100 ml) langsam erhöht wird. Leider tritt im Vergleich zur aufgetragenen Lösung kein weiterer Reinigungseffekt ein, da GyrB sowie alle noch vorhandenen Kontaminanten über einen relativ breiten Gradientenbereich hinweg eluieren und keine nennenswerte Trennung der Komponenten stattfindet. Die blaue Sepharose wurde daher nicht in das GyrB-Reinigungsprotokoll aufgenommen.

Trägt man GyrA auf blaue Sepharose auf, so bindet das Protein überraschenderweise äußerst stark an das *Cibacron-blue*-Material, obwohl diese Untereinheit keine Bindestelle für ATP besitzt. Im Bereich des linearen Gradienten (100 ml) von Heparin-A- zu -B-Puffer eluiert nur ein sehr geringer Teil von GyrA (ca. 10 %) in einem relativ breiten Salzkonzentrationsbereich, während die restlichen 90 % des eingesetzten Proteins auch bei 2 – 3 M NaCl noch fest an das Material binden. Dieser Anteil lässt sich erst durch den Einsatz eines Denaturierungsmittels (6 M GdmCl) von der Säule ablösen, so dass diese Methode für eine Reinigung von nativem GyrA ungeeignet ist.

4.1.4 Größenausschlusschromatographie

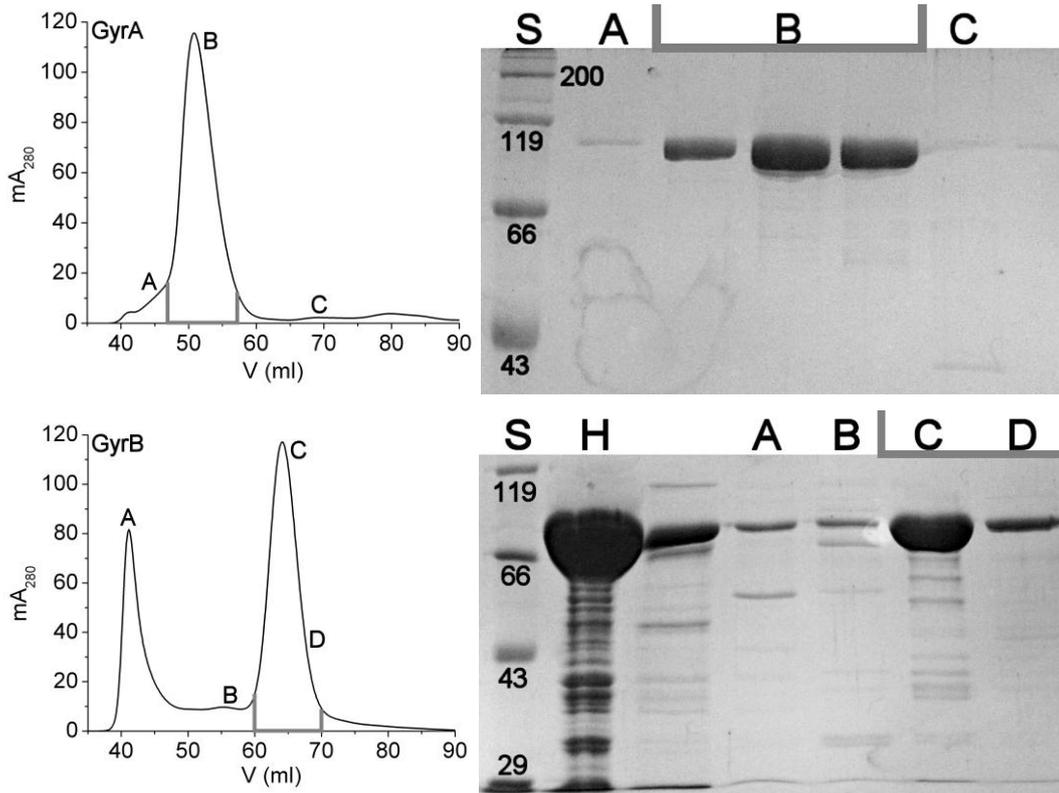


Abbildung 16: Separate Reinigung von GyrA (obere Reihe) bzw. GyrB (untere Reihe) mit S200-Gelfiltration. Die beiden Chromatogramme zeigen den relativen Verlauf der A_{280} in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen nach der Probeninjektion. A, B, C bzw. D deuten die Position derjenigen Fraktionen an, die im dazugehörigen Gelbild (10 % SDS-PAGE) analog beschriftet sind. Die Spur H enthält das vereinigte Eluat aus der vorherigen GyrB-Heparinreinigung und S bezeichnet den eingesetzten Molekulargewichtsstandard (die Zahlen geben die Größe der Proteine in kDa an). Die Reinheit von beiden Untereinheiten kann durch Gelfiltration deutlich erhöht werden. Graue Linien zeigen die Fraktionsbereiche an, die anschließend vereinigt und weiterverarbeitet wurden.

Beide Untereinheiten wurden in separaten Ansätzen auf eine S200-Größenausschluss säule aufgetragen, um die Reinheit der rekombinanten Proteine weiter zu erhöhen. Das Probenvolumen wurde zuvor in beiden Fällen durch eine Zentrifugation in Filtrerröhrchen auf 1,5 – 2 ml reduziert. GyrA verlässt die Säule bei einem Elutionsvolumen von ca. 51 ml nach der Probeninjektion und kann von kleineren Kontaminanten getrennt werden, die eine geringere Mobilität in der Gelfiltration aufweisen. Abb. 16 (obere Reihe) zeigt das Chromatogramm sowie das dazugehörige Gelbild (10%ige SDS-PAGE), in dem die Reinheit des gewünschten Enzyms nach dem Ende des S200-Laufes sichtbar ist. DNA sowie Proteinaggregat eluieren wenige Minuten früher als GyrA (bei ca. 40 – 45 ml). Die DNA-freien Fraktionen im Bereich von ungefähr 47 – 57 ml (bzw. innerhalb der grauen Linien in Abb. 16) enthalten die Gyrase-Untereinheit (Reinheit > 99 %) und werden vereinigt.

GyrB eluiert erst bei einem Volumen von ca. 64 ml nach der Probeninjektion (Abb. 16; untere Reihe). DNA und Aggregat ($V_E = 40 - 45$ ml) sowie weitere Komponenten, die deutlich kleiner bzw. größer sind als das rekombinante Enzym, können durch eine S200-Größenausschlusschromatographie beseitigt werden. Nach der Vereinigung der Fraktionen im Elutionsbereich (ca. 60 – 70 ml) erhält man eine Lösung, in der der Anteil von GyrB bei ca. 98 – 99 % liegt.

4.1.5 Reinigungsprotokolle

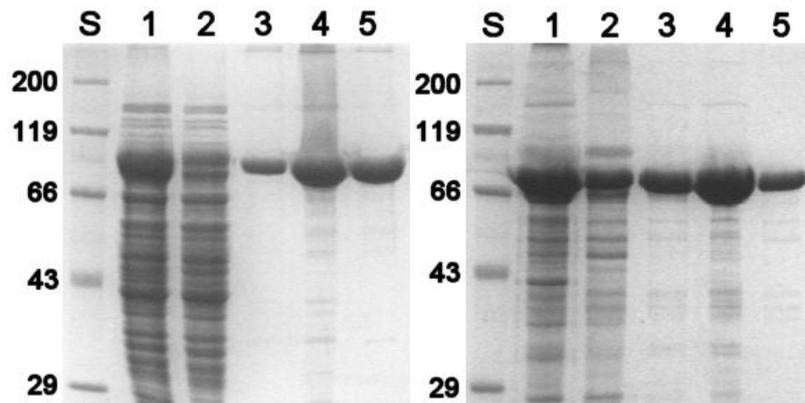


Abbildung 17: Reinigung der Gyrase-Untereinheiten. Das linke Bild (GyrA; 10%ige SDS-PAGE) zeigt den Rohextrakt (Spur 1), den Durchlauf bei der Heparinchromatographie (2), das vereinigte Eluat nach dem Heparinlauf (3), die konzentrierte Probe vor der Gelfiltration (4) und das Endergebnis nach dem S200-Lauf (5). Das rechte Foto zeigt entsprechend den Zustand nach denselben Schritten während der GyrB-Reinigung. S bezeichnet den Standard (die Zahlen geben die Größe der Proteine in kDa an). GyrA und GyrB können mit den vorliegenden Protokollen in großer Menge mit einer Reinheit von ca. 99 % hergestellt werden.

Mit den beiden vorliegenden Reinigungsprotokollen lassen sich die zwei Untereinheiten der Gyrase mit einer hohen Ausbeute und in einer etwa 98 – 99%igen Reinheit herstellen (Abb. 17). Durch den Einsatz der Heparinsäule, zu der sowohl GyrA als auch GyrB eine hohe Affinität zeigen, sowie durch S200-Gelfiltration kann praktisch der gesamte *E. coli*-Proteinanteil entfernt werden. Die Absorptionsspektren von GyrA WT, GyrB WT sowie allen stabilen Mutanten zeigen einen typischen Verlauf mit einem Maximum bei ca. 278 nm. Beide Untereinheiten weisen einen vergleichsweise hohen Tyrosinanteil auf, so dass der maximale Extinktionskoeffizient nicht bei 280 nm, sondern jeweils 2 nm darunter liegt. Das Verhältnis A_{280}/A_{260} liegt bei allen stabilen Ansätzen in einem Konzentrationsbereich von 50 – 100 μ M bei ca. 2,0, was die Reinheit der rekombinanten Proteine unterstreicht. Weder präzipitiert ein Teil der Moleküle zu Aggregat, noch liegen störende Kontaminanten wie DNA oder ATP mit einem Absorptionsmaximum von jeweils 260 nm vor. Bei einer Verwendung von AIM beträgt die Ausbeute nach dem Abschluss der Reinigung mindestens 6 mg (GyrA) bzw. 8 mg (GyrB) pro Liter der eingesetzten Bakterienkultur. Die folgende Tabelle (Tab. 2) gibt einen Überblick über die Reinigungsprotokolle für die beiden Gyrase-Untereinheiten GyrA bzw. GyrB.

| Untereinheit | GyrA | GyrB |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Überproduktion in <i>E. coli</i> | in 1 l AIM | in 1 l AIM |
| Zellaufschluss | <i>Microfluidizer</i> | <i>Microfluidizer</i> |
| Proteinfällung | keine | 50 % Ammoniumsulfat |
| Dialyse | in Heparin-A-Puffer | in Heparin-A-Puffer |
| erste Chromatographie | Heparin-Sepharose | Heparin-/DEAE-Sepharose |
| Elution | bei 0,6 – 0,8 M NaCl | bei 0,3 – 0,5 M NaCl |
| Konzentration | auf 1,5 – 2 ml | auf 1,5 – 2 ml |
| zweite Chromatographie | S200-Säule | S200-Säule |
| Elution nach Probeninjektion | bei ca. 47 – 57 ml | bei ca. 60 – 70 ml |
| Konzentration | auf 50 – 100 µM | auf 50 – 100 µM |
| Lagerung | Schockfrieren und -80°C | Schockfrieren und -80°C |

Tabelle 2: Reinigungsprotokolle für die beiden Gyrase-Untereinheiten GyrA und GyrB.

4.1.6 Überblick über alle Mutanten

| Mutante bzw. WT | Mutationsort/-typ | R [nm] | Status | Aktivität |
|-------------------------------|-------------------|--------|--------------------|-----------|
| GyrA WT | – | – | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA Y123F | aktives Tyrosin | – | gereinigt (stabil) | inaktiv |
| GyrA C350L (= GyrA oC) | natives Cystein | – | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC S117C | DNA-Tor | 3,0 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC T140C | DNA-Tor | 3,4 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC G152C | DNA-Tor | 3,2 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC S153C | DNA-Tor | 2,6 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC S395C | C-Tor | 1,4 | gereinigt (stabil) | inaktiv |
| GyrA oC N399C | C-Tor | 2,4 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC T408C | C-Tor | 3,5 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC Q413C | C-Tor | 3,7 | gereinigt (stabil) | schwach |
| GyrA oC Q445C | C-Tor | 4,7 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC K449C | C-Tor | 5,8 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC K594C | GyrA CTD | 7,4 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC E726C | GyrA CTD | 12,9 | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrA oC E797C | GyrA CTD | ~13 | gereinigt (stabil) | schwach |
| GyrB WT | – | – | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrB E44Q | ATPase-Defizienz | – | gereinigt (stabil) | inaktiv |

| | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----|-------------------------|---------|
| GyrB C58L | natives Cystein | – | gereinigt (stabil) | schwach |
| GyrB C414A bzw. C414D | natives Cystein | – | nicht/kaum stabil | – |
| GyrB C414L | natives Cystein | – | mutiert/nicht gereinigt | ? |
| GyrB C414S | natives Cystein | – | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrB C58D C414S | natives Cystein | – | gereinigt (fällt aus) | – |
| GyrB C58S C414S (= GyrB oC) | natives Cystein | – | gereinigt (stabil) | aktiv |
| GyrB oC E2C | N-Tor | 5,8 | gereinigt (fällt aus) | – |
| GyrB oC S7C | N-Tor | 5,1 | Mutagenese erfolglos | ? |
| GyrB oC Q14C | N-Tor | 2,6 | gereinigt (fällt aus) | – |
| GyrB oC E17C | N-Tor | 1,3 | gereinigt (fällt aus) | – |
| GyrB oC I84C | N-Tor | 3,5 | gereinigt (fällt aus) | – |
| GyrB oC R90C | N-Tor | 2,8 | gereinigt (fällt aus) | – |
| GyrB oC E131C | N-Tor | 4,2 | gereinigt (fällt aus) | – |
| GyrB oC P175C | N-Tor | 4,3 | gereinigt (fällt aus) | – |

Tabelle 3: Überblick über alle gereinigten Gyrasekonstrukte. R (dritte Spalte) ist der Abstand in nm zwischen einer mutierten Aminosäure und der gleichartigen, d. h. ebenso mutierten Aminosäure auf der anderen (identischen) Kette in einem GyrA- bzw. GyrB-Dimer. Gemessen wurde jeweils zwischen den beiden α -C-Atomen in den Strukturen, die in Abb. 18 zu sehen sind. Das verbleibende native Cystein (C58) in der Mutante GyrB C414S liegt in der Nähe des N-Tores und weist einen Abstand von 5,7 nm zu seinem entsprechenden Gegenpart in der anderen Aminosäurekette auf. Mit allen fettgedruckten Ansätzen (erste Spalte) wurden anschließend Fluoreszenzmarkierungstests durchgeführt. Die Aktivität der unmarkierten Mutanten (letzte Spalte) ist in 4.2.1.3 beschrieben.

Ein Überblick über alle hergestellten Mutanten bzw. WT-Reinigungen findet sich in Tab. 3. Angegeben sind jeweils die Art bzw. Position der Mutation, der Abstand R zwischen gleichartigen Aminosäuren im symmetrischen GyrA-/GyrB-Dimer, der Reinigungsstatus, die Stabilität und (sofern sinnvoll) die DNA-Topoisomerisierungsaktivität der Ansätze.

Die sechs dreidimensionalen Darstellungen in Abb. 18 zeigen die Position der Mutationen in den verschiedenen Bereichen der Gyrase. Dargestellt sind das C-Tor von der Seite bzw. von unten (PDB-Bezeichnung 1AB4), das N-Tor von der Seite bzw. von oben (1AJ6), das DNA-Tor (1AB4) sowie die CTD von GyrA (1ZI0; alle Strukturen zeigen das homologe *E. coli*-Protein an).

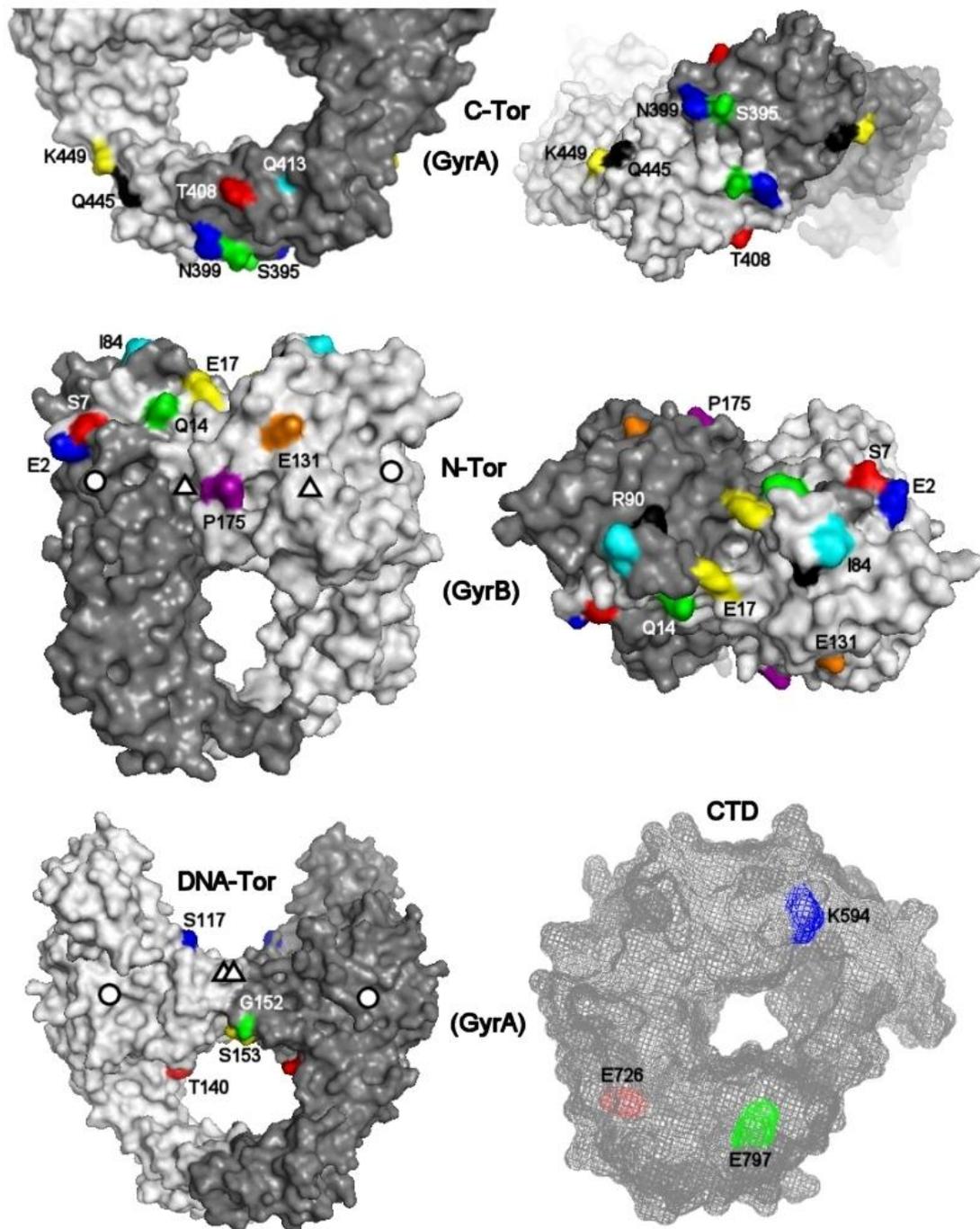


Abbildung 18: 3D-Darstellung aller gereinigten Gyrasevarianten. Die Bilder zeigen das Dimer aus den N-terminalen GyrA-Domänen (oben links/rechts sowie unten links), das (durch AMPPNP induzierte) Dimer aus den N-terminalen GyrB-Domänen (Mitte links/rechts) und die C-terminale Domäne von GyrA (CTD; unten rechts). Die farbigen Reste kennzeichnen die Positionen, die für eine spätere Fluoreszenzmarkierung gegen Cysteine ausgetauscht wurden. Gleichartige Mutationen auf den zwei identischen Aminosäureketten (weiß bzw. grau) des Dimers haben jeweils den Abstand R (siehe auch Tabelle 3) und sind mit derselben Farbe markiert. Die Monomerstruktur von GyrA CTD ist als Gitternetz dargestellt, damit auch die Position E726 erkennbar ist, die sich auf der Rückseite befindet. Kreise deuten native Cysteine an, die sich im Inneren (GyrA C350, Bild unten links) bzw. in einer Tasche (GyrB C58, Bild mitte links) befinden. Dreiecke kennzeichnen die Position der Inaktivitätsmutationen GyrA Y123F (Bild unten links) bzw. GyrB E44Q (Bild Mitte links) im Inneren der jeweiligen Untereinheit.

4.2 Aktivität

4.2.1 DNA-Topoisomerisierung durch Gyrase

4.2.1.1 Standard-Aktivitätstest

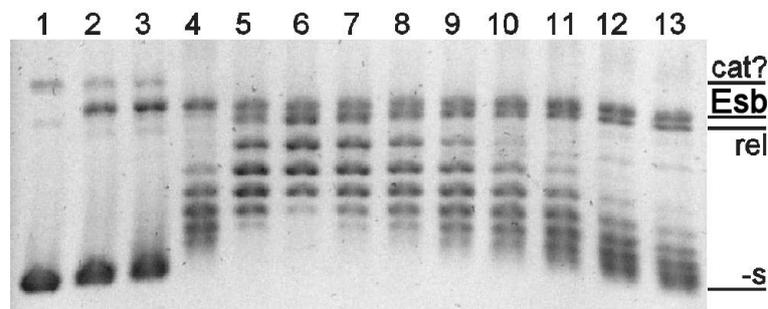


Abbildung 19: Standard-Aktivitätstest. 200 nM GyrA WT, 800 nM GyrB WT und 15 nM pUC18 wurden vermischt und zu den Zeitpunkten 1 min (2), 5 min (3), 20 min (4), 60 min (5) und 120 min (6) die ATP-unabhängige Relaxation des Plasmids bei 37°C verfolgt. Nach der anschließenden Zugabe von 1,5 mM ATP zum Ansatz findet eine ATP-abhängige negative Superspiralisierung von pUC18 statt. Die Spuren zeigen den Zustand nach 30 s (7), 1 min (8), 2 min (9), 3 min (10), 5 min (11), 10 min (12) bzw. 30 min (13). Spur 1 enthält natives (negativ superspiralisiertes) pUC18 in Abwesenheit von Protein und ATP. Auf einen DNA-Marker mit linearen Fragmenten wurde verzichtet, da er nicht mit Topoisomeren, d. h. unterschiedlich schnell laufenden Spiralisierungsstufen desselben Plasmids, verglichen werden kann. Abkürzungen: -s = negativ superspiralisiertes pUC18, rel = relaxiertes pUC18, Esb = pUC18 mit Einzelstrangbruch, cat? = mutmaßliche Catenanstrukturen.

Die DNA-Topoisomerisierung durch Gyrase wurde mit einem eindimensionalen Standard-Aktivitätstest untersucht. 200 nM GyrA WT und 800 nM GyrB WT wurden zusammen mit 15 nM pUC18 vermischt und zunächst die ATP-unabhängige Relaxierung bei 37°C untersucht (Abb. 19). Das Plasmid lag zu Beginn der Reaktion negativ superspiralisiert vor und wurde im Verlauf von etwa 2 h weitgehend relaxiert. Nach 120 min existierten nur noch etwa die fünf niedrigsten Spiralisierungsstufen im Ansatz. Eine vollständige Relaxierung, bei der sämtliche Moleküle die Windungszahl 0 besitzen, konnte dagegen auch in einem anderen Test nach 6 h nicht erreicht werden. Nach 300 – 360 min liegen zwar nur noch etwa drei Stufen vor, aber die Reaktion scheint daraufhin weitgehend beendet zu sein. Es besteht also die Möglichkeit, dass pUC18 mit weniger als 3 – 4 Superhelices nicht mehr genügend Torsionsspannung besitzt, um von der Gyrase noch effektiv weiter relaxiert zu werden. Eine Zugabe von 1,5 mM ATP zum Ansatz löst eine ATP-abhängige negative Superspiralisierung aus. Das Plasmid wird im Verlauf von ca. 10 – 30 min wieder weitgehend verdrillt, wobei diese Reaktion etwa fünfmal schneller abläuft als die Relaxierung in Abwesenheit von ATP. Am Ende der Kinetik stellt sich auf einem Niveau mit relativ hoher negativer Superspiralisierung ein Gleichgewicht zwischen beiden Reaktionen ein, d. h. der Ausgangszustand von nativem pUC18 wird nicht mehr erreicht. Bereits ca. 1 min nach Beginn der Relaxierung bis zum Ende der Messreihe ist auf dem Gelbild eine weitere Bande zu erkennen, die von

reinem pUC18 nicht erzeugt wird und etwas oberhalb der Bande verläuft, die die Windungszahl 0 anzeigt. Dabei handelt es sich wohl um Einzelstrangbruch-pUC18 (ca. 10 % der Gesamt-DNA-Menge), das offenbar im Reaktionszyklus der Gyrase temporär geschnitten wurde. Dieser Effekt kann grundsätzlich in sämtlichen Relaxierungs- und Spiralisierungstests bei allen Zeitstufen in der Kinetik beobachtet werden. Natives pUC18 enthält weiterhin eine Komponente, die eine schwache Bande oberhalb der Linearfragmente erzeugt und ca. 5 – 10 min nach Beginn der Relaxierung verschwindet. Dabei dürfte es sich um Catenanstrukturen handeln, d. h. zwei Plasmidringe sind nach der Replikation ineinander verschlungen und wandern daher mit hoher Retardation durch das Gel. Kurz nach dem Beginn der ATP-unabhängigen Relaxierung liegen keine Catenane mehr vor, da sie offensichtlich von der Gyrase durch einen temporären Doppelstrangbruch zu Einzelplasmiden getrennt werden.

Die Relaxierung sowie die ATP-abhängige negative Superspiralisierung laufen bei RT genauso schnell wie bei 37°C ab, wie ein entsprechender Test gezeigt hat. Gleiches gilt für den Fall, wenn sich im Reaktionspuffer kein β -Mercaptoethanol befindet. Es wäre also nicht nötig gewesen, die Aktivitätstests auf 37°C zu temperieren und diese anti-oxidative Substanz zu verwenden. Bei einer Relaxierung (2 h 37°C) mit anschließender Hitzebehandlung (20 min 65°C) wird die Gyrase durch die hohe Temperatur vollständig denaturiert, so dass sie mit einer Zentrifugation (10 min 13000 Upm) entfernt werden kann. In einem derart behandelten Ansatz wird das relaxierte Plasmid bei einer folgenden Zugabe von ATP während 3 h bei 37°C nicht mehr modifiziert.

Sowohl GyrA als auch GyrB behalten nach einer Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff ihre volle Aktivität für mindestens 1 – 2 Jahre nach der Herstellung, sofern sie während dieser Zeit bei -80°C gelagert wurden. Bei Abwesenheit einer der beiden Untereinheiten findet erwartungsgemäß überhaupt keine Reaktion statt (2 h 37°C), d. h. GyrA bzw. GyrB allein sind nicht in der Lage, DNA zu modifizieren. Betrachtet man die eingesetzten Konzentrationen der Reaktionspartner im Standard-Aktivitätstest, so fällt der etwa 13fache Überschuss von GyrA gegenüber dem Substrat auf. Da allerdings ein pUC18-Molekül (2686 bp) aufgrund seiner Länge vermutlich mindestens 10 Gyrasemoleküle gleichzeitig binden kann, ist davon auszugehen, dass unter den gegebenen Bedingungen ähnlich viele Proteine wie Proteinbindestellen im Ansatz vorliegen. Bei einer 37°C-Reaktion mit 15 nM pUC18, 2 μ M GyrB und katalytischen GyrA-Mengen (5 nM) kann selbst ÜN keine ATP-unabhängige Relaxierung von nativem pUC18 festgestellt werden. Plasmid, das zuerst von Gyrase vorrelaxiert (2 h 37°C) und danach hitzebehandelt wurde (20 min 65°C), zeigt nach der Zugabe von frischem Protein (5 nM GyrA + 2 μ M GyrB) und 1,5 mM ATP allerdings eine sehr schwache negative Spiralisierung ab ca. 30 min bis 3 h nach dem Start der Kinetik (37°C). Katalytische GyrA-Mengen sind also kaum bzw. gar nicht ausreichend, um die Reaktion deutlich erkennbar in Gang zu bringen.

4.2.1.2 Nukleotidanaloga

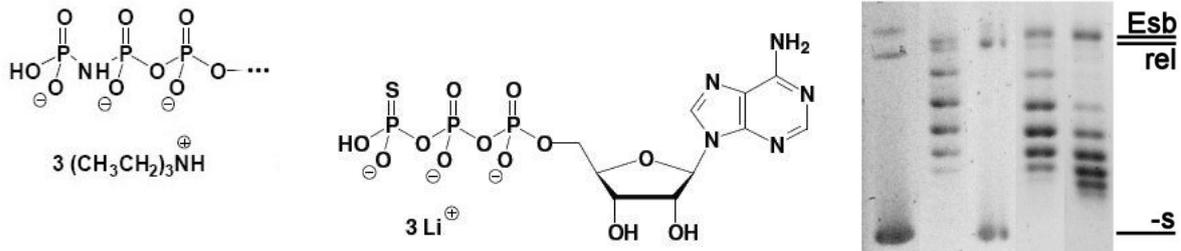


Abbildung 20: Relaxierungstests mit verschiedenen ATP-Analoga. AMPPNP (linkes Bild) besitzt zwischen dem β - und dem γ -Phosphat ein Stickstoffatom, während bei ATP γ S (mittleres Bild) ein endständiges Sauerstoffatom am γ -Phosphat durch Schwefel ersetzt ist (Quelle: Hersteller). 200 nM GyrA WT, 800 nM GyrB WT und 15 nM natives pUC18 (Spur 1) wurden mit Nukleotid (bzw. H₂O) vermischt und die ATP-unabhängige Relaxierung des Plasmids jeweils nach 1 h bei 37°C betrachtet (rechtes Bild). Verwendet wurde entweder kein Nukleotid (2), AMPPNP (3), ADP (4) oder ATP γ S (5). Das Foto wurde zur besseren Veranschaulichung aus zwei verschiedenen Gelbildern zusammengesetzt. Die Anwesenheit von ADP hat keinen störenden Einfluss auf die Reaktion, während diese mit ATP γ S langsamer und mit AMPPNP gar nicht abläuft. Abkürzungen: -s = negativ superspiralisiertes pUC18, rel = relaxiertes pUC18, Esb = pUC18 mit Einzelstrangbruch.

Die Relaxierung und die Superspiralisierung von pUC18 wurden nicht nur mit ATP, sondern auch in Anwesenheit von anderen Nukleotiden getestet. 200 nM GyrA WT und 800 nM GyrB WT wurden zusammen mit 15 nM pUC18 vermischt und zunächst die ATP-unabhängige Relaxierung bei 37°C untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass 1,5 mM ADP keinen Einfluss auf die Reaktion hat, d. h. das Plasmid lag nach 1 h in den gleichen Spiralisierungsstufen vor wie in Abwesenheit von Nukleotid (Abb. 20). Bei Verwendung von 1,5 mM ATP γ S findet ebenfalls eine Relaxierung statt, wobei diese allerdings etwas langsamer abläuft als in der nukleotidfreien Kontrolle. Das schwefelhaltige ATP-Analogen behindert also ein wenig das Enzym, indem es an die ATPase-Untereinheit GyrB bindet. Die Zugabe von 1,5 mM AMPPNP führt dagegen zu einer vollständigen Inhibition der Relaxierung. Dies deutet darauf hin, dass gebundenes ATP γ S nach einer bestimmten Zeit vom Enzym gespalten wird bzw. dissoziiert, so dass das Protein mit der Relaxierung von pUC18 fortfahren kann. AMPPNP scheint das Enzym hingegen durch eine Bindung an das aktive Zentrum nachhaltig zu blockieren.

In einem anderen Test wurde zunächst relaxiertes Plasmid hergestellt, indem 200 nM GyrA WT, 800 nM GyrB WT und 15 nM pUC18 vermischt und 2 h bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurde zu vier derartigen Ansätzen je 1,5 mM Nukleotid gegeben (ATP, ADP, ATP γ S bzw. AMPPNP) und untersucht, ob eine DNA-Modifikation stattfindet. Nach 10 min bei 37°C zeigte nur der Kontrollansatz in Anwesenheit von ATP eine negative Superspiralisierung, während alle anderen Ansätze genauso relaxiert vorlagen wie vor der Zugabe des jeweiligen Nukleotids (Abb. 21). Dies ist nicht überraschend, da ADP die ATP-abhängige Reaktion nicht auslösen kann und die beiden anderen Analoga entweder gar nicht oder energetisch nur unzureichend gut gespalten werden können.

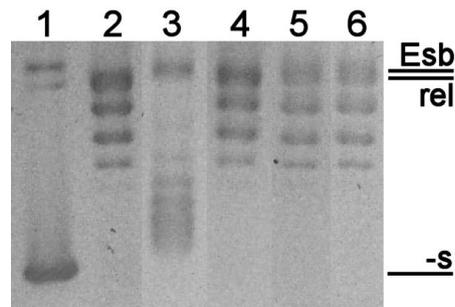


Abbildung 21: Superspiralisierungstests mit verschiedenen ATP-Analoga. 15 nM natives pUC18 (Spur 1) wurde zunächst 2 h bei 37°C mit 200 nM GyrA WT und 800 nM GyrB WT vorrelaxiert (2). Anschließend wurde 1,5 mM Nukleotid hinzugefügt und der Einfluss auf die Topoisomerisierung des Plasmids jeweils nach 10 min bei 37°C betrachtet. Verwendet wurde entweder ATP (3), AMPPNP (4), ADP (5) oder ATP γ S (6). Das Foto wurde zur besseren Veranschaulichung aus zwei verschiedenen Gelbildern zusammengesetzt. Nur in Anwesenheit von ATP findet eine negative Superspiralisierung von pUC18 statt. Abkürzungen: -s = negativ superspiralisiertes pUC18, rel = relaxiertes pUC18, Esb = pUC18 mit Einzelstrangbruch.

4.2.1.3 Aktivität von Gyrase mutanten

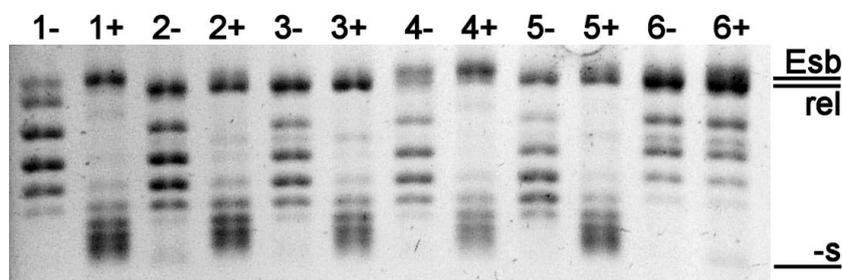


Abbildung 22: Aktivitätstests mit verschiedenen Gyrase mutanten. Die Mutanten GyrA oC S117C (2), GyrA oC T140C (3), GyrA oC G152C (4), GyrA oC S153C (5) (jeweils zusammen mit GyrB WT) sowie GyrB E44Q (6) (zusammen mit GyrA WT) wurden in einem Schnelltest auf ihre Aktivität überprüft. Bei Probe 1 handelt es sich um die Wildtyp-Kontrolle mit GyrA WT und GyrB WT. Alle sechs Ansätze zeigen eine ATP-unabhängige Relaxierung von pUC18 nach 2 h bei 37°C (Relaxierungstest; Spuren mit Minuszeichen). Die Zugabe von ATP führt beim WT und bei fast allen Mutanten zu einer ATP-abhängigen negativen Superspiralisierung des Plasmids (10 min 37°C; Pluszeichen). Nur die ATPase-defiziente GyrB-Mutante E44Q zeigt zusammen mit GyrA WT erwartungsgemäß keine Spiralisierung. Abkürzungen: -s = negativ superspiralisiertes pUC18, rel = relaxiertes pUC18, Esb = pUC18 mit Einzelstrangbruch.

Bei der inaktiven Mutante GyrA Y123F wurde das Tyrosin im aktiven Zentrum des Enzyms durch ein Phenylalanin ersetzt. Dieses Konstrukt sollte daher nicht in der Lage sein, DNA zu spalten und kovalent zu binden, so dass keine DNA-Modifikation stattfinden kann. Tatsächlich wird negativ superspiralisiertes pUC18 (15 nM) nach 2 h bei 37°C nicht relaxiert, wenn es mit 200 nM GyrA Y123F und 800 nM GyrB WT vermischt wird. GyrB E44Q enthält in der Nukleotidbindetasche statt eines essentiellen Glutamats einen Glutaminrest, so dass diese Mutante ATPase-defizient ist. 200 nM GyrA WT und 800 nM GyrB E44Q sind zwar noch in der Lage, 15 nM pUC18 normal zu relaxieren (2 h 37°C); die ATP-abhängige

Superspiralisierung nach der Zugabe von 1,5 mM ATP findet allerdings erwartungsgemäß nicht mehr statt (Abb. 22). Der Aminosäureaustausch hat also auf die ATP-unabhängige Relaxierung keinen Einfluss, blockiert aber die ATP-verbrauchende Einführung von negativen Superhelices.

Für spätere FRET-Experimente wurden beide Untereinheiten zuerst von nativen Cysteinen befreit und anschließend mit neuen Cysteinen an unterschiedlichen Stellen versehen. Mit allen gereinigten (stabilen) Mutanten wurde anschließend ein Schnelltest durchgeführt, um herauszufinden, ob die Konstrukte noch die gleiche Aktivität besitzen wie die Wildtyp-Gyrase. Bei GyrA kann das einzige native Cystein durch Leucin ersetzt werden (C350L), ohne dass die beiden Aktivitäten (Relaxierung und Spiralisierung) darunter leiden. Ebenso ist es möglich, die beiden natürlichen GyrB-Cysteine (C58 und C414) ohne jeglichen Aktivitätsverlust durch Serine auszutauschen. Eine Ersetzung dieser Cysteine durch andere Reste (Alanin, Leucin bzw. Aspartat) ergab Mutanten, die entweder instabil oder bestenfalls schwach funktionsfähig waren. Die voll aktiven Mutanten GyrA C350L (= GyrA oC; „oC“ steht für „ohne natives Cystein“) bzw. GyrB C58S C414S (= GyrB oC) dienen daher als Grundlage für die Einführung von neuen Cysteinen, um diese später mit Fluoreszenzfarbstoffen zu koppeln. Tab. 3 in 4.1.6 gibt einen Überblick über den Aktivitätszustand aller getesteten Cystein-Mutanten. Als Beispiel ist in Abb. 22 ein Gelfoto zu sehen, auf dem die WT-artige Funktionsfähigkeit der vier DNA-Tor-Mutanten zu erkennen ist.

4.2.1.4 Spaltung von Oligonukleotiden

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Gyrase mit kurzen Oligofragmenten wurde 1 μ M 60-bp-dsDNA mit jeweils 3 μ M GyrA WT und GyrB WT vermischt. Die Hälfte des Ansatzes wurde außerdem mit 1,5 mM ATP versehen. Beide Proben wurden 10 min bei 37°C inkubiert, mit einer SDS-EDTA-Mischung gestoppt und durch 2%ige Agarose-Gelelektrophorese (30 min 160 V) untersucht. Ein Kontrollansatz mit 1 μ M 60-bp-dsDNA in Abwesenheit von Protein und Nukleotid erzeugte genau eine Bande bei der erwarteten Laufweite. Es stellte sich heraus, dass die beiden proteinhaltigen DNA-Ansätze (mit bzw. ohne ATP) ebenso nur eine Bande bei 60 bp produzieren. Kleinere Fragmente (etwa 20 – 30 bp) mit einer größeren Laufweite konnten in keiner Spur auf dem Gelfoto entdeckt werden. Bei einer hohen Spaltungsaktivität würden zu jedem Zeitpunkt viele Oligonukleotide im Ansatz im geöffneten Zustand vorliegen, die nach der Zugabe der Stopplösung nicht wieder religiert werden und als kürzere Spaltprodukte durch das Gel wandern würden. Da diese nicht detektiert werden konnten, folgt daraus, dass eine temporäre Spaltung der Oligofragmente durch die Gyrase – sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von ATP – entweder äußerst selten (< 1 % der Gesamt-DNA-Menge) oder gar nicht stattfindet.

4.2.1.5 Bestimmung des Vorzeichens der Spiralisierung

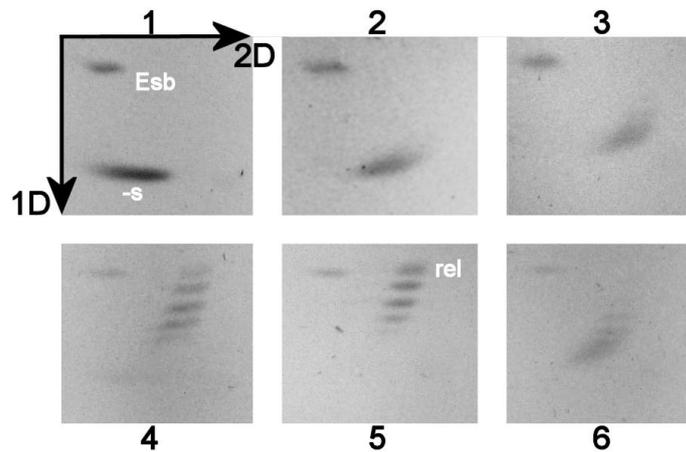


Abbildung 23: Vorzeichenbestimmung mit zweidimensionaler Agarose-Gelelektrophorese. 200 nM GyrA WT, 800 nM GyrB WT und 15 nM pUC18 wurden vermischt und die DNA-Topoisomerisierung bei 37°C zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Bild 1 zeigt unbehandeltes natives, d. h. negativ superspiralisiertes pUC18. Die weiteren Fotos zeigen den Zustand 5 min (2), 20 min (3), 60 min (4) bzw. 120 min (5) nach Beginn der Reaktion. Schwarze Pfeile geben die Laufrichtung in der ersten (1D) bzw. in der zweiten Dimension (2D) an. Die Relaxierung des Plasmids durch die Gyrase im Verlauf der Messung ist deutlich zu erkennen (3.4.3). Bild 6 zeigt die erneute negative Spiralisierung von pUC18 nach Zugabe von 1,5 mM ATP (10 min 37°C). Abkürzungen: -s = negativ superspiralisiertes pUC18, rel = relaxiertes pUC18, Esb = pUC18 mit Einzelstrangbruch.

Die DNA-Topoisomerisierung durch die Gyrase wurde auch mit zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgeklärt. 200 nM GyrA WT, 800 nM GyrB WT und 15 nM pUC18 wurden vermischt und nach bestimmten Zeitpunkten bei 37°C einzelne Aliquots entnommen und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach einem ÜN-Lauf (15 V bei 4°C) wurde das Gel in 10 mg/l Chloroquin gelagert (1,5 h bei RT), um 90° gedreht und einer erneuten Spannung (70 min 100 V) ausgesetzt. Abb. 23 zeigt eine Serie von Fotos, die den Zustand des Plasmids zu bestimmten Zeitpunkten der Kinetik angeben. Natives pUC18 liegt vollständig superspiralisiert vor, so dass auf dem Gel ein Fleck bei einer relativ hohen Laufweite in der ersten Dimension zu sehen ist. Da das Vorzeichen der Spiralisierung negativ ist, kann eine große Menge an Chloroquin in die DNA interkalieren, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit in der zweiten Dimension gering ist. Außerdem ist ein kleinerer Fleck zu erkennen, der in jedem Foto der Serie an etwa der gleichen Stelle (links oben) erscheint. Es handelt sich dabei um Einzelstrangbruch-DNA, die wegen ihrer sperrigen Form in beide Richtungen nur langsam wandert. Bei zunehmender Relaxierung von pUC18 entsteht ein Einzelbandenmuster (ab ca. 20 min nach Reaktionsbeginn), welches sich mit der Zeit immer weiter nach oben und nach rechts verschiebt. Je weiter diese Reaktion fortgeschritten ist, desto weniger Chloroquin kann in das Plasmid interkalieren und desto höher ist die anschließende Mobilität in der zweiten Dimension. Entspannte DNA weist außerdem eine geringere Mobilität in der ersten Laufrichtung auf, was ebenso in der eindimensionalen Elektrophorese beobachtet werden kann: Projiziert man die Banden nach links auf eine gedachte y-Achse, so ergibt sich zu jedem

Zeitpunkt das gleiche Leitermuster, das man auch in Abwesenheit von interkalierenden Substanzen im Standard-Aktivitätstest erhält. Nach etwa 120 min ist die Relaxierung weitgehend beendet, so dass die DNA im Gel den Scheitelpunkt des Bogens erreicht, der für eine 2D-Gelelektrophorese charakteristisch ist. Alle auftretenden Banden befinden sich jedoch ausnahmslos auf dem linken Ast des Bogens (negative Spiralisierung), während der rechte Ast zu jedem Zeitpunkt der Kinetik (auch bei $t = 120$ min) DNA-frei ist. Die Gyrase aus *B. subtilis* ist also erwartungsgemäß nicht in der Lage, positiv superspiralisierte Plasmide zu erzeugen. Bei der neutralen Windungszahl $L = \pm 0$ ist die Relaxierung beendet, d. h. es kommt zu keiner Ausbildung eines dynamischen Modifikationsgleichgewichts im Bereich dieses topologischen Zustands (beispielsweise $-2 < L < +2$). Selbst die Einführung von nur einer einzigen Superhelix mit positivem Vorzeichen in vollständig relaxierte DNA scheint energetisch für das Enzym nicht machbar zu sein. Nach einer Zugabe von 1,5 mM ATP und einer weiteren zehnminütigen Inkubation bei 37°C liegt das Plasmid wieder negativ superspiralisiert vor. Die DNA befindet sich nun wieder in derjenigen Position auf dem Gelfoto, wo sie während der Relaxierung bei ca. $t = 5 - 20$ min schon einmal gewesen ist.

4.2.2 ssATPase-Aktivität von Gyrase

4.2.2.1 Abhängigkeit von GyrB

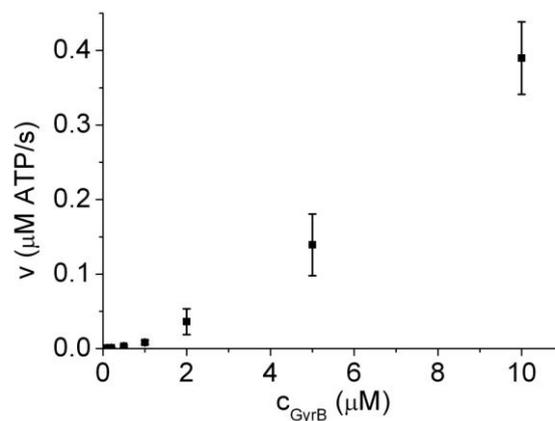


Abbildung 24: Abhängigkeit der ssATPase-Aktivität von der GyrB-Konzentration. Die ATP-Hydrolyserate von 0,1 – 10 μM GyrB WT wurde mit 5 mM Nukleotid in Abwesenheit von GyrA bzw. DNA gemessen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Reaktionsgeschwindigkeit v aus drei Messreihen an. Die ATPase-Rate ist nicht-linear von c_{GyrB} abhängig, d. h. die aktive Form der ATPase-Untereinheit ist ein nukleotidinduziertes GyrB₂-Dimer.

Die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse durch die Gyrase wurde in einer Reihe von gekoppelten optischen Tests (ssATPase-Tests) bestimmt. Eine Messung mit reinem ATP zeigt im zeitlichen Verlauf eine schwache Abnahme der NADH-Absorption bei 340 nm, da das Nukleotid in Abwesenheit von Enzym durch Spontanhydrolyse langsam zu ADP und Pyrophosphat zerfällt. Der A_{340} -Wert sinkt bei

einer Temperatur von 37°C und einer Vorlage von 5 mM ATP um etwa $\Delta A = 0,001$ pro Minute, was einer Reaktionsgeschwindigkeit von etwa $2,6 \cdot 10^{-3} \mu\text{M ATP/s}$ entspricht. Bei Anwesenheit der Gyrase-Untereinheit GyrB nimmt die Hydrolyserate aufgrund von enzymatischer Spaltung deutlich zu, was in Abb. 24 dargestellt ist. In einer Messreihe mit je 5 mM ATP sowie unterschiedlichen Konzentrationen von GyrB WT (0,1 – 10 μM) zeigt sich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit v (in $\mu\text{M ATP/s}$) nicht-linear von c_{GyrB} abhängt, d. h. einen kurvenförmigen Verlauf annimmt. Daraus folgt unmittelbar, dass die aktive Form der ATPase-Untereinheit (mindestens) ein Dimer (GyrB_2) ist, dessen Bildung offenbar durch die Anwesenheit des Nukleotids induziert wird. Die Umsatzzahl der ATP-Spaltung (k_{cat}) ist daher nicht konstant, sondern steigt mit der zunehmenden Proteinkonzentration im Ansatz. Unter der Annahme, dass bei der hohen eingesetzten ATP-Menge (5 mM) eine weitgehende Nukleotidsättigung vorliegt, kann für jede Enzymkonzentration der Wert v näherungsweise mit dem Michaelis-Menten-Parameter v_{max} (Maximalgeschwindigkeit) gleichgesetzt werden. Durch eine Division dieses Wertes mit der jeweiligen GyrB-Konzentration lässt sich eine ungefähre Umsatzzahl k_{cat} zwischen $0,006 \text{ s}^{-1}$ (0,1 μM GyrB) und $0,039 \text{ s}^{-1}$ (10 μM GyrB) abschätzen.

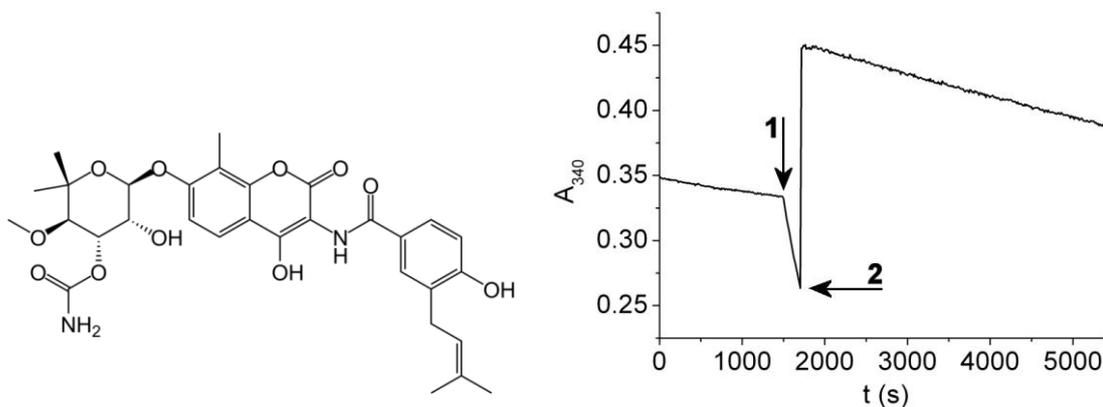


Abbildung 25: Inhibition der ATPase-Aktivität durch Novobiocin. Die NADH-Absorption bei 340 nm sinkt im gekoppelten optischen Test zunächst langsam wegen einer Spontanhydrolyse von 5 mM ATP in Abwesenheit von Enzym (rechtes Bild). Nach der Zugabe von 4 μM GyrB WT (Pfeil 1) wurde eine hohe ATP-Hydrolyserate von etwa $0,052 \mu\text{M ATP/s}$ gemessen. 100 μM des GyrB-spezifischen Inhibitors Novobiocin (linkes Bild) führen anschließend (Pfeil 2) zu einer vollständigen Inhibition der ATPase-Aktivität von GyrB. Die zeitliche Abnahme der A_{340} nimmt dann einen Wert an, der der Spontanhydrolyse des Nukleotids entspricht ($2,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{M ATP/s}$). Daraus kann abgeleitet werden, dass das rekombinant hergestellte GyrB ohne weitere ATP-spaltenden Kontaminanten vorliegt.

Die intrinsische ATPase-Rate von GyrB (in Abwesenheit von GyrA und DNA) wird durch den spezifischen Gyraseinhibitor Novobiocin vollständig blockiert (Abb. 25). Bei einer Vorlage von 5 mM ATP und 4 μM GyrB WT ist zunächst eine schnelle Abnahme der A_{340} zu beobachten. Die gemessene Spaltungsgeschwindigkeit v beträgt in diesem Fall etwa $0,052 \mu\text{M ATP/s}$, was einer Umsatzzahl $k_{\text{cat}} = 0,013 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Die Zugabe von 100 μM Novobiocin führt wegen der Eigenabsorption bei 340 nm zu

einem sprunghaften Anstieg der Messkurve und anschließend zu einer schwachen Abnahme der A_{340} , die ziemlich genau der ATP-Spontanhydrolyse entspricht ($2,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{M ATP/s}$). Dies zeigt, dass das verwendete GyrB-Reinigungsprotokoll die rekombinante Untereinheit sehr rein, d. h. ohne störende ATPase-Kontaminanten liefert. Die gemessene Nukleotidspaltungsrate wird also, abgesehen von der langsamen Spontanhydrolyse, spezifisch durch das rekombinant hergestellte GyrB verursacht.

Tauscht man die beiden nativen Cysteine C58 und C414 in GyrB durch Serin aus, so erhält man die cysteinfreie Mutante GyrB C58S C414S, die als GyrB oC bezeichnet wird. Diese Mutante (100 nM) ist in der Lage, 2 mM ATP genauso schnell zu spalten wie der Wildtyp von GyrB. Eine Ersetzung dieser Cysteine durch andere Aminosäuren (z. B. C58L) führt dagegen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der ATPase-Aktivität, falls die Mutanten nicht ohnehin schon während der Reinigung präzipitieren. Bei der stabilen Mutante GyrB E44Q ist ein Glutamat im aktiven Zentrum durch Glutamin ersetzt, was zu einer vollständigen Verhinderung der Nukleotidhydrolyse führt. Bei einer Vorlage von 5 mM ATP und einer hohen Konzentration an GyrB E44Q (2 μM) ist lediglich eine schwache zeitliche Abnahme der A_{340} nachzuweisen, die der Spontanhydrolyse des Nukleotids entspricht.

4.2.2.2 Abhängigkeit von GyrA

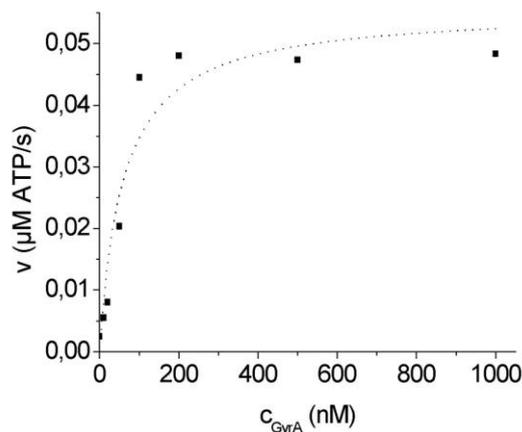


Abbildung 26: GyrA-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von GyrB. 100 nM GyrB, 5 mM ATP und 25 nM pUC18 wurden zusammen mit 0 – 1000 nM GyrA in einen ssATPase-Test eingesetzt. Die Hydrolysegeschwindigkeit zeigt einen Sättigungsverlauf und lässt sich mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben. Aus der Kurvenanpassung ergeben sich die Parameter $v_{\text{max}} = 0,055 \pm 0,003 \mu\text{M/s}$ (entsprechend $k_{\text{cat}} = 0,55 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$) und $K_M(\text{GyrB/GyrA}) = 61 \pm 15 \text{ nM}$.

Die Zunahme der ATPase-Geschwindigkeit bei Nukleotid- und DNA-Sättigung wurde in Abhängigkeit von der GyrA-Konzentration untersucht. Bei einer Vorlage von 5 mM ATP, 100 nM GyrB WT, 25 nM pUC18 sowie einer steigenden Menge an GyrA WT (0 – 1000 nM) ist zu beobachten, dass die gemessene Hydrolysegeschwindigkeit einen Sättigungsverlauf annimmt (Abb. 26). Die Kurve lässt sich relativ gut mit einer Michaelis-Menten-Gleichung (siehe 7.1.1) beschreiben, wobei die Anfangsgeschwindigkeit v_0

auf den Wert $9,3 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{M/s}$ fixiert wird. Dieser Wert ergibt sich aus einer ssATPase-Messung mit 5 mM ATP und 100 nM GyrB WT in Abwesenheit von GyrA und DNA, die um die ATP-Spontanhydrolyse korrigiert wurde. Die Kurvenanpassung liefert eine Maximalgeschwindigkeit $v_{\text{max}} = 0,055 \pm 0,003$ $\mu\text{M/s}$, was einer Umsatzzahl $k_{\text{cat}} = 0,55 \pm 0,03$ s^{-1} entspricht. Die schwache intrinsische Hydrolyseaktivität von GyrB kann also um den Faktor 60 erhöht werden, wenn GyrA und DNA in sättigenden Konzentrationen vorliegen. Die apparente Michaelis-Menten-Konstante K_M (GyrB/GyrA) beträgt 61 ± 15 nM. Die Sättigung von 100 nM GyrB durch den Bindungspartner GyrA ist bei einer Konzentration von 200 – 500 nM praktisch erreicht, so dass für folgende ssATPase-Tests 500 nM GyrA eingesetzt werden.

Bei einer ATPase-Messung mit 5 mM ATP und 1000 nM GyrA WT in Abwesenheit von GyrB stellte sich heraus, dass die GyrA-Präparation eine schwache unspezifische ATPase-Hintergrundaktivität besitzt ($v = 3 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{M ATP/s}$). Dieser Wert ist in einem anderen Ansatz mit 5 mM ATP, 1000 nM GyrA WT sowie 100 nM GyrB WT (abgesehen von der intrinsischen GyrB-Aktivität) praktisch unverändert. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Untereinheit GyrA die ATP-Hydrolyse durch GyrB nicht stimuliert, solange keine DNA anwesend ist. Da die GyrA-Hintergrundaktivität durch eine Zugabe von 100 μM des spezifischen Gyraseinhibitors Novobiocin praktisch vollständig gehemmt wird, ist anzunehmen, dass es sich bei der Kontaminante um die Untereinheit GyrB aus *E. coli* handelt. Interessanterweise ist es möglich, diese störende Komponente vom rekombinanten *B. subtilis*-GyrA zu trennen, indem man die Präparation über eine blaue Sepharosesäule leitet. Zwar kann mit einer hohen Salzkonzentration (2 – 3 M NaCl) nur ein kleiner Anteil der eingesetzten GyrA-Menge (ca. 10 %) wieder eluiert werden, da diese Untereinheit eine sehr hohe Affinität zum Säulenmaterial aufweist. Das Eluat zeigt allerdings keine unspezifische ATPase-Hintergrundaktivität mehr, d. h. die Abnahme der A_{340} im ssATPase-Test bei Verwendung der entsprechenden Elutionsfraktionen (ca. 1000 nM GyrA) entspricht der spontanen Eigenhydrolyse des Nukleotids. GyrA, das von der blauen Sepharosesäule eluiert wurde, zeigt außerdem ein normales Verhalten im Standard-Aktivitätstest. Dieses Chromatographieverfahren kann also zur Beseitigung der störenden Kontaminante eingesetzt werden, da diese offenbar schon bei einer geringeren Salzkonzentration eluiert; allerdings gehen dabei ca. 90 % der eingesetzten GyrA-Menge verloren. Da die unspezifische ATPase-Hintergrundaktivität von GyrA relativ gering ist, wurde auf die Erforschung weiterer Methoden zu ihrer Beseitigung (unter Beibehaltung der hohen GyrA-Ausbeute) verzichtet.

4.2.2.3 Abhängigkeit von ATP

Die Zunahme der ATPase-Geschwindigkeit bei GyrA- und DNA-Sättigung wurde bei 37°C in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration untersucht. Bei einer Vorlage von 100 nM GyrB WT, 500 nM GyrA WT, 25 nM pUC18 sowie einer steigenden ATP-Menge (0 – 6 mM) ergibt sich eine Michaelis-Menten-Kurve mit einem Sättigungsbereich, der ab etwa 4 mM erreicht wird (Abb. 27). Für folgende

ATPase-Tests wird daher eine Nukleotidkonzentration von 5 mM eingesetzt. Die Kurvenanpassung (Anfangsgeschwindigkeit $v_0 = 0 \mu\text{M/s}$) liefert eine maximale Geschwindigkeit $v_{\max} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M/s}$, was bei 100 μM Enzym einer Umsatzzahl $k_{\text{cat}} = 0,63 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Dieser Wert stimmt gut mit dem Ergebnis aus der GyrA-abhängigen ATPase-Reihe überein, was bedeutet, dass in beiden Messungen die jeweils konstante Komponente in einer sättigenden Konzentration vorlag. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M (GyrB/ATP) beträgt $0,96 \pm 0,08 \text{ mM}$.

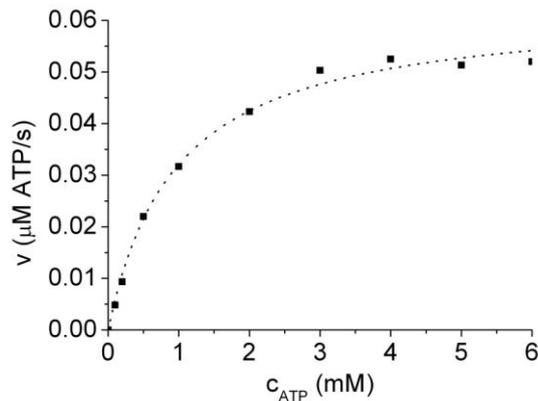


Abbildung 27: ATP-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von GyrB. 100 nM GyrB, 500 nM GyrA und 25 nM pUC18 wurden zusammen mit 0 – 6 mM ATP in einen ssATPase-Test eingesetzt. Die Hydrolysegeschwindigkeit zeigt einen Sättigungsverlauf und lässt sich mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben. Aus der Kurvenanpassung ergeben sich die Parameter $v_{\max} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M/s}$ (entsprechend $k_{\text{cat}} = 0,63 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$) und K_M (GyrB/ATP) = $0,96 \pm 0,08 \text{ mM}$.

4.2.2.4 Abhängigkeit von DNA

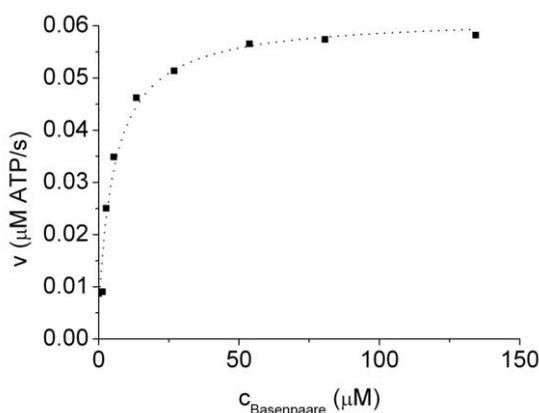


Abbildung 28: DNA-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von GyrB. 100 nM GyrB, 500 nM GyrA und 5 mM ATP wurden zusammen mit 0 – 50 nM pUC18 (Basenpaarkonzentration 0 – 134 μM) in einen ssATPase-Test eingesetzt. Die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse zeigt einen Sättigungsverlauf und lässt sich mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben. Aus der Kurvenanpassung ergeben sich die Parameter $v_{\max} = 0,055 \pm 0,002 \mu\text{M/s}$ (entsprechend $k_{\text{cat}} = 0,55 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$) und K_M (GyrB/DNA) = $6,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ bezogen auf die Menge an Basenpaaren.

Die Zunahme der ATPase-Geschwindigkeit bei Nukleotid- und GyrA-Sättigung wurde in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration untersucht. Dazu wurde das Plasmid pUC18 (2686 bp) eingesetzt, das in natürlichem Zustand negativ superspiralisiert vorliegt. Bei einer Vorlage von 5 mM ATP, 100 nM GyrB WT, 500 nM GyrA WT sowie einer steigenden pUC18-Menge (0 – 50 nM; entsprechend 0 – 134 μ M Basenpaare) ergibt sich im ssATPase-Test eine (nicht-sigmoidale) Sättigungskurve, die sich mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben lässt (Abb. 28). Die maximale ATP-Spaltungsrate wird bei etwa 20 nM pUC18 erreicht, so dass für alle folgenden Tests eine Konzentration von 25 nM (bzw. 67 μ M Basenpaare) verwendet wird. Eine Kurvenanpassung führt zu $v_{\max} = 0,055 \pm 0,002 \mu\text{M/s}$, was einer Umsatzzahl $k_{\text{cat}} = 0,55 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen aus den ATP- bzw. GyrA-abhängigen Messreihen überein, was zeigt, dass in allen durchgeführten Tests die Konzentrationen der jeweils unveränderten Bindungspartner sättigend waren. Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 , d. h. die Reaktionsrate in Abwesenheit von DNA, beträgt 0,0071 $\mu\text{M/s}$. Der apparente K_M -Wert für das System (GyrB/DNA) hat den Wert $6,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ bezogen auf die Menge an Basenpaaren, was einer Plasmidkonzentration von $2,3 \pm 0,4 \text{ nM}$ entspricht. Die Messungen zeigen deutlich, dass GyrB eine DNA-abhängige ATPase ist und eine hohe Affinität zu Nukleotiden aufweist. Bei einer Verwendung von modifiziertem pUC18 mit einer spezifischen Gyrase-Bindestelle (0 – 30 nM) ergeben sich praktisch keine Änderungen zur Messreihe mit Standard-pUC18. Die Parameter aus der Kurvenanpassung betragen in diesem Fall $k_{\text{cat}} = 0,44 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ bzw. $K_M = 2,4 \pm 0,5 \text{ nM}$ (Plasmidkonzentration). Es wäre zu erwarten gewesen, dass durch die Einführung einer Gyrase-Konsensussequenz die enzymatische ATP-Spaltung stärker angeregt wird als durch unbehandeltes pUC18, was jedoch nicht der Fall ist. Die Bindestelle ist also offenbar nicht spezifischer für Gyrase als eine beliebige DNA-Zufallssequenz.

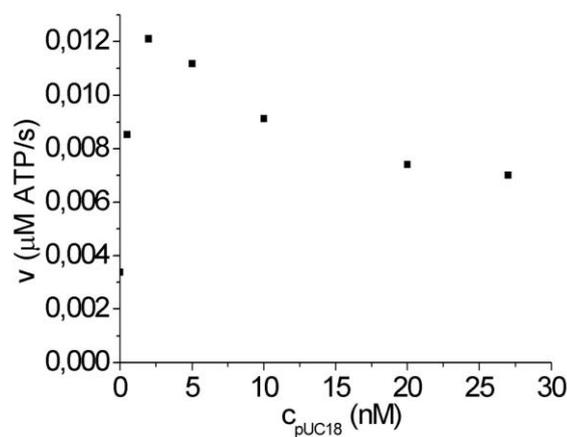


Abbildung 29: ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von relaxierter Plasmid-DNA. 100 nM GyrB, 500 nM GyrA und 5 mM ATP wurden zusammen mit 0 – 27 nM pUC18, das zuvor 2 h bei 37°C durch Gyrase relaxiert wurde, in einen ssATPase-Test eingesetzt. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt bei zunehmender DNA-Menge zunächst an (bis 2 nM pUC18) und fällt danach aus unbekanntem Gründen wieder ab.

Ein eigenartiges Verhalten tritt zum Vorschein, wenn als Bindungspartner nicht natives (negativ superspiralisiertes) Plasmid, sondern andere DNA-Formen verwendet werden. Der Ligand pUC18 wurde zunächst durch eine zweistündige Gyrase-Einwirkung bei 37°C weitgehend relaxiert. Nach einer Hitzebehandlung (20 min 65°C) und einer Zentrifugation zur Entfernung der ausgefallenen Proteine wurde frisches Protein (100 nM GyrB WT und 500 nM GyrA WT) sowie 5 mM ATP zugegeben und die ssATPase-Aktivität bei 37°C gemessen. Bei einer zunehmenden Plasmidmenge (0 – 2 nM) ist zuerst ein Anstieg der Hydrolyserate zu beobachten, der jedoch geringer ausfällt als in der Messung mit nativem pUC18. Bei höheren Konzentrationen an relaxiertem Plasmid (bis 27 nM) nimmt die Stimulierung des Enzyms sogar wieder ab (Abb. 29). Dieses Verhalten ist reproduzierbar und tritt auch dann auf, wenn die DNA in anderen nicht-nativen Formen vorliegt: Eine Messreihe mit 0 – 30 nM pUC18, welches zuvor durch eine EcoRI-Behandlung linearisiert wurde, liefert unter ansonsten gleichartigen Bedingungen ein ähnliches Bild, wobei das Hydrolysemaximum schon bei 1 nM erreicht wird. Kalbsthymus-DNA, bei der es sich um ein Gemisch aus linearen Fragmenten unterschiedlicher Länge handelt, erzeugt ebenfalls eine vergleichbare Messkurve, die von 0 bis 5 µg/ml DNA mittelmäßig ansteigt und danach (bis 75 µg/ml) wieder fällt bzw. konstant auf einem niedrigen Niveau verbleibt. Es kann zusammengefasst werden, dass lineare sowie relaxierte ringförmige DNA die ATPase-Aktivität von GyrB stimulieren, wenn auch zu einem deutlich geringeren Ausmaß als superspiralisiertes pUC18. Natives Plasmid, d. h. das natürliche Substrat der Gyrase, ist also von allen verwendeten Nukleotiden der effektivste Bindungspartner, um die Zunahme der Hydrolyserate zu induzieren. Bei einer zu hohen Konzentration an linearer bzw. relaxierter DNA tritt aus unbekanntem Gründen eine Übersättigung ein, so dass die Spaltungsrate wieder abnimmt. Deshalb kann in diesem Fall keine Michaelis-Menten-Kinetik zur Bestimmung von v_{\max} und K_M auf die Messreihen angewendet werden.

4.2.2.5 Kooperativität

Die Frage, ob die ATP-Bindung durch GyrB kooperativ abläuft oder nicht, wurde in zwei ssATPase-Tests bei niedriger Substratkonzentration untersucht. 100 nM GyrB WT, 500 nM GyrA WT und 25 nM pUC18 wurden zusammen mit 0 – 200 µM ATP (7 Stufen) in den Test eingesetzt und die Hydrolyserate (in µM ATP/s) gemessen (Abb. 30 links). In einer reversen Messreihe wurde die DNA-Abhängigkeit bei 100 nM GyrB WT, 500 nM GyrA WT, 5 mM ATP und niedriger Ligandenkonzentration (0 – 0,167 nM pUC18 in 8 Stufen) getestet (Abb. 30 rechts). In beiden Fällen ergibt sich ein sehr ähnliches Bild: Die ATPase-Aktivität ist unter den gegebenen Bedingungen praktisch linear von der eingesetzten ATP- bzw. DNA-Konzentration abhängig. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Untereinheit GyrB nicht kooperativ arbeitet, d. h. die Bindung des zweiten Nukleotids wird durch das Vorhandensein des ersten ATP nicht vereinfacht. Wenn eine solche Kooperativität vorliegen würde, dann hätte sich sicherlich in mindestens einer Testreihe eine sigmoidale Abhängigkeit ergeben.

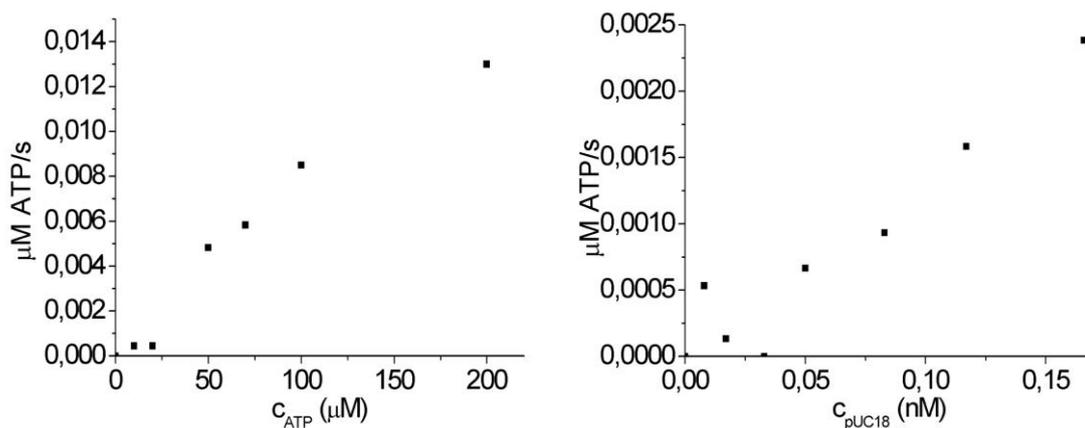


Abbildung 30: Kooperativitätstest. 100 nM GyrB, 500 nM GyrA, 25 nM pUC18 und niedrige Konzentrationen von ATP (0 – 200 μM) wurden in den ssATPase-Test eingesetzt (linkes Bild). In einer zweiten Messreihe wurde die Hydrolyseaktivität in einer Mischung aus 100 nM GyrB, 500 nM GyrA, 5 mM ATP und geringen DNA-Mengen (0 – 0,167 nM pUC18) bestimmt (rechtes Bild). In beiden Fällen steigt die ATPase-Rate linear in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, ohne dass eine sigmoidale Verzögerungsphase auftritt. Eine Kooperativität von GyrB aus *B. subtilis* konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Die beiden Messreihen bei niedriger Substratkonzentration wurden anschließend mit den entsprechenden ssATPase-Tests kombiniert, bei denen sich eine Substratsättigung ergab (siehe Abb. 27 und 28). Beide zusammengesetzten Kurven (jeweils ca. 15 Datenpunkte) wurden sowohl mit der Hill- (7.1.2) als auch mit der Kooperativitätsparametergleichung (7.1.3) analysiert. Eine Anpassung der ATP-abhängigen ATPase-Kurve mit der Hill-Gleichung ergibt den Hill-Koeffizienten $n = 0,99 \pm 0,08$, d. h. es liegt keine Kooperativität vor. Die Anwendung der zweiten Gleichung führt zu einem Kooperativitätsparameter $r = 0,94 \pm 0,36$ (mit $K_D = 0,89 \pm 0,11$ mM), was ebenso zeigt, dass die Bindung des zweiten Nukleotids nicht durch die Anwesenheit des ersten ATP gefördert wird. Auch bei einer Analyse der kombinierten DNA-abhängigen ATPase-Messkurve ergeben sich Werte, die keine Kooperativität der *B. subtilis*-Gyrase andeuten: Der Hill-Koeffizient n beträgt in diesem Fall $0,98 \pm 0,05$ und der Kooperativitätsparameter r nimmt den Wert $1,00 \pm 0,27$ an ($K_D = 1,88 \pm 0,22$ nM).

4.2.2.6 Modifizierter ssATPase-Test

Zum Vergleich mit Literaturdaten über die Kooperativität der *E. coli*-²⁰ bzw. Hefe-Topo II⁸² wurde ein modifizierter ssATPase-Test mit der *Bacillus*-Gyrase unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Als Ligand wurde ein 60-bp-dsDNA-Oligofragment mit einer spezifischen Gyrase-Bindestelle verwendet, das zuvor durch eine Thermobehandlung aus den beiden Einzelsträngen hergestellt wurde (3.3.5). 650 nM GyrA WT, 650 nM GyrB WT und 3 mM ATP in modifiziertem ssATPase-Puffer wurden anschließend zusammen mit 0 – 5 μM dieses DNA-Fragments bei 37°C in den Test eingesetzt. Bei einer derart hohen Konzentration der beiden Gyrase-Untereinheiten, die zudem in einem 1:1-Mengenverhältnis vorliegen, ist davon auszugehen, dass größtenteils Tetramere (A_2B_2) gebildet werden, während der Trimeranteil (A_2B)

gering ist. Das Ergebnis ist eine Michaelis-Menten-Kurve, deren Sättigung unter den gegebenen Bedingungen erreicht ist (Abb. 31 links). Es ist kein sigmoidales Verhalten erkennbar, welches auf eine mögliche Kooperativität der *Bacillus*-Gyrase hindeuten würde. Aus der Kurvenanpassung ergeben sich die Parameter $v_{\max} = 0,23 \pm 0,01 \mu\text{M/s}$ (d. h. $k_{\text{cat}} = 0,35 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$) und $K_M = 0,58 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bezogen auf die Oligonukleotidkonzentration (bzw. $35 \pm 2 \mu\text{M}$ bezogen auf die Menge an Basenpaaren). Dabei ist zu beachten, dass es sich beim Substrat um ein lineares Fragment handelt, das die ATPase-Aktivität von GyrB grundsätzlich schlechter stimuliert als superspiralisierte Plasmid-DNA (4.2.2.4). Es ist ebenso davon auszugehen, dass bei einer höheren Oligonukleotidmenge ($> 5 \mu\text{M}$) ein ähnlicher Übersättigungseffekt wie in einer Messreihe mit linearisiertem bzw. relaxiertem Plasmid eintreten würde (siehe Abb. 29).

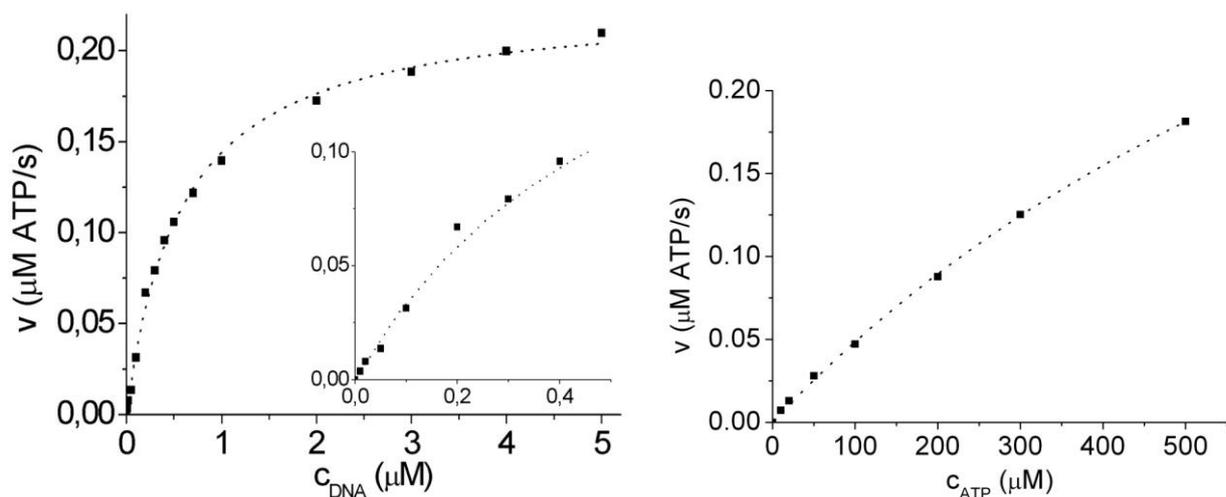


Abbildung 31: Modifizierter ssATPase-Test. 650 nM GyrA und 650 nM GyrB wurden zusammen mit 3 mM ATP und 0 – 5 μM 60-bp-dsDNA in modifiziertem ssATPase-Puffer in den optischen Test eingesetzt (linkes Bild). Das Insert zeigt die Vergrößerung des Bereiches von 0 – 0,5 μM DNA. Die Michaelis-Menten-Parameter betragen $v_{\max} = 0,23 \pm 0,01 \mu\text{M/s}$ (d. h. $k_{\text{cat}} = 0,35 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$) und $K_M = 0,58 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bezogen auf die Oligonukleotidkonzentration. In einer anderen Testreihe mit 650 nM GyrB, 650 nM GyrA, 4 μM 60-bp-dsDNA und 0 – 500 μM ATP ergibt sich eine halbgesättigte Kurve, die nach einer Anpassung die Werte $v_{\max} = 0,57 \pm 0,05 \mu\text{M/s}$ (d. h. $k_{\text{cat}} = 0,88 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$) und $K_M = 1,08 \pm 0,12 \text{ mM}$ liefert (rechtes Bild). In beiden Fällen verläuft die Abhängigkeit der Hydrolyserate von der Ligandenkonzentration nicht sigmoidal, sondern lässt sich mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben. Eine Kooperativität von GyrB aus *B. subtilis* konnte somit nicht nachgewiesen werden.

In einem reversen Experiment wurde die ssATPase-Aktivität von 650 nM GyrA WT, 650 nM GyrB WT, 4 μM 60-bp-dsDNA und 0 – 500 μM ATP in modifiziertem Puffer gemessen. Man erhält eine Kurve, die in die Nähe des Sättigungsbereichs gelangt (Abb. 31 rechts) und sich wiederum mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben lässt. Die Kurvenanpassung liefert die Parameter $v_{\max} = 0,57 \pm 0,05 \mu\text{M/s}$ (d. h. $k_{\text{cat}} = 0,88 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$) und $K_M = 1,08 \pm 0,12 \text{ mM}$. Auch in dieser Messreihe verläuft die Abhängigkeit der ATPase-Rate von der Substratkonzentration nicht sigmoidal, d. h. die Gyrase aus *Bacillus subtilis* zeigt unter keiner der hier getesteten Bedingungen Anzeichen eines kooperativen Verhaltens.

4.2.2.7 Einfaches Bindungsmodell

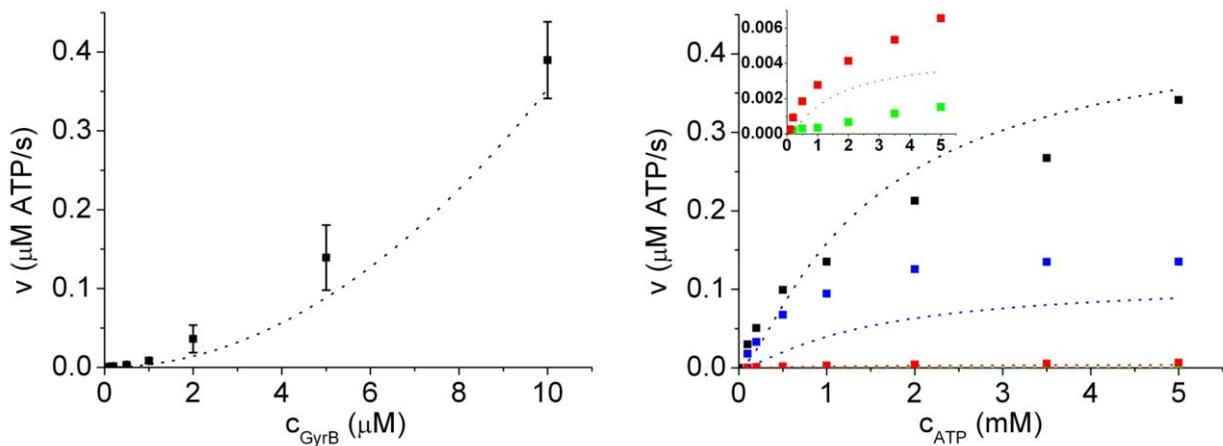


Abbildung 32: Globale Kurvenanpassung zur Ermittlung der Dissoziationskonstante K_D (GyrB/ATP). 5 mM ATP wurden zusammen mit 0 – 10 μM GyrB WT in den ssATPase-Test eingesetzt (linkes Bild; vgl. Abb. 24). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei Messreihen an. Weiterhin wurden vier ssATPase-Reihen mit einer jeweils konstanten GyrB-Menge sowie 0 – 5 mM ATP durchgeführt (rechtes Bild). Die GyrB-Konzentrationen in den einzelnen Testreihen betragen 100 nM (grün); 1 μM (rot); 5 μM (blau) bzw. 10 μM (schwarz). Das Insert zeigt eine Vergrößerung der roten sowie der grünen Kurve. Alle gemessenen Punkte wurden durch eine globale Kurvenanpassung mit einem einfachen Bindungsmodell analysiert, was v. a. bei hohen Enzymkonzentrationen zu einer guten Beschreibung der Daten führt. Je niedriger die GyrB-Menge im Ansatz, desto höher ist die Abweichung der Fitkurve von den Datenpunkten. Die Auswertung liefert die Dissoziationskonstante K_D (GyrB/ATP) = $0,71 \pm 0,15$ mM.

Die Dissoziationskonstante K_D (GyrB/ATP) wurde durch eine globale Kurvenanpassung einer Serie von ssATPase-Testreihen bestimmt. 5 mM ATP wurden zunächst mit 0 – 10 μM GyrB WT vermischt und die Geschwindigkeit der Nukleotidhydrolyse bei 37°C gemessen (vgl. Abb. 24). Anschließend wurden vier Testreihen mit einer variablen ATP-Konzentration (0 – 5 mM) sowie einer jeweils konstanten GyrB-Menge (100 nM; 1 μM ; 5 μM bzw. 10 μM) durchgeführt (Abb. 32). Alle Datenpunkte wurden durch eine globale Kurvenanpassung analysiert, bei der die Grundlage ein einfaches Zwei-Schritt-Bindungsmodell ist, das im Anhang (7.1.4) erläutert wird. Dieses Schema sieht vor, dass zunächst monomeres GyrB ein ATP bindet und anschließend zwei dieser Enzym-Substrat-Komplexe dimerisieren, wofür zwei K_D -Werte definiert werden. Daraufhin spaltet das dimere GyrB_2 beide gebundenen Nukleotide mit der Umsatzzahl k_{cat} zu ADP. Die globale Kurvenanpassung liefert eine gute Beschreibung der Datenpunkte, sofern die Enzymkonzentration relativ hoch ist. Andernfalls (v. a. bei 100 nM) nimmt wegen der geringen Hydrolysegeschwindigkeit die Ungenauigkeit der Messung zu, so dass die Abweichung zwischen der Fitkurve und den Messpunkten steigt. Die Kurvenanpassung konvergiert zur Dissoziationskonstante K_{D1} , d. h. K_D (GyrB/ATP) = $0,71 \pm 0,15$ mM. Im Gegensatz zum Ergebnis aus einer Fluoreszenztitration, das durch eine unerwünschte Substrathydrolyse während der Messung verfälscht wird, repräsentiert der ermittelte K_D -Wert aus der globalen Kurvenanpassung direkt die Bindung von ATP an das aktive

Zentrum des Enzyms. Die Dissoziationskonstante für die Dimerbildung (K_{D2}) kann leider nicht exakt bestimmt werden, da sie in der Fitgleichung mit der Umsatzzahl der ATP-Hydrolyse (k_{cat}) gekoppelt ist und daher mit dieser zur Konstante K zusammengefasst wurde. K , d. h. der Quotient aus k_{cat} und K_{D2} , nimmt den Wert $(2,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ an. Da sich die Umsatzzahl k_{cat} je nach der vorliegenden GyrB-Monomerkonzentration ($0,1 - 10 \mu\text{M}$) zwischen $0,006 \text{ s}^{-1}$ und $0,039 \text{ s}^{-1}$ bewegt (4.2.2.1), ergibt sich aus dem K -Wert eine ungefähre Dissoziationskonstante für die nukleotidinduzierte GyrB-Dimerisierung (K_{D2}), die zwischen $2,6$ und $17 \mu\text{M}$ liegt.

Ein komplexeres Bindungsschema, das neben der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes E_2S_2 auch die Ratenkonstanten für die *single-turnover*-Hydrolyse und für die ADP-Dissoziation berücksichtigt, wurde ebenfalls auf die vorliegenden ssATPase-Messreihen angewendet. Leider ergibt sich daraus keine Konvergenz der Kurvenanpassung, da in diesem Fall vermutlich zu viele Freiheitsgrade vorliegen.

4.2.3 stATPase-Aktivität von GyrB

4.2.3.1 ATP-Hydrolyserate

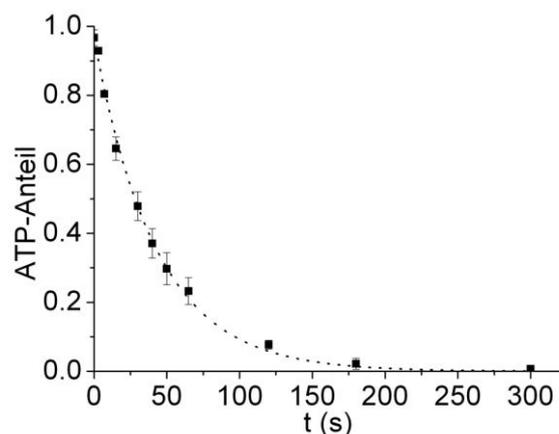


Abbildung 33: stATPase-Test zur Bestimmung der ATP-Hydrolyserate. $200 \mu\text{M}$ ATP wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit $250 \mu\text{M}$ GyrB WT vermischt und der Anteil von ATP im Nukleotidgemisch zeitlich verfolgt. Die Punkte stellen Mittelwerte aus drei Messungen dar (die Balken geben die Standardabweichung an). Die Kurve lässt sich durch eine einfache Exponentialfunktion mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_{hyd} = 0,023 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ beschreiben.

Ein *single-turnover*-ATPase-Test ermöglicht die Bestimmung der tatsächlichen Hydrolyserate, die im Gegensatz zum ssATPase-Test nicht von weiteren Prozessen im Nukleotidzyklus wie Substratbindung oder Produktdissoziation überlagert wird. $200 \mu\text{M}$ ATP wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit einem Überschuss an GyrB WT ($250 \mu\text{M}$) versetzt und zu bestimmten Zeitpunkten die Menge an ATP und ADP durch HPLC bestimmt. Schon zu Beginn der Messung, d. h. auch im proteinfreien Kontrollansatz, liegt

ein kleiner Prozentsatz (1 – 5 %) an ADP vor. Etwa 200 – 300 s nach Beginn der Kinetik wurde das eingesetzte ATP vollständig zu ADP hydrolysiert. In den Chromatogrammen wird daher mit zunehmender Zeit das ATP-Signal (Elutionsvolumen $V_E = 3,8$ ml) immer niedriger, während die ADP-Menge ($V_E = 4,3$ ml) ständig zunimmt. Bei $t = 300$ s konnte nur noch ADP festgestellt werden, so dass die Reaktion zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen war. AMP mit einem Elutionsvolumen von 7 – 8 ml bzw. sonstige Abbauprodukte konnten dagegen während der Messung gar nicht detektiert werden. Der Anteil von ATP an der gesamten Nukleotidmenge wurde für jeden Zeitpunkt berechnet und gegen die Zeit t aufgetragen (Abb. 33). Bei den einzelnen Messwerten handelt es sich um den Mittelwert aus drei unterschiedlichen Messreihen. Eine Kurvenanpassung mit einer einfachen Exponentialfunktion liefert eine sehr schöne Beschreibung der Messkurve und führt zu einer Ratenkonstante $k_{\text{hyd}} = 0,023 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$, was einer Halbwertszeit der Reaktion (3.5.2) von ca. 30 s entspricht.

4.2.3.2 Nukleotidanaloga

Single-turnover-Tests wurden auch mit den ATP-Analoga ATP γ S und AMPPNP durchgeführt. Im Fall von AMPPNP stellte sich heraus, dass das Nukleotid von GyrB WT nicht hydrolysiert werden kann. Eine Mischung aus 149 μM Protein und 123 μM AMPPNP zum Zeitpunkt $t = 0$ ergab nach einer halben Stunde bei RT einen AMPPNP-Anteil von ca. 81 %, während andere (nicht bekannte) Komponenten zu 19 % im Ansatz vorlagen. Der GyrB-freie Kontrollansatz ergab bei $t = 30$ min allerdings einen AMPPNP-Anteil von ca. 78 % der Gesamtnukleotidmenge. Während der gesamten Reaktionszeit hat also im GyrB-Nukleotid-Ansatz keine Spaltung stattgefunden.

Ein anderes Ergebnis lieferte der *single-turnover*-Test mit dem Analogon ATP γ S. Das modifizierte Nukleotid ließ sich von GyrB WT zu ADP spalten, wenn auch etwa fünfmal langsamer als ATP. Eine Mischung aus 143 μM ATP γ S und 178 μM Protein zum Zeitpunkt $t = 0$ führte nach etwa 30 min zu einer praktisch vollständigen Hydrolyse des Nukleotids (Abb. 34). Der Anteil der Abbauprodukte erreichte am Ende der Kinetik einen Wert von nahezu 100 % der Gesamtnukleotidmenge. Bei einer Kurvenanpassung mit einer einfachen Exponentialfunktion ($k_{\text{hyd}} = 0,0047 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$) fällt auf, dass sich die Messreihe, besonders im Bereich oberhalb von $t = 5$ min, nur mittelmäßig beschreiben lässt. Verwendet man dagegen eine doppelte Exponentialfunktion, so stimmt die Fitkurve sehr gut mit den einzelnen Messpunkten überein. In diesem Fall erhält man zwei Geschwindigkeitskonstanten $k_1 = 0,0081 \pm 0,0024 \text{ s}^{-1}$ (Amplitude 69 %) sowie $k_2 = 0,0013 \pm 0,0008 \text{ s}^{-1}$ (Amplitude 31 %). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die ATP γ S-Spaltungsreaktion über eine Zwischenstufe erfolgt oder abhängig von der Orientierung der Schwefelgruppe unterschiedlich schnell durchgeführt wird.

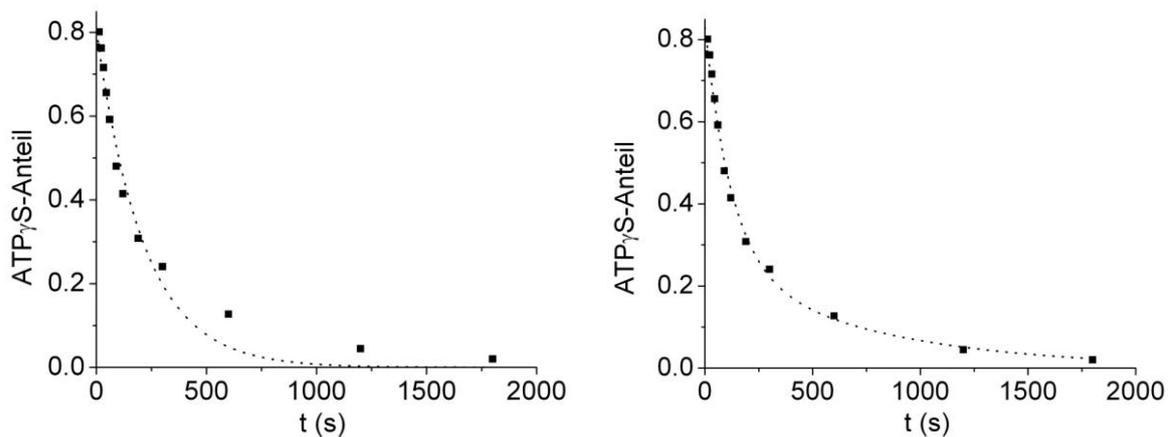


Abbildung 34: Single-turnover-Test zur Bestimmung der Spaltung von ATP γ S. 143 μ M ATP γ S wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 178 μ M GyrB WT vermischt und der Anteil von ATP γ S im Nukleotidgemisch zeitlich verfolgt. Die Kurve lässt sich durch eine einfache Exponentialfunktion mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{hyd}} = 0,0047 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$ nur halbwegs gut beschreiben (linkes Bild). Unter Verwendung einer doppelten Exponentialfunktion (rechtes Bild) ist eine deutlich bessere Kurvenanpassung mit $k_1 = 0,0081 \pm 0,0024 \text{ s}^{-1}$ (Amplitude 69 %) und $k_2 = 0,0013 \pm 0,0008 \text{ s}^{-1}$ (Amplitude 31 %) möglich.

4.3 Bindungseigenschaften

4.3.1 Nukleotidbindung

4.3.1.1 Bindung von GyrB an Nukleotide

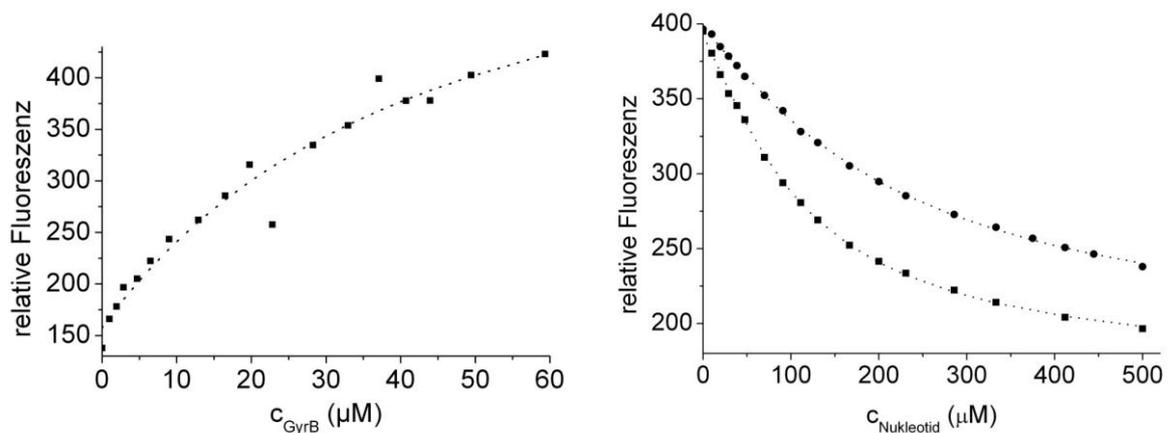


Abbildung 35: Nukleotidbindung durch GyrB WT. 5 μ M mantADP wurde mit GyrB WT titriert und die Zunahme der Fluoreszenz bei 440 nm verfolgt ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$; linkes Bild). Aus der Kurvenanpassung ergibt sich eine Dissoziationskonstante K_D (GyrB/mantADP) = $40 \pm 16 \mu\text{M}$. Bei der anschließenden Verdrängungstitration mit einem Nukleotid nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab (rechtes Bild). Für die Messreihe mit ADP (Quadrate) ergibt sich K_D (GyrB/ADP) = $37 \pm 5 \mu\text{M}$. Bei einer Verdrängung mit ATP (Kreise) erhält man einen apparenten K_D -Wert (GyrB/ATP) = $75 \pm 3 \mu\text{M}$, der allerdings durch eine ATP-Hydrolyse während der Messung beeinflusst wird.

Die Bindung von verschiedenen Nukleotiden an die ATPase-Untereinheit der Gyrase (GyrB) wurde mit einer Reihe von Fluoreszenztitrations unter Verwendung des ADP-Analogons mantADP untersucht. Das Fluorophor wurde zunächst mit einem Überschuss an GyrB WT titriert und die Zunahme der Emission bei 440 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm) verfolgt (Abb. 35). Am Ende der Messreihe, d. h. bei einer GyrB-Konzentration von etwa 60 μM , lag eine Fluoreszenzintensität vor, die etwa dem 2,5fachen des Ausgangswertes entsprach (Abb. 36). Der Sättigungsbereich wurde annähernd erreicht und die Messkurve lässt sich mit einem 1:1-Bindungsmodell sehr gut beschreiben. Aus der Kurvenanpassung ergibt sich eine Dissoziationskonstante K_D (GyrB/mantADP) = 40 ± 16 μM für die Bindung von mantADP an das aktive Zentrum der ATPase. Bindungskonstanten für die natürlichen Nukleotide ADP bzw. ATP wurden ermittelt, indem das Fluorophor wieder aus dem Komplex mit dem Protein verdrängt wurde. Eine Rücktitration der Lösung aus 5 μM mantADP und 60 μM GyrB WT mit einem hohen Überschuss an ADP ergibt einen K_D -Wert (GyrB/ADP) von 37 ± 5 μM . Es besteht daher praktisch kein Unterschied im Bindungsverhalten von ADP bzw. mantADP an GyrB, so dass das Fluorophor für Gyrase-Nukleotid-Bindungsstudien sehr gut geeignet ist. Die Amplitude der Fluoreszenzemission bei 440 nm geht nahezu auf den Ausgangswert zurück, da mantADP am Ende der Verdrängungstitration wieder in freier Form vorliegt. Die Spektren zeigen außerdem, dass während beiden Titrations praktisch keine Aggregation des Proteins und damit keine störenden Lichtstreuungseffekte aufgetreten sind. Bei der Verdrängungstitration einer gleichartigen GyrB-mantADP-Lösung mit ATP ist zu berücksichtigen, dass das zugegebene Nukleotid während der Messung vom Protein zu ADP hydrolysiert wird, was die Ermittlung der Bindungskonstante beeinträchtigt. Der aus der Kurvenanpassung erhaltene K_D (GyrB/ATP) = 75 ± 3 μM stellt somit nur eine Untergrenze der tatsächlichen Dissoziationskonstante dar.

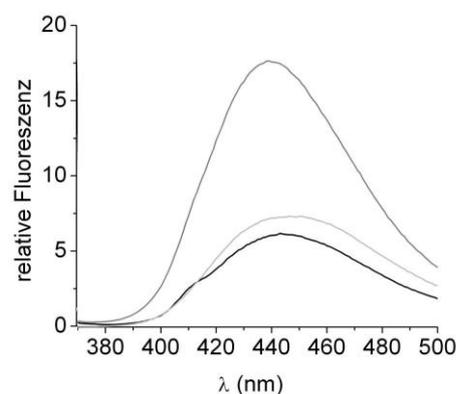


Abbildung 36: Fluoreszenzspektren. Eine Lösung aus 5 μM mantADP zeigt nach einer Anregung bei 360 nm ein Emissionsmaximum bei etwa 440 nm (schwarze Linie). Die Amplitude nimmt um den Faktor 2 – 3 zu, wenn das Fluorophor nach der Hintitration nahezu vollständig an GyrB WT gebunden ist (dunkelgraue Linie). Am Ende der ADP-Verdrängungstitration liegt mantADP wieder in freier Form vor, so dass die Emissionsintensität nahezu auf den Ausgangswert zurückgeht (hellgraue Linie). Während der Messung trat praktisch keine Aggregation des Proteins auf, welche zu einem Streueffekt geführt und die Bestimmung der K_D -Werte deutlich erschwert hätte.

4.3.1.2 Einfluss von GyrA

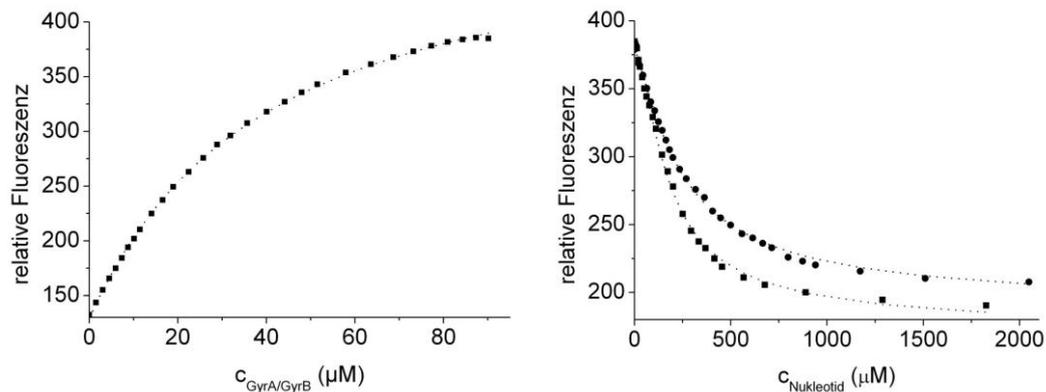


Abbildung 37: Nukleotidbindung durch GyrB WT in Anwesenheit von GyrA. 5 μM mantADP wurde mit einer 1:1-Mischung aus GyrA WT und GyrB WT titriert und die Zunahme der Fluoreszenz bei 440 nm verfolgt ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$; linkes Bild). Aus der Kurvenanpassung ergibt sich eine Dissoziationskonstante K_D (Gyrase/mantADP) = $36 \pm 1 \mu\text{M}$ (bezogen auf GyrB-Monomereinheiten). Bei der anschließenden Verdrängungstitration mit einem Nukleotid nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab (rechtes Bild). Für die Messreihe mit ADP (schwarze Quadrate) ergibt sich K_D (Gyrase/ADP) = $34 \pm 2 \mu\text{M}$. Bei einer Verdrängung mit ATP (schwarze Kreise) erhält man einen apparenten K_D -Wert (Gyrase/ATP) = $65 \pm 2 \mu\text{M}$, der allerdings durch eine ATP-Hydrolyse während der Messung beeinflusst wird.

Um den Einfluss von GyrA auf die Nukleotidbindung zu untersuchen, wurde zunächst eine 1:1-Mischung aus GyrA WT und GyrB WT hergestellt. 5 μM mantADP wurden anschließend mit dieser Lösung bis zu einer Endkonzentration von jeweils 90 μM der beiden Untereinheiten (entspricht ca. 45 μM Gyrase A_2B_2) titriert (Abb. 37). Die Fluoreszenz des ADP-Analogons nahm auch in Anwesenheit von GyrA bis zum Erreichen der Sättigungszone um den Faktor 2 – 3 zu. Eine Kurvenanpassung mit einem 1:1-Bindungsmodell liefert einen K_D -Wert (Gyrase/mantADP) von $36 \pm 1 \mu\text{M}$ bezogen auf GyrB-Monomere bzw. $18 \pm 1 \mu\text{M}$ bezogen auf tetramere Gyrase-moleküle. Dieser Wert unterscheidet sich praktisch nicht vom K_D (GyrB/mantADP) in Abwesenheit von GyrA. Eine Verdrängungstitration des Gyrase-mantADP-Komplexes mit einem hohen Überschuss an ADP ergibt einen K_D -Wert (Gyrase/ADP) von $34 \pm 2 \mu\text{M}$ (bzw. $17 \pm 1 \mu\text{M}$) bezogen auf GyrB-Monomere (bzw. Gyrase-moleküle). Da auch dieses Ergebnis mit dem Wert in GyrA-Abwesenheit übereinstimmt, kann festgestellt werden, dass die Untereinheit GyrA keinen Einfluss auf die Nukleotidbindung von GyrB hat. Die ATPase-Untereinheit bindet in der aktiven tetrameren Gyraseform ebenso gut an ihr Substrat wie im freien monomeren Zustand. Die Rücktitration einer Lösung aus 5 μM mantADP und jeweils 77 μM GyrA und GyrB (entspricht ca. 38,5 μM Gyrase) mit einem ATP-Überschuss wird wiederum von der Hydrolyse des Nukleotids während der Messung beeinflusst. Für die Dissoziationskonstante K_D (Gyrase/ATP) ergibt sich ein apparenter Wert von $65 \pm 2 \mu\text{M}$ bezogen auf GyrB-Monomere (bzw. $32,5 \pm 1 \mu\text{M}$ bezogen auf Gyraseeinheiten), der jedoch lediglich die Untergrenze des tatsächlichen K_D -wertes markiert. Die Fluoreszenzintensität bei 440 nm lag gegen Ende der Verdrängungstitration wieder im Bereich des Ausgangswertes von freiem mantADP.

4.3.1.3 Einfluss von DNA

Der Einfluss von DNA auf die Nukleotidbindung durch GyrB wurde untersucht, indem zunächst eine äquimolare Mischung aus Gyrase (GyrA WT + GyrB WT) und dem Plasmid pUC18 hergestellt wurde. 5 μM mantADP wurde anschließend mit dieser Lösung bis zu einer Maximalkonzentration von 34 μM Gyrase titriert. Da das hochmolekulare pUC18 (2686 bp) ab etwa 15 μM ein Gel bildet, wurde die Obergrenze der Plasmidkonzentration bei 10 μM (entspricht 17,45 mg/ml) festgesetzt. Um die Menge des eingesetzten Plasmids in einem erträglichen Rahmen zu halten, fand die K_D -Bestimmung in einem Mikrotiterplattenfluoreszenzlesegerät statt. Diese Messung musste allerdings als Einzelpunkttitration durchgeführt werden, d. h. jeder Messpunkt wurde als separater 10- μl -Ansatz erstellt. Die mantADP-Fluoreszenz oberhalb von 435 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm) nahm auch bei der Einzelpunkttitration erwartungsgemäß mit steigender Proteinmenge zu (Abb. 38), allerdings zeigen die Werte eine höhere Streuung als bei den Messungen in Abwesenheit von DNA. Eine Auswertung der Titration mit einem 1:1-Bindungsmodell ergibt eine ungefähre Dissoziationskonstante K_D (Gyrase-DNA/mantADP) von 44 ± 42 μM bezogen auf GyrB-Monomere bzw. 22 ± 21 μM bezogen auf tetramere Gyraseeinheiten. Dieser Wert ist mit den Bindungskonstanten, die in DNA-Abwesenheit gemessen wurden, in Übereinstimmung zu bringen. Trotz der relativ hohen Fehlergrenzen bei der Einzelpunkt- K_D -Bestimmung kann also angenommen werden, dass auch die Anwesenheit von DNA keinen Einfluss auf die Nukleotidbindung durch GyrB hat. Mit dem letzten Messansatz (5 μM mantADP + 34 μM Gyrase + 10 μM pUC18) wurde schließlich eine ADP-Verdrängungstitration durchgeführt, die jedoch wegen der hohen Ungenauigkeiten in diesem System keine auswertbaren Daten mehr lieferte.

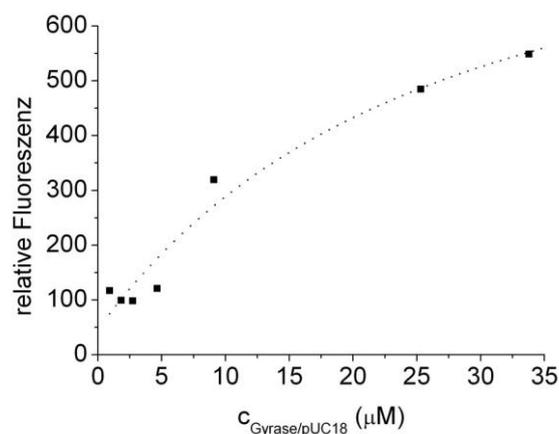


Abbildung 38: Einzelpunkt-Fluoreszenztitration mit GyrB WT in Anwesenheit von GyrA und DNA. 5 μM mantADP wurde mit einer 1:1-Mischung aus Gyrase und pUC18 titriert und die Fluoreszenzintensität oberhalb von 435 nm in einem Mikroplattenfluorimeter gemessen ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm). Aus der Kurvenanpassung ergibt sich eine Dissoziationskonstante K_D (Gyrase-DNA/mantADP) = 44 ± 42 μM (bezogen auf GyrB-Monomereinheiten).

4.3.1.4 GyrB E44Q

Die GyrB-Mutante E44Q ist nicht in der Lage, ATP zu spalten. Die Frage, ob sie das Nukleotid trotzdem bindet, wurde mit einer Fluoreszenztitration von 5 μM mantADP mit einem Proteinüberschuss beantwortet. Die relative Intensität der Fluoreszenz bei 440 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm) nahm während der Messung schrittweise zu, allerdings deutlich langsamer als bei einer Titration mit GyrB WT. Aus diesem Grund wurde der Sättigungsbereich auch bei einer hohen eingesetzten Proteinmenge (56 μM) nicht erreicht. Dennoch lässt sich die Kurve in Abb. 39 unter Verwendung eines 1:1-Bindungsmodells fitten, was eine Dissoziationskonstante K_D (GyrB E44Q/mantADP) von 240 ± 20 μM ergibt. Folglich bindet GyrB E44Q das fluoreszierende ADP-Analogon, wenn auch ungefähr sechsmal schlechter als der Wildtyp. Da die Mutante ATPase-defizient ist, konnte anschließend eine Verdrängungstitration mit ATP durchgeführt werden, ohne dass die Auswertung durch eine einsetzende Substrathydrolyse während der Messung beeinträchtigt wurde. Für die Konstante K_D (GyrB E44Q/ATP) ergibt sich ein Wert von 315 ± 29 μM . Die Fluoreszenz bei 440 nm ging am Ende der Rücktitration praktisch auf den Ausgangswert von freiem mantADP zurück, d. h. der Sättigungsbereich wurde in diesem Fall erreicht.

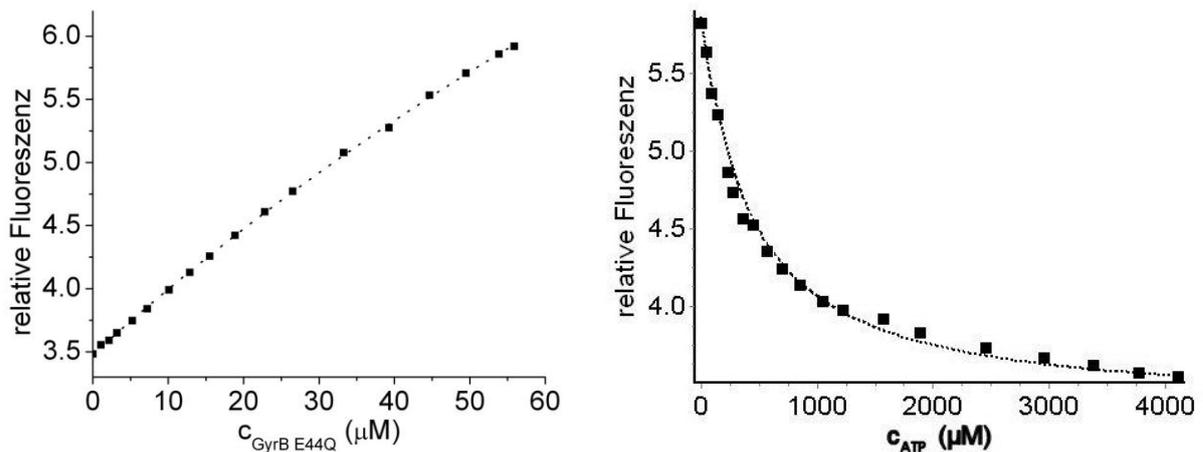


Abbildung 39: Nukleotidbindung durch die ATPase-defiziente Mutante GyrB E44Q. 5 μM mantADP wurde mit einem Überschuss an GyrB E44Q titriert und die Zunahme der Fluoreszenz bei 440 nm verfolgt ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm; linkes Bild). Aus der Kurvenanpassung ergibt sich eine Dissoziationskonstante K_D (GyrB E44Q/mantADP) = 240 ± 20 μM . Bei der anschließenden Verdrängungstitration mit ATP nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab (rechtes Bild). Die Bestimmung von K_D (GyrB E44Q/ATP) wird wegen der ATPase-Defizienz der GyrB-Mutante nicht durch eine Hydrolyse des Substrats beeinflusst und ergibt den Wert 315 ± 29 μM .

4.3.1.5 Nukleotidanaloga

Durch Verdrängungstitrationen mit den ATP-Analoga ATP γ S und AMPPNP wurde deren Affinität zur Gyrase untersucht. Eine Mischung aus 5 μM mantADP und 54,6 μM GyrB WT wurde zunächst mit

einem Überschuss an AMPPNP titriert und schrittweise die Abnahme der Fluoreszenz bei 440 nm verfolgt (Abb. 40). Die Kurve erreicht einen Sättigungsbereich und lässt sich gut mit dem verwendeten Bindungsmodell beschreiben. Eine Anpassung liefert die Dissoziationskonstante K_D (GyrB/AMPPNP) = $117 \pm 16 \mu\text{M}$, d. h. das Nukleotid bindet ungefähr dreimal schlechter als ADP. Für die Auswertung wurde der K_D -Wert aus der Hintitration mit mantADP ($40 \mu\text{M}$) verwendet. Eine gleichartige Mischung wurde mit einem Überschuss an ATP γ S titriert, wobei sich ein K_D (GyrB/ATP γ S) = $120 \pm 16 \mu\text{M}$ ergibt. Auch in diesem Fall lag am Ende der Messung eine Sättigung vor und die Kurvenanpassung war erfolgreich. Gyrase ist also in der Lage, beide Nukleotidanaloga mit einer relativ hohen Affinität zu binden.

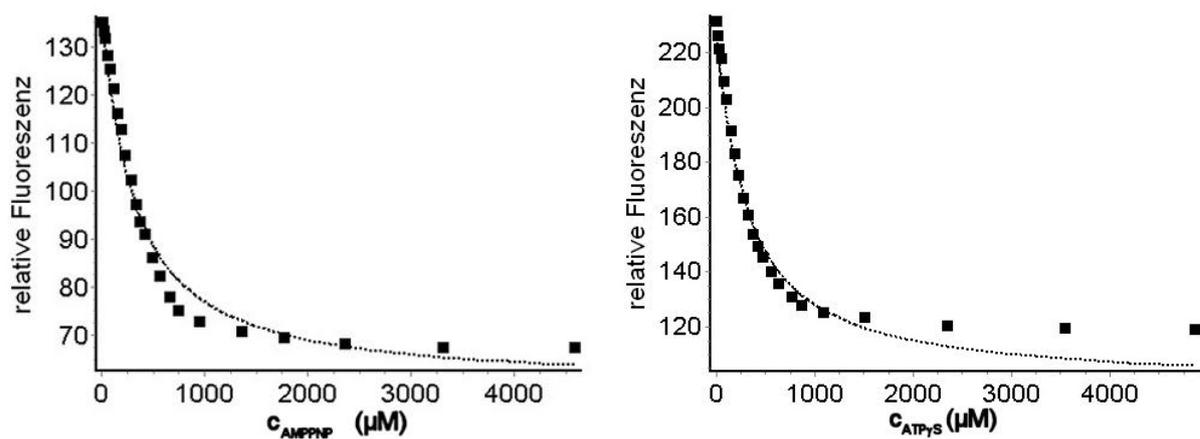


Abbildung 40: Untersuchung der Bindung von AMPPNP und ATP γ S an GyrB. Eine Mischung aus $5 \mu\text{M}$ mantADP und $54,6 \mu\text{M}$ GyrB WT wurde mit einem Überschuss an AMPPNP (linkes Bild) bzw. ATP γ S (rechtes Bild) titriert und die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt. Die Kurvenanpassung der Verdrängungstitrationen führt zu den beiden Dissoziationskonstanten K_D (GyrB/AMPPNP) = $117 \pm 16 \mu\text{M}$ bzw. K_D (GyrB/ATP γ S) = $120 \pm 16 \mu\text{M}$. Als K_D (GyrB/mantADP) wurde der Wert $40 \mu\text{M}$ verwendet.

4.3.2 Messung der Bindungskinetik

Manuelle Mischungsexperimente zur Kinetik der Nukleotidbindung durch GyrB waren nicht erfolgreich: Die mantADP-Dissoziation aus der GyrB-Bindungstasche nach einer Zugabe von ADP im Überschuss war nach der Totzeit von ca. 10 s bereits abgeschlossen. Die Fluoreszenzintensität bei 440 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) blieb nach dem Beginn der Aufzeichnung konstant bei einem Wert, der ungefähr der Emission von freiem mantADP entspricht. Ein inverses Experiment, bei dem ein GyrB-ADP-Komplex mit einem Überschuss an mantADP versetzt und der Einfluss auf die Fluoreszenz verfolgt wurde, führte ebenfalls zu einem konstanten Emissionsverlauf. Aus diesen manuellen Kinetikmessungen folgt zunächst, dass die Geschwindigkeitskonstante k der GyrB-Nukleotid-Bindung oberhalb von etwa $0,5 \text{ s}^{-1}$ liegt, da dies zu einem Abschluss der Dissoziation innerhalb der 10-s-Totzeit führt.

Durch eine Anwendung der *Stopped-Flow*-Technik konnte die Totzeit auf wenige ms reduziert werden, was eine exakte Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante k ermöglichte. Eine Mischung aus $10\ \mu\text{M}$ GyrB und $5\ \mu\text{M}$ mantADP wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ mit einem 1000fachen ADP-Überschuss vermischt und die zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität untersucht (Abb. 41). Die Kurve lässt sich relativ gut mit einer einfachen Exponentialfunktion beschreiben, was eine Ratenkonstante $k = 24,0 \pm 0,1\ \text{s}^{-1}$ liefert. Die Bindung eines Nukleotids an GyrB scheint daher direkt, d. h. ohne Zwischenstufen, abzulaufen. Nach ca. $0,2\ \text{s}$ war die mantADP-Dissoziation und damit die Emissionsabnahme bereits weitgehend abgeschlossen. Die Halbwertszeit der Bindung $t_{1/2}$ beträgt in diesem Fall $28,9 \pm 0,1\ \text{ms}$. Eine doppelte Exponentialfunktion beschreibt die Daten erwartungsgemäß noch besser, allerdings ist die Herkunft der zweiten Phase unklar. Die beiden Ratenkonstanten würden in diesem Fall $k_1 = 93,0 \pm 5,7\ \text{s}^{-1}$ (Amplitude 26 %) und $k_2 = 20,2 \pm 0,2\ \text{s}^{-1}$ (Amplitude 74 %) betragen.

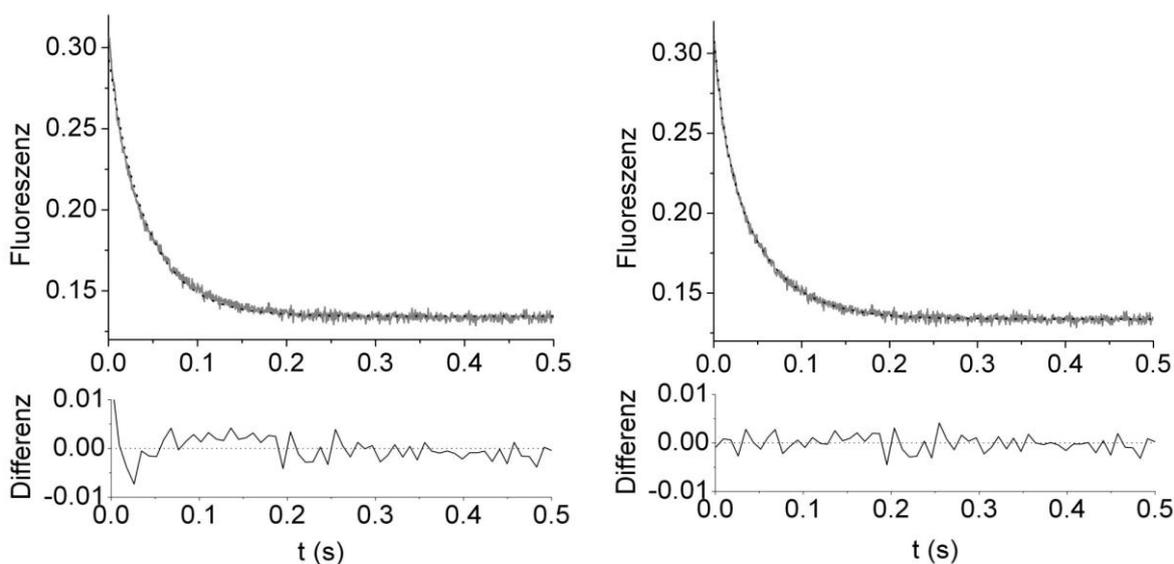


Abbildung 41: *Stopped-Flow*-Bindungskinetik. Eine Mischung aus $10\ \mu\text{M}$ GyrB und $5\ \mu\text{M}$ mantADP wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ mit $5\ \text{mM}$ ADP vermischt und die Abnahme der Fluoreszenzintensität verfolgt. Die Kurve lässt sich mit einer einfachen Exponentialfunktion ($k = 24,0 \pm 0,1\ \text{s}^{-1}$) gut beschreiben (linkes Diagramm). Eine doppelte Exponentialfunktion ($k_1 = 93,0 \pm 5,7\ \text{s}^{-1}$, Amplitude 26 %; $k_2 = 20,2 \pm 0,2\ \text{s}^{-1}$, Amplitude 74 %) beschreibt die Daten v. a. im Bereich $t < 0,2\ \text{s}$ etwas besser (rechtes Diagramm); allerdings ist der Ursprung der zweiten Phase unklar.

4.3.3 Bindung von GyrA an DNA

Zur Bestimmung von K_D (GyrA/DNA) wurde eine Anisotropietitration mit fluoreszierender DNA durchgeführt. $100\ \text{nM}$ eines doppelsträngigen 94-bp -Fragments, das am $5'$ -Ende mit 5-FAM markiert ist, wurde mit einem Überschuss an GyrA WT titriert und die Änderung der Anisotropie r des Farbstoffs verfolgt (Abb. 42). Freie dsDNA mit einem Molekulargewicht von ca. $60\ \text{kDa}$ weist einen niedrigen r -Wert auf, der nach einer Bindung an GyrA deutlich zunimmt. Das verwendete Bindungsmodell

beschreibt die reproduzierbaren Daten sehr gut und ergibt einen K_D -Wert von $5,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ für eine 1:1-Assoziation von GyrA und 94-bp-dsDNA. Der Sättigungsbereich wurde am Ende der Titration praktisch erreicht. Die Kurvenanpassung liefert weiterhin die beiden Anisotropiekoeffizienten für das freie Substrat $r_s = 0,064 \pm 0,001$ sowie für den Enzym-Substrat-Komplex $r_{ES} = 0,180 \pm 0,001$. Eine Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums von 5-FAM-dsDNA bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm zeigt ein Maximum bei 518 nm. Die Amplitude des Spektrums verschiebt sich nach der Zugabe von GyrA WT praktisch nicht, woraus folgt, dass sich die Quantenausbeute nicht ändert und dass die Fluoreszenz nach der GyrA-Bindung nicht gequencht wird. Die ermittelte Dissoziationskonstante lässt sich zu K_D (GyrA/bp) = $470 \pm 19 \mu\text{M}$ (K_{D0} ; bezogen auf die Anzahl der Basenpaare) umrechnen. Bei großen DNA-Molekülen wie z. B. einem Plasmid ist damit zu rechnen, dass die Gyrase bzw. GyrA mehrfach an dasselbe Substrat binden, wenn das Protein im Überschuss vorliegt. Für pUC18 (2686 bp) ergibt sich daher ein theoretischer K_D (GyrA/pUC18) = $0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Diesen Wert erhält man – unter der Annahme, dass die Anzahl der gebundenen GyrA-Moleküle proportional zur DNA-Länge ist – aus der Division des K_{D0} -Wertes durch die Anzahl der Basenpaare im Substrat.

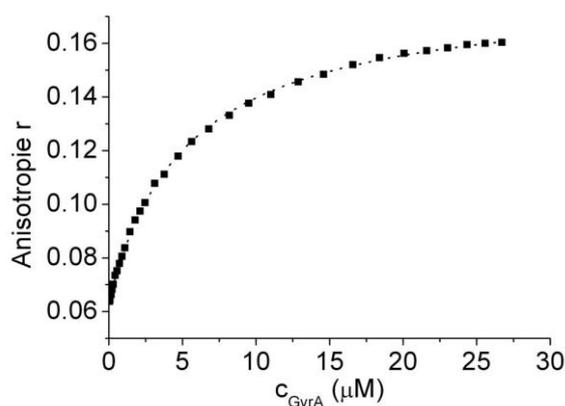


Abbildung 42: Anisotropietitration zur Bestimmung von K_D (GyrA/DNA). 100 nM einer mit 5-FAM markierten 94-bp-dsDNA wurde mit einem Überschuss an GyrA WT titriert und schrittweise die Zunahme der Anisotropie r verfolgt. Die gesuchte Dissoziationskonstante K_D (GyrA/94-bp-dsDNA) beträgt $5,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

4.3.4 Bindung von GyrA an GyrB

4.3.4.1 Anisotropietitrationen

Die Bindung von GyrA an GyrB wurde mit einer Serie von vier Anisotropietitrationen untersucht. GyrB C414S wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (0,3 μM ; 1 μM ; 5 μM und 15 μM) vorgelegt und jeweils mit einem Überschuss an GyrA WT titriert (Abb. 43). Die Signaländerung bestand aus der Zunahme der Anisotropie r des Farbstoffs Alexa488, der kovalent am einzigen Cystein der GyrB-Mutante (C58) gebunden war (Markierungseffizienz 55%). Zu Beginn einer Messreihe ($c_{\text{GyrA}} = 0 \mu\text{M}$) lag das

markierte GyrB ausschließlich als Monomer mit einer Anisotropie von 0,17 – 0,18 vor, während es im Verlauf der Titration schrittweise mit dem zugegebenen GyrA komplexierte. Der r -Wert erhöhte sich daraufhin wegen der deutlichen Zunahme des Molekulargewichts auf über 0,2, wobei eine Sättigung in allen vier Titrationen erreicht wurde. Weiterhin fällt auf, dass die Titrationskurven v. a. bei höheren GyrB-Konzentrationen (5 bzw. 15 μM) einen Knick aufweisen. Dieser fällt mit der Stelle zusammen, an der die Monomerkonzentrationen von beiden Untereinheiten übereinstimmen, was ein Hinweis auf die 1:1-Stöchiometrie in der tetrameren Gyrase (A_2B_2) ist.

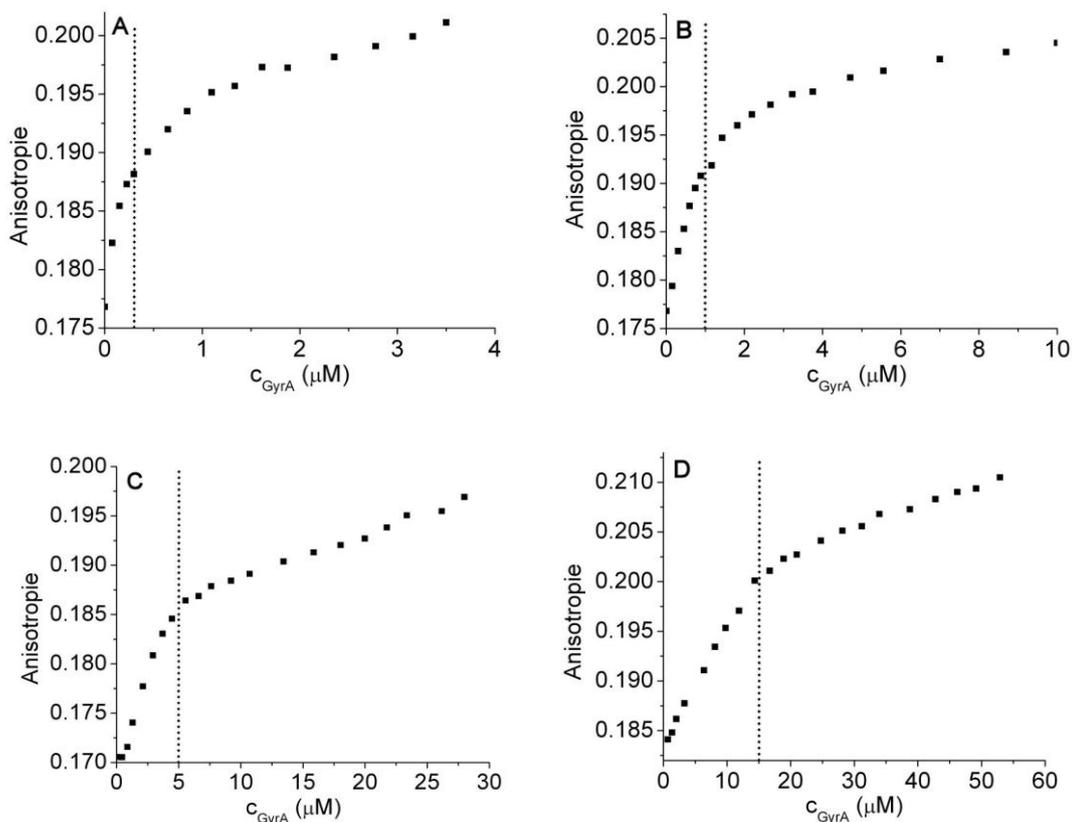


Abbildung 43: Einzelne Anisotropietitrationskurven. GyrB C414S-Alexa488 mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (A: 0,3 μM ; B: 1 μM ; C: 5 μM ; D: 15 μM) wurde jeweils mit einem Überschuss an unmarkiertem GyrA WT (aufgetragen in Monomereinheiten) titriert. Die Anisotropie des gebundenen Farbstoffs nimmt wegen der Bildung der oligomeren Gyrase zu. Gepunktete Linien geben die Stellen an, bei denen die Monomerkonzentrationen von GyrA und GyrB identisch sind.

Die vier Messreihen wurden anschließend mit einer globalen Kurvenanpassung analysiert. Dabei wurde ein Bindungsmodell verwendet, in dem ein monomeres GyrB zuerst an dimeres GyrA (A_2) bindet und ein weiteres GyrB-Molekül mit dem entstandenen A_2B die tetramere Gyrase A_2B_2 bildet. Um systembedingte Schwankungen in den vier Titrationen auszugleichen, wurde die Anisotropie normiert, d. h. der Startwert (in Abwesenheit von GyrA) wurde jeweils auf den Wert $r = 1$ gesetzt. Der globale Fit ist stabil und beschreibt die vier Messreihen sehr schön (Abb. 44). Der ermittelte K_{D1} -Wert für die Bindung von GyrB

an dimeres GyrA zum Trimer A_2B beträgt $1,26 \pm 0,04 \mu\text{M}$. Die Bindungskonstante K_{D2} , die die Bildung des Tetramers aus GyrB und A_2B beschreibt, hat den Wert $0,018 \pm 0,001 \mu\text{M}$. Daraus folgt, dass das zweite GyrB etwa 70fach besser an ein GyrA-Dimer bindet als das erste. Da die Assoziation einer zweiten GyrB-Untereinheit durch die Anwesenheit der ersten deutlich erleichtert wird, ist davon auszugehen, dass bei gleicher GyrB- und GyrA-Konzentration hauptsächlich Tetramere vorliegen. Trimere werden dagegen nur dann in hoher Menge gebildet, wenn einer der beiden Bindungspartner im deutlichen Überschuss gegenüber dem anderen vorliegt. Aus dem Fit erhält man weiterhin die relativen Anisotropiekoeffizienten $r_B = 1,00$, $r_{AAB} = 1,31$ und $r_{AABB} = 1,10$ (jeweils $\pm 0,01$). Interessanterweise ist die Anisotropie des Trimers (255,7 kDa) deutlich höher als diejenige des Tetramers, obwohl dieses mit 327,2 kDa ein höheres Molekulargewicht besitzt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass der größte Komplex am langsamsten rotiert und daher den höchsten r-Wert besitzt. Die Trimerform weicht aber deutlich eher von der idealen Kugelform ab als im Fall des Tetramers und es besteht die Möglichkeit, dass dieser Effekt eine größere Rolle im Anisotropieverhalten spielt als der gegenläufige Effekt der Massenzunahme.

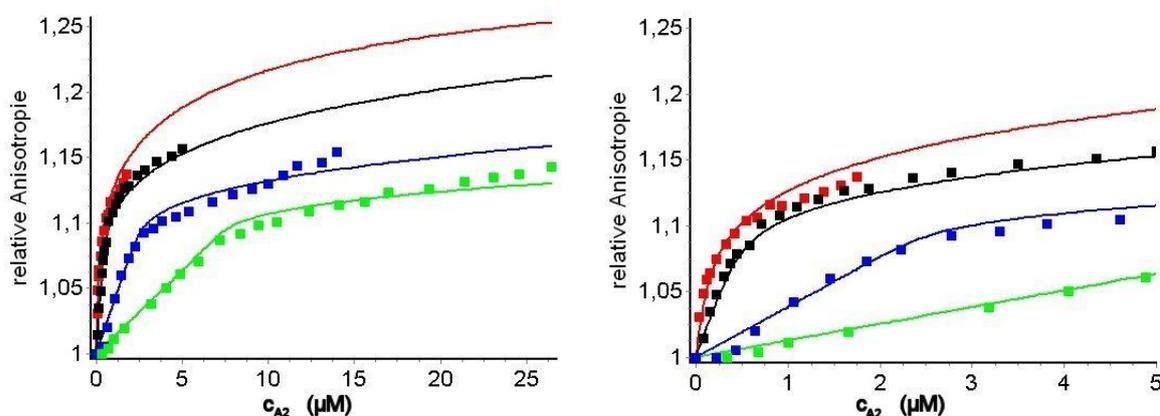


Abbildung 44: Globaler Fit der Anisotropietitrationsen. Die Serie aus den vier Messreihen wurde mit einer gemeinsamen Kurvenanpassung analysiert (linkes Bild). GyrA ist in dieser Darstellung in seiner Dimerkonzentration $[A_2]$ gegen die relative Anisotropie aufgetragen. Die einzelnen Titrationsen sowie ihre jeweiligen Anpassungslinien sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (rot: $0,3 \mu\text{M}$ GyrB; schwarz: $1 \mu\text{M}$; blau: $5 \mu\text{M}$; grün: $15 \mu\text{M}$). Das rechte Bild zeigt den Ausschnitt aus dem linken Diagramm von $[A_2] = 0 - 5 \mu\text{M}$, damit die Messreihen mit $0,3 \mu\text{M}$ bzw. $1 \mu\text{M}$ GyrB besser erkennbar sind. Als Ergebnis aus dem globalen Fit erhält man die beiden Bindungskonstanten K_{D1} (GyrB/A_2) = $1,26 \pm 0,04 \mu\text{M}$ und K_{D2} (GyrB/A_2B) = $0,018 \pm 0,001 \mu\text{M}$. Das zweite GyrB bindet also ca. 70fach besser an ein GyrA-Dimer als das erste.

4.3.4.2 Tetramer- und Trimerbildung

Mit den vorliegenden K_D -Werten für die Bindung des ersten und zweiten GyrB-Monomers an ein GyrA-Dimer ist es nun möglich, für alle beliebigen Konzentrationen von GyrA und GyrB die Mengen aller auftretenden Spezies in der Mischung im Gleichgewicht vorherzusagen. Dazu kann mit dem Programm *Scientist* eine Simulation in Abhängigkeit von c_{GyrA} und c_{GyrB} mit den oben bestimmten (fixen)

Bindungskonstanten durchgeführt werden. Abb. 45 zeigt beispielhaft zwei Simulationen mit $[\text{GyrB}]_0 = 0,3 \mu\text{M}$ bzw. $15 \mu\text{M}$, in denen die Konzentrationen von A_2 , GyrB , A_2B und A_2B_2 in Abhängigkeit von $[\text{A}_2]_0$ aufgetragen sind. Mit $[\text{A}_2]_0$ und $[\text{GyrB}]_0$ werden die Ausgangskonzentrationen des dimeren A_2 bzw. monomeren GyrB bezeichnet, die nach der Vermischung zur Bildung aller Spezies in bestimmten Mengen führen. Es ist zu berücksichtigen, dass das zugrundeliegende Bindungsmodell die beiden (biologisch gleichwertigen) Formen A_2B und BA_2 unterscheidet, in denen die Untereinheit GyrB an der einen bzw. anderen Seite auf dem symmetrischen GyrA -Dimer sitzt. Die tatsächliche gesamte Trimerkonzentration ist deshalb doppelt so hoch wie im Diagramm angegeben. Bei annähernd gleichen Ausgangsmengen an GyrA und GyrB liegt neben ungebundenen Monomeren hauptsächlich der tetramere (d. h. biochemisch aktive) Zustand A_2B_2 vor, während das physiologisch vermutlich inaktive Trimer erst bei einem deutlichen GyrA -Überschuss in nennenswerter Menge gebildet wird. Bei $[\text{GyrA}] \gg [\text{GyrB}]$ existieren keine Tetramere, sondern alle GyrB -Untereinheiten liegen als Trimere vor. Die Kurven in Abb. 45 werden erwartungsgemäß umso schärfer, je deutlicher die Ausgangskonzentrationen von GyrA bzw. GyrB über den beiden K_D -Werten liegen. Der Tetrameranteil bei einem 1:1-Verhältnis der Untereinheiten ($[\text{GyrA}] = [\text{GyrB}]$) ist ebenfalls stark von der vorhandenen Proteinmenge abhängig: Während oberhalb von ca. $10 \mu\text{M}$ GyrA/GyrB fast ausschließlich A_2B_2 vorliegt ($> 95 \%$), führen äquimolare Konzentrationen im Bereich der K_D -Werte ($0,1 - 1 \mu\text{M}$) zu einem hohen Anteil von A_2 und GyrB im Gemisch. Bei Gyrase-Experimenten im nM-Bereich bildet also nur ein kleiner Teil der Untereinheiten die gewünschten Tetramere aus.

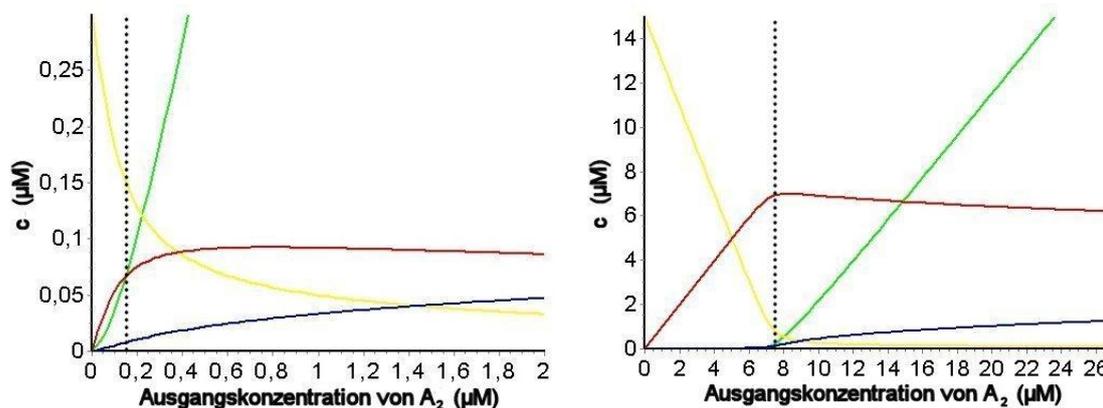


Abbildung 45: Konzentrationen aller auftretenden Spezies nach der Mischung von GyrA mit GyrB . Die Simulationen wurden mit fixen Bindungskonstanten $K_{D1} = 1,26 \mu\text{M}$ und $K_{D2} = 0,018 \mu\text{M}$ sowie einer GyrB -Ausgangsmonomerkonzentration von $0,3 \mu\text{M}$ (linkes Bild) bzw. $15 \mu\text{M}$ (rechtes Bild) durchgeführt. Die Diagramme zeigen die Gleichgewichtskonzentrationen der Verbindungen A_2 (grün), GyrB (gelb), A_2B bzw. BA_2 (blau) und A_2B_2 (rot) in Abhängigkeit von der A_2 -Ausgangskonzentration. Da bei der Auswertung die beiden Formen A_2B und BA_2 unterschieden werden, ist die gesamte auftretende Trimerkonzentration doppelt so hoch. Schwarze gepunktete Linien zeigen die Stellen an, bei denen eine 1:1-Stöchiometrie zwischen GyrA und GyrB besteht. Der tetramere Zustand ist klar bevorzugt, während Trimere hauptsächlich bei einem deutlichen Überschuss von GyrA auftreten. Die Kurven werden umso schärfer, je höher die Ausgangskonzentrationen über den beiden K_D -Werten liegen.

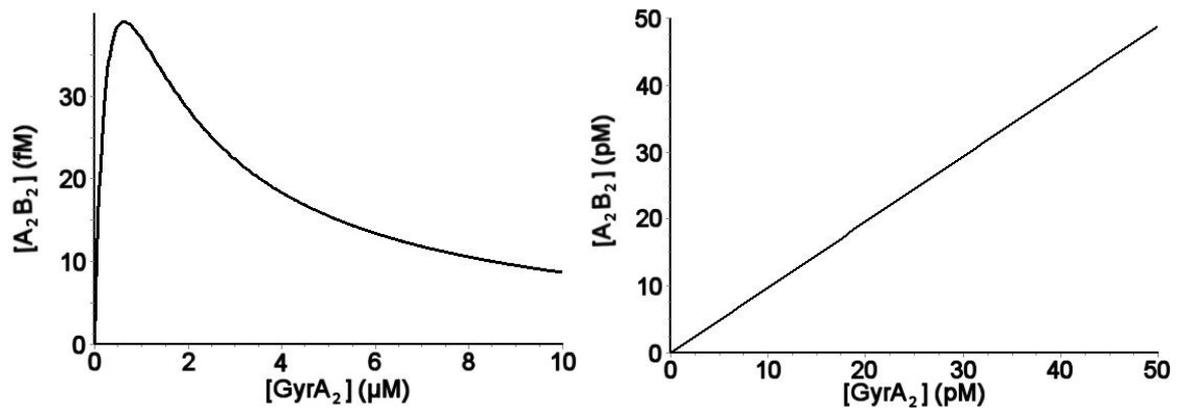


Abbildung 46: Simulation der Tetramerkonzentration in FRET-Messungen. Eine Mischung aus 75 pM GyrB (einzelmarkiert) und 1 μM GyrA₂ führt zur Bildung von 37 fM A₂B₂, d. h. nur 0,1 % aller GyrB-Monomere liegen als Teil eines doppelmarkierten Tetramers vor (einzelmarkierte Trimere: 46 pM). Bei einer Erhöhung der GyrA-Konzentration nimmt die A₂B₂-Menge wieder ab (linkes Bild). Zum Vergleich: Mischt man 75 pM GyrA-Monomere (37,5 pM GyrA₂) mit 2 μM GyrB, so ergeben sich 37 pM A₂B₂ (rechtes Bild). Bei Einzelmolekül-FRET-Messungen am C-Tor, am DNA-Tor und an der CTD von GyrA sind damit 99 % aller GyrA-Untereinheiten Bestandteil eines doppelmarkierten Tetramers, was gute Ergebnisse verspricht. Im Gegensatz dazu ist es unmöglich, mit der vorliegenden Methode Konformationsstudien am N-Tor der Gyrase durchzuführen, da bei der notwendigen GyrB-Konzentration im pM-Bereich ($[GyrA] \gg [GyrB]$) praktisch kein A₂B₂ gebildet wird. (Weitere Erläuterungen siehe 5.3.2.3).

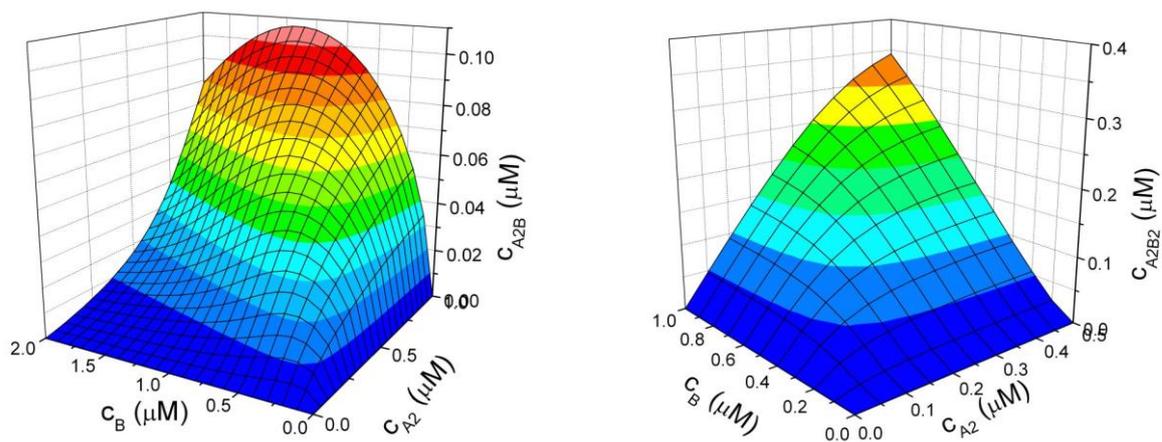


Abbildung 47: 3D-Diagramme. Die Modelle zeigen die Gleichgewichtskonzentration von Trimer (linkes Bild) bzw. Tetramer (rechtes Bild) in Abhängigkeit von den Ausgangsmengen des dimeren A₂ und des monomeren GyrB. Die Oligomerkonzentration ist farblich abgestuft in der dritten Dimension dargestellt. Die schwarzen Gitternetzlinien verdeutlichen den Verlauf bei konstanter Menge von GyrA bzw. GyrB.

Zweidimensionale Simulationen, bei denen gleichzeitig die Ausgangskonzentrationen von GyrA und GyrB variiert werden, führen zu 3D-Diagrammen, in denen die Menge an Trimer bzw. Tetramer entlang der z-Achse aufgetragen ist (Abb. 47). Es ist klar zu erkennen, dass die gewölbten Flächen – insbesondere im Trimerdiagramm – asymmetrisch verlaufen. Die dreidimensionale Darstellung ermöglicht ein

schnelles Ablesen der gesuchten A_2B - bzw. A_2B_2 -Konzentration bei gegebenen Ausgangsmengen der beiden Untereinheiten.

4.3.4.3 Verdrängungstitration

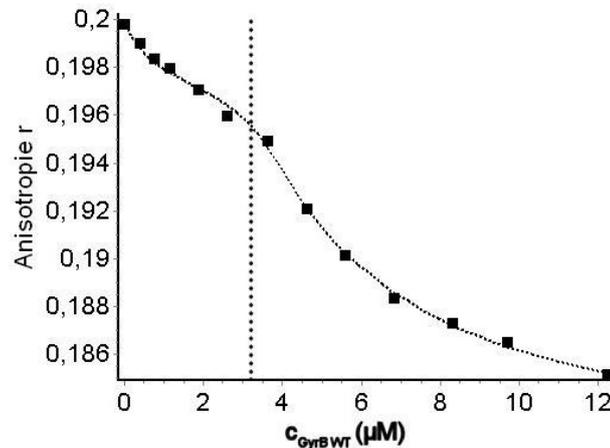


Abbildung 48: Anisotropieverdrängungstitration. Eine Mischung aus $0,3 \mu\text{M}$ GyrB C414S-Alexa488 und $3,5 \mu\text{M}$ GyrA WT (Monomerkonzentration) wurde mit einem Überschuss an unmarkiertem GyrB WT titriert und die Abnahme der Anisotropie verfolgt. Die schwarze gepunktete Linie bei $[\text{GyrB WT}] = 3,2 \mu\text{M}$ gibt die Stelle an, bei der eine 1:1-Stöchiometrie zwischen GyrA und GyrB (markiert und unmarkiert) besteht. Die Bindungskonstanten für den unmarkierten WT von GyrB und GyrA betragen $K_{D B1} (\text{GyrB}/A_2) = 1,08 \pm 0,06 \mu\text{M}$ und $K_{D B2} (\text{GyrB}/A_2B) = 0,018 \pm 0,001 \mu\text{M}$.

Zur Kontrolle, ob die Alexa488-markierte Mutante GyrB C414S das gleiche Bindungsverhalten zeigt wie der unmarkierte Wildtyp von GyrB, wurde eine Anisotropieverdrängungstitration durchgeführt. Eine Mischung aus $0,3 \mu\text{M}$ GyrB C414S-Alexa488 und $3,5 \mu\text{M}$ GyrA WT (Monomerkonzentration) wurde mit einem Überschuss an GyrB WT titriert, so dass der Wildtyp die markierte Mutante schrittweise aus dem Komplex mit GyrA verdrängt (Abb. 48). Durch die erneute Monomerbildung nimmt die Anisotropie r des gekoppelten Farbstoffs daher ab. Das verwendete Bindungsmodell beschreibt die Messdaten wiederum sehr gut und führt bei vergleichbaren Konzentrationen der beiden Untereinheiten zu einer Beule, die auch während der Verdrängungstitration reproduzierbar ist. Für den unmarkierten Wildtyp von GyrB ergeben sich die Bindungskonstanten $K_{D B1} (\text{GyrB}/A_2) = 1,08 \pm 0,06 \mu\text{M}$ und $K_{D B2} (\text{GyrB}/A_2B) = 0,018 \pm 0,001 \mu\text{M}$. Diese Werte stimmen praktisch mit den Ergebnissen aus der globalen Kurvenanpassung überein, was bedeutet, dass GyrB C414S-Alexa488 und GyrB WT ein identisches Bindungsverhalten gegenüber GyrA aufweisen.

Die Betrachtung der Fluoreszenzspektren (Abb. 49) ist eine weitere Kontrolle, um die Qualität der K_D -Bestimmung sicherzustellen. Eine Lösung aus $0,3 \mu\text{M}$ GyrB C414S-Alexa488 emittiert nach einer Anregung bei 494 nm Fluoreszenz mit einem Maximum bei 516 nm . Das Emissionsspektrum verschiebt

sich nur geringfügig, nachdem die markierte Mutante mit einem Überschuss an unmarkiertem GyrA WT titriert wurde. Auch während der anschließenden Verdrängungstitration mit GyrB WT bleibt die Amplitude praktisch konstant. Während der Messung trat also keine Aggregatbildung des Proteins auf – diese hätte zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität geführt. Eine Aggregation hätte die Auswertung der Anisotropietitrationen und damit die Bestimmung der K_D -Werte deutlich erschwert. Ebenso kann festgestellt werden, dass die Bindung von markiertem GyrB an GyrA nicht zu einem Quenching und somit zu einer Emissionsabnahme führt. Daher sind keine Korrekturfaktoren, mit denen man einen derartigen Effekt berücksichtigen könnte, notwendig.

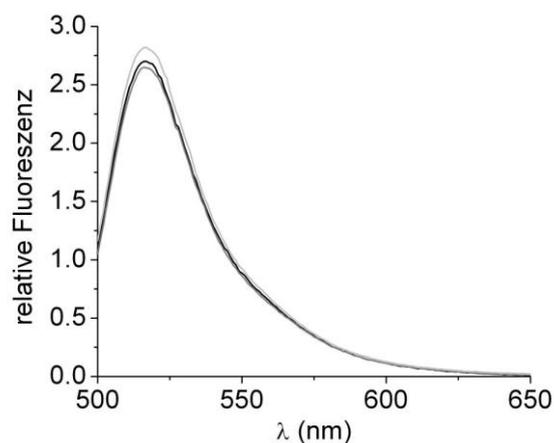


Abbildung 49: Fluoreszenzspektren während der Anisotropietitration. Eine Lösung aus $0,3 \mu\text{M}$ GyrB C414S-Alexa488 zeigt bei $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ ein Emissionsmaximum bei 516 nm (schwarze Kurve). Die Amplitude ändert sich nach der Hintitration mit GyrA WT (dunkelgraue Kurve) sowie nach der anschließenden Verdrängungstitration mit GyrB WT (hellgraue Kurve) nur geringfügig. Die Auswertung der Anisotropietitrationen wird also nicht durch eine Aggregation des Proteins gestört, die zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität führen würde.

4.3.5 GEMSA-Ergebnisse

Die Affinität von GyrA zu DNA wurde durch Gelverschiebungstests (GEMSA) untersucht. Als Substrat wurde zunächst pUC18 (2686 bp) verwendet, das zuvor mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* einmal geschnitten und daher linearisiert wurde. Ein auf diese Art behandeltes Plasmid ist besser für GEMSA-Studien geeignet als native ringförmige DNA, da diese in einem Spannungsfeld je nach Zustand der Spiralisierung unterschiedlich schnell wandert bzw. ein Bandenmuster erzeugt. 15 nM lineares pUC18 (entspricht $26,2 \mu\text{g/ml}$) wurde mit einer steigenden Menge an GyrA WT ($0 - 4 \mu\text{M}$) vermischt und die Ansätze nach einstündiger Inkubation bei RT auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen ($100 \text{ V } 90 \text{ min}$). Abb. 50 zeigt, dass bei zunehmender GyrA-Menge eine deutliche Bandenverschiebung eintritt, was auf eine Protein-DNA-Interaktion hindeutet. Wegen des höheren Molekulargewichts des Komplexes wandert der gebundene Anteil der DNA langsamer als bei Abwesenheit von GyrA. Weiterhin ist zu erkennen,

dass die Bindung nicht zu einer definierten Laufweite des Komplexes führt, sondern die Verschiebung umso größer wird, je mehr Protein im Ansatz vorliegt. Dies weist auf eine Mehrfachbindung hin, d. h. dasselbe DNA-Molekül wird bei hohen Proteinkonzentrationen von mehreren GyrA-Untereinheiten gleichzeitig gebunden. Da es sich bei der Interaktion um einen dynamischen Prozess handelt, ist anzunehmen, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt jedes pUC18 eine vergleichbare Anzahl an GyrA-Molekülen gebunden hat. Der Protein-DNA-Komplex bildet daher einen Fleck auf dem Agarosegel aus, dessen Position von der GyrA-Konzentration abhängig ist. Da das Bindungsverhalten wegen der starken Mehrfachinteraktion nicht mit einem 1:1-Bindungsmodell beschrieben werden kann, ist es nicht möglich, auf diese Art den K_D -Wert (GyrA/DNA) zu bestimmen.

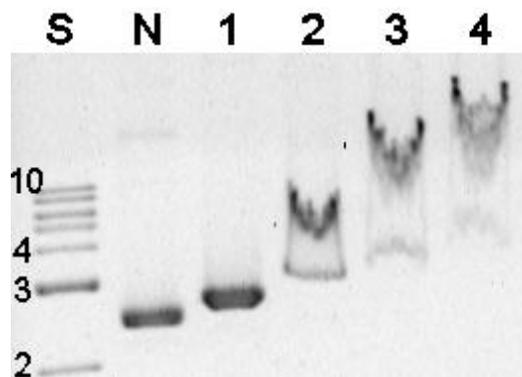


Abbildung 50: Gelverschiebungstest mit linearisiertem Plasmid. 15 nM pUC18, das zuvor mit *EcoRI* geschnitten wurde, und eine steigende Menge an GyrA WT wurden vermischt und mittels 1%iger Agarose-Gelelektrophorese (100 V 90 min) untersucht. Die GyrA-Konzentrationen betragen 0 μM (1), 1 μM (2), 2 μM (3) bzw. 4 μM (4). S bezeichnet den DNA-Standard (die Zahlen geben die Länge einiger Fragmente in kbp an) und N steht für superspiralisiertes pUC18, das wegen seiner Kompaktheit schneller wandert als lineare DNA. Je mehr GyrA im Ansatz vorliegt, desto deutlicher ist eine Bandenverschiebung zu erkennen, allerdings ist das Bild wegen der vermutlich auftretenden (schlecht definierbaren) Mehrfachbindung des Proteins an das Plasmid nicht für eine Bestimmung von K_D (GyrA/DNA) geeignet.

Das Problem der Mehrfachbindung konnte durch die Verwendung eines kleinen 94-bp-dsDNA-Fragments weitgehend vermieden werden. 328 nM dieses Substrats (entspricht 20 $\mu\text{g/ml}$) mit einer spezifischen Gyrase-Bindestelle wurden mit einer zunehmenden Menge an GyrA WT (0 – 10 μM) vermischt und 1 h bei RT inkubiert. Das Ergebnis der 2%igen Agarose-Gelelektrophorese (100 V 90 min) ist in Abb. 51 zu sehen: Bei steigender GyrA-Konzentration tritt eine sichtbare Bandenverschiebung ein, allerdings ergibt sich in diesem Fall (im Gegensatz zum pUC18-Versuch) ein definiertes Niveau für den Protein-DNA-Komplex. Ein dsDNA-Substrat wird zunächst nur von genau einem GyrA-Molekül gebunden, wobei der auftretende Schmier einen dynamischen Interaktionsprozess andeutet. Erst ein sehr hoher GyrA-Überschuss (oberhalb von 3 – 5 μM) führt zu einer weiteren Bande, d. h. zwei (oder maximal drei) Gyrase-Untereinheiten binden dann gleichzeitig an dasselbe DNA-Molekül. Trotzdem kann das Gelfoto wegen des definierten Wanderungsniveaus des Komplexes zur Bestimmung der ungefähren

Dissoziationskonstante K_D (GyrA/DNA) verwendet werden. Der prozentuale Anteil der gebundenen DNA wird (unter Vernachlässigung der doppelten Bindung) manuell abgeschätzt und in eine Konzentration des Komplexes umgerechnet. Der auftretende Schmier auf dem Gelfoto führt dazu, dass eine automatische Bestimmung der Bandenintensität durch das Geldokumentationsprogramm nicht hilfreich ist. c_{Komplex} ergibt bei einer Auftragung gegen die Proteinkonzentration eine Kurve, die sich relativ gut mit einem einfachen 1:1-Bindungsmodell beschreiben lässt (Abb. 51). Die Kurvenanpassung führt zu einer Bindungskonstante K_D (GyrA/94-bp-dsDNA) = $1,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ bezogen auf ein DNA-Molekül (bzw. $94 \pm 28 \mu\text{M}$ bezogen auf die Menge an Basenpaaren). Dieses Ergebnis ist wegen der Unsicherheit der manuellen Ablesung, des Schmiereffekts sowie der auftretenden Doppelbindung ab einem etwa 10fachen GyrA-Überschuss als Näherungswert zu verstehen. Der ermittelte Wert gibt also nicht den exakten K_D , sondern lediglich die Größenordnung der Konstante an.

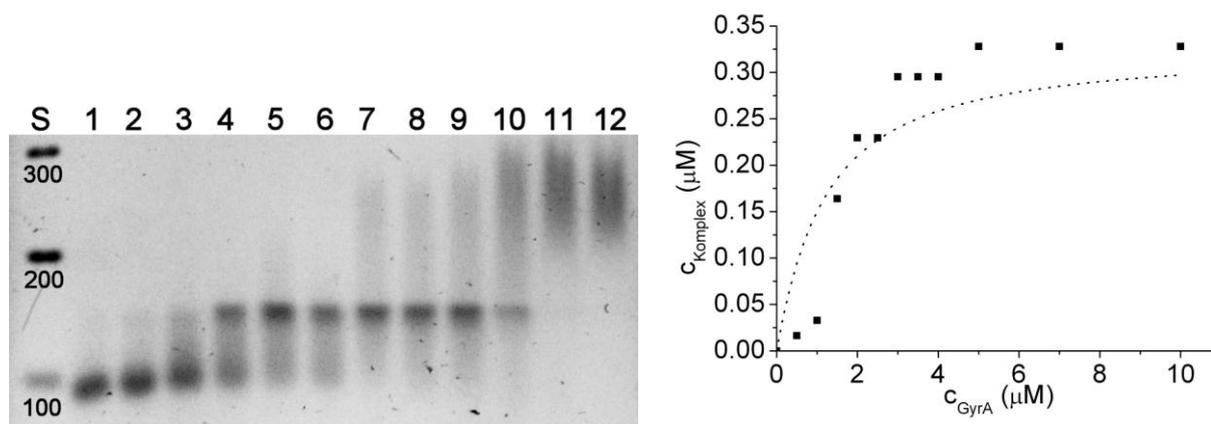


Abbildung 51: Gelferschiebungstest mit einem 94-bp-dsDNA-Fragment. 328 nM DNA und eine zunehmende Menge an GyrA WT wurden vermischt und mittels 2%iger Agarose-Gelelektrophorese (100 V 90 min) untersucht (S = DNA-Standard; die Zahlen geben die Länge der Fragmente in bp an). Die GyrA-Konzentrationen betragen $0 \mu\text{M}$ (1), $0,5 \mu\text{M}$ (2), $1 \mu\text{M}$ (3), $1,5 \mu\text{M}$ (4), $2 \mu\text{M}$ (5), $2,5 \mu\text{M}$ (6), $3 \mu\text{M}$ (7), $3,5 \mu\text{M}$ (8), $4 \mu\text{M}$ (9), $5 \mu\text{M}$ (10), $7 \mu\text{M}$ (11) bzw. $10 \mu\text{M}$ (12). Bei steigender Menge an GyrA tritt eine deutliche Bandenverschiebung ein. Trotz der Doppelbindung von GyrA an DNA ab ca. $5 \mu\text{M}$ erlaubt das Gelfoto (linkes Bild) eine Abschätzung der Konzentrationen des freien und des gebundenen Substrats. Unter Verwendung eines 1:1-Bindungsmodells führt eine Kurvenanpassung (rechtes Bild) zu einer ungefähren Dissoziationskonstante K_D (GyrA/94-bp-dsDNA) = $1,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

4.3.6 Analytische Größenausschlusschromatographie

4.3.6.1 Einzelne Untereinheiten

Die Bildung von oligomeren Zuständen aus den beiden Gyrase-Untereinheiten GyrA und GyrB wurde mit dem Verfahren der analytischen Gelfiltration untersucht. $10 \mu\text{M}$ GyrA WT wurde auf die S200-Säule aufgetragen und während dem Chromatographielauf die Absorption bei 280 nm verfolgt. Das Ergebnis ist

ein einzelnes Signal mit einem Elutionsvolumen von 10,65 ml (Abb. 52). Unter Verwendung einer Kalibrierungsgerade aus einem vorherigen Standardlauf mit globulären Proteinen bekannter Masse ergibt sich daraus ein apparentes Molekulargewicht von 253 kDa, was der 2,75fachen Masse eines GyrA-Monomers (92,1 kDa) entspricht. Es ist allerdings zu beachten, dass die analytische Gelfiltration bei Proteinen wie GyrA, deren Form stark von der idealen Kugelform abweichen, nur eine ungefähre Abschätzung des Molekulargewichts erlaubt. Daher ist anzunehmen, dass das A_{280} -Signal von dimeren GyrA₂-Einheiten (theoretisches Elutionsvolumen: 11,3 ml) erzeugt wurde, deren Bildung in der Literatur beschrieben wird. Die Anwesenheit von nur einem einzigen Signal zeigt, dass keine Monomere vorliegen bzw. dass die GyrA-Dimerisierung bei der verwendeten Konzentration vollständig und stabil ist. Ein Lauf mit 10 μ M GyrB WT führt zu einem einzelnen Elutionssignal bei 12,6 ml, was einem apparenten Gewicht von 91 kDa entspricht. Dies deutet darauf hin, dass diese Untereinheit als Monomer (71,5 kDa, theoretisches Elutionsvolumen: 13,1 ml) durch die Gelfiltrationssäule wandert. Setzt man 1 μ M bzw. 100 μ M GyrB WT ein, so erhält man ebenfalls nur ein Signal bei $V_E = 12,6$ ml, aber kein Nebensignal bei einem geringeren Elutionsvolumen. Somit liegt GyrB in allen betrachteten Konzentrationsbereichen in monomerer Form vor und ist ohne GyrA bzw. Nukleotide nicht in der Lage, ein Dimer zu bilden.

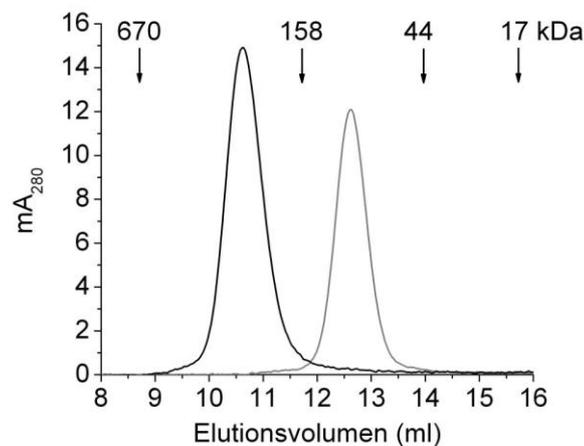


Abbildung 52: Analytische Gelfiltration mit einzelnen Gyrase-Untereinheiten. Jeweils 10 μ M von GyrA bzw. GyrB wurden auf die S200-Säule aufgetragen und während dem Lauf die Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Untereinheit GyrA (schwarze Linie) zeigt ein Elutionsmaximum bei $V_E = 10,65$ ml, was einem apparenten Molekulargewicht von 253 kDa entspricht. Eine Messung mit GyrB (graue Linie) ergibt ein Elutionsvolumen von 12,6 ml (entsprechend 91 kDa). Die Molekulargewichte und die Laufpositionen der Proteine aus dem Kalibrierungslauf sind mit Pfeilen eingezeichnet.

4.3.6.2 Tetramerbildung

Um die Oligomerisierung der Gyrase-Untereinheiten zu untersuchen, wurden zunächst Mischungen aus je 10 μ M GyrB WT sowie unterschiedlichen Konzentrationen von GyrA WT hergestellt. Diese Reihe von Ansätzen mit 2, 5, 10, 20 und 40 μ M GyrA wurde anschließend nacheinander auf die Gelfiltrationssäule

aufgetragen und der Verlauf der A_{280} verfolgt. Es stellte sich heraus, dass bei steigender GyrA-Menge im Ansatz das GyrB-Signal bei $V_E = 12,6$ ml zunehmend niedriger ausfiel (Abb. 53). Daraus folgt, dass GyrB mit der anderen Untereinheit einen Komplex bildet, der schneller durch die Säule läuft als ein freies Monomer. Das GyrA-Signal nahm dagegen mit steigender Konzentration zu. Bei genauerer Betrachtung dieses Signals fällt auf, dass das Elutionsmaximum reproduzierbar etwas nach links, d. h. zu einem höheren Molekulargewicht, wandert. Beim Ansatz mit $10 \mu\text{M}$ GyrA, in dem beide Untereinheiten in der gleichen Konzentration vorliegen und somit eine maximale Tetramerbildung erwartet wird, ist diese Verschiebung am deutlichsten. Das Elutionsvolumen beträgt hier $10,35$ ml, was einem apparenten Molekulargewicht von etwa 297 kDa entspricht und eine Bildung von A_2B_2 ($327,2$ kDa) bzw. A_2B ($255,7$ kDa) andeutet. Freies GyrA, das in Abwesenheit von GyrB als Dimer ($184,2$ kDa) durch die Säule läuft, erscheint dagegen erst bei $V_E = 10,65$ ml. Eine genaue Zuordnung des ermittelten Molekulargewichts zu einer bestimmten Spezies ist wegen der Ungenauigkeiten einer analytischen Gelfiltrationsmessung bei unglobulären Proteinen nicht möglich. Sieht man einmal davon ab, ist außerdem zu erwarten, dass nicht ausschließlich eines der Oligomere, sondern eine Mischung aus zwei bzw. mehreren Formen vorliegt. Setzt man einen vierfachen Überschuss von GyrA ($40 \mu\text{M}$) gegenüber GyrB in die Chromatographie ein, so erhält man ein Maximum bei $V_E = 10,4$ ml (289 kDa). Es ist anzunehmen, dass bei einem solchen 4:1-Verhältnis mehr Trimere bzw. GyrA-Dimere vorliegen als bei gleichen Konzentrationen der Untereinheiten, so dass das Elutionsvolumen ein wenig weiter rechts liegt.

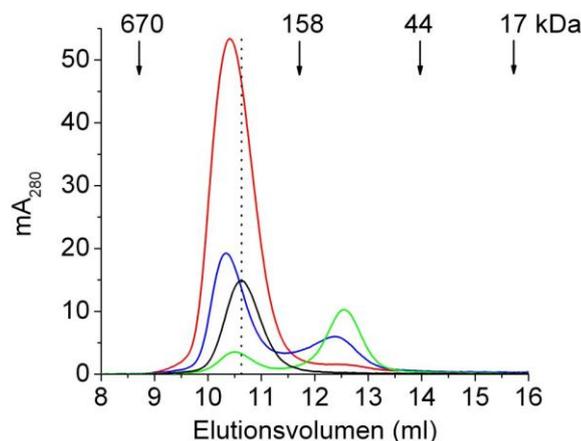


Abbildung 53: Analytische Gelfiltration mit beiden Gyrase-Untereinheiten. Jeweils $10 \mu\text{M}$ GyrB wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von GyrA vermischt (rote Linie: $40 \mu\text{M}$; blau: $10 \mu\text{M}$; grün: $2 \mu\text{M}$) und während dem S200-Lauf die Absorption bei 280 nm verfolgt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die ebenfalls durchgeführten Läufe mit $5 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M}$ GyrA nicht eingezeichnet. Je mehr GyrA vorliegt, desto niedriger ist das GyrB-Signal bei $V_E = 12,6$ ml. Gleichzeitig kann eine Oligomerisierung beobachtet werden, da der Komplex ein geringeres Elutionsvolumen ($10,35$ ml; entsprechend 297 kDa) als reines GyrA aufweist. Zum Vergleich ist der Lauf von $10 \mu\text{M}$ GyrA in Abwesenheit von GyrB zu sehen (schwarze Linie; das Elutionsvolumen $V_E = 10,65$ ml ist mit einer gepunkteten Linie angedeutet). Die Molekulargewichte und die Laufpositionen der Proteine aus dem Standardlauf sind mit Pfeilen eingezeichnet.

Leider ist es mit der analytischen Gelfiltrationstechnik nicht möglich, die Spezies GyrA₂, A₂B und A₂B₂ zu trennen, da die verschiedenen Molekulargewichte nur zu einer geringen Verschiebung von V_E führen und diese Spezies daher überlappend eluieren. Die Ausnahme bildet monomeres GyrB, das deutlich langsamer durch die S200-Säule läuft und von den anderen Formen klar abgetrennt werden kann.

4.3.6.3 Einfluss von Nukleotiden

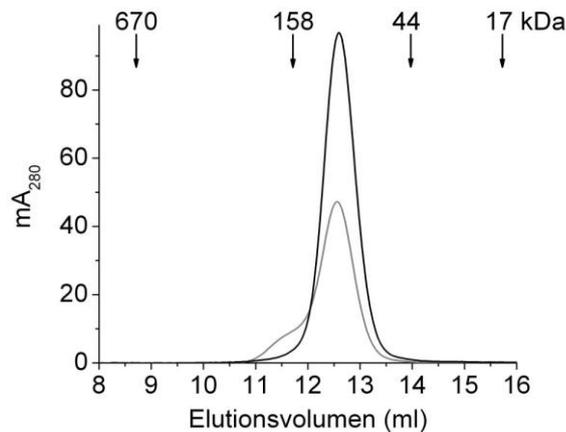


Abbildung 54: Analytische Gelfiltration mit GyrB und Nukleotiden. Jeweils 50 μ M GyrB wurde mit 5 mM ATP (schwarze Linie) bzw. mit 5 mM AMPPNP (graue Linie) vermischt und während dem S200-Lauf die Absorption bei 280 nm verfolgt. Beim ATP-Lauf ergibt sich ein Einzelsignal bei V_E = 12,6 ml, was mit dem Wert für nukleotidfreies GyrB übereinstimmt. Die Verwendung des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons AMPPNP führt zu einer deutlichen Schulter bei ca. 11,5 ml, was einer apparenten Molekularmasse von etwa 162 kDa entspricht und auf eine GyrB-Dimerisierung hindeutet. Die Molekulargewichte und die Laufpositionen der Proteine aus dem Standardlauf sind mit Pfeilen eingezeichnet.

GyrB läuft in freier Form, d. h. in Abwesenheit von GyrA sowie von Substrat, als Monomer mit einem Elutionsmaximum von 12,6 ml durch die S200-Säule. Um den Einfluss von Nukleotiden zu untersuchen, wurde 50 μ M GyrB WT zunächst mit 5 mM ATP vermischt und nach der Auftragung die Absorption bei 280 nm verfolgt. Das Chromatogramm (Abb. 54) zeigt ein Einzelsignal bei V_E = 12,6 ml, d. h. die Anwesenheit von ATP hat keinen Einfluss auf das Laufverhalten der ATPase-Untereinheit. Eine Mischung aus GyrB WT und ADP führt zum gleichen Ergebnis. Setzt man allerdings statt ATP das nicht-spaltbare Analogon AMPPNP ein, so erhält man reproduzierbar ein zweites Signal mit einem geringeren Elutionsvolumen. 50 μ M GyrB WT und 5 mM AMPPNP ergeben bei gemeinsamer Auftragung links vom GyrB-Hauptsignal eine deutliche Schulter bei ca. 11,5 ml, was einem apparenten Molekulargewicht von etwa 162 kDa entspricht. Da sich neben GyrB keine weitere Proteinkomponente im Ansatz befindet, muss es sich um ein GyrB-Dimer (143 kDa) handeln. Die Bindung von AMPPNP an GyrB führt wohl zu einer Konformationsänderung in der ATPase-Untereinheit, die daraufhin affin zu sich selbst wird und dimerisiert. Dieser Zustand scheint halbwegs stabil zu sein, was sich aus der Tatsache erklären lässt, dass AMPPNP nicht-hydrolysierbar ist und das Enzym im gebundenen Zustand arretiert. Es ist anzunehmen,

dass auch die ATP-Bindung zu einer Dimerisierung von GyrB führt, die jedoch wegen der anschließenden Substrathydrolyse zu kurzlebig ist, um mit dem Verfahren der analytischen Gelfiltration detektiert werden zu können.

4.3.7 Analytische Ultrazentrifugation

Verschiedene Mischungen aus den beiden Untereinheiten GyrA und GyrB wurden mit analytischer Ultrazentrifugation untersucht, um das oligomere Verhalten des Proteins aufzuklären. Alle AUZ-Versuche wurden von Ariel Lustig (Universität Basel) durchgeführt und ausgewertet. Im Folgenden wird ein Überblick über die Ergebnisse aus den Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten gegeben. Die Ansätze, bei denen während der Messung eine starke Aggregation auftrat, werden nicht berücksichtigt.

Setzt man GyrA in Abwesenheit von GyrB ein, so findet man in einem breiten Konzentrationsbereich (1,4 – 5,4 μM Monomere) bei 10000 Upm nur eine einzige Komponente mit einem Molekulargewicht im Bereich von 178 – 195 kDa. Dabei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein stabiles Dimer GyrA_2 , das eine theoretische Masse von 184,2 kDa besitzt.

Eine 1:1-Mischung aus GyrA und GyrB liefert dagegen (abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit) unterschiedliche Ergebnisse: Bei 5800 Upm und äquimolaren Konzentrationen von 1,2 – 3,7 μM liegt nur eine Komponente (309 – 323 kDa) vor, die einem Tetramer A_2B_2 mit einem theoretischen Gewicht von 327,2 kDa entspricht. Eine Erhöhung der Drehzahl auf 8000 Upm führt neben dem Tetramerezustand (308 – 319 kDa) zum Erscheinen einer zweiten Spezies bei 240 – 250 kDa, bei der es sich um ein Trimer (theoretisch 255,7 kDa) handeln dürfte. Bei einer weiteren Steigerung der Rotationsgeschwindigkeit auf 11000 Upm wird das Tetramer (316 – 334 kDa), ein Zwischenzustand mit 217 kDa, das GyrA-Dimer (184 – 195 kDa) sowie monomeres GyrB (71 kDa, theoretisch 71,5 kDa) detektiert. Eine weitere 1:1-Messung bei 12000 Upm zeigt bei einer Konzentration von jeweils 6 μM pro Untereinheit Komponenten mit 80 kDa (GyrB), 220 kDa sowie 320 kDa (Tetramer). Bei anderen Konzentrationen (1,8 μM bzw. 12 μM) an GyrA bzw. GyrB wurden Spezies bei 234 – 242 kDa sowie 300 – 340 kDa entdeckt, bei denen es sich wiederum um Trimere bzw. Tetramere handeln dürfte. Da vermutlich vier unterschiedliche Komponenten (GyrB, A_2 , A_2B und A_2B_2) im Ansatz vorliegen, ist die Auswertung einer solchen AUZ-Messung relativ komplex. Die Molekulargewichte der Oligomere (etwa 180, 250 bzw. 320 kDa) sind zu nahe beisammen, um sie klar voneinander zu trennen und als eindeutig definierte Einzelbestandteile einer Mischung auszumachen. Es besteht also die Möglichkeit, dass es sich bei den Objekten mit 217 bzw. 220 kDa um eine Überlagerung aus dem GyrA-Dimer- und dem Trimerzustand handelt. Generell kann jedoch festgestellt werden, dass bei einer niedrigen Drehzahl nur das schwerste Molekül (A_2B_2) erkennbar ist und bei einer Zunahme der Rotationsgeschwindigkeit auch die leichteren Komponenten sichtbar werden.

Ein Überschuss von GyrA gegenüber GyrB sollte theoretisch zu einer Bevorzugung des Trimerzustands führen. Bei einer 3:1-Mischung erkennt man bei 6800 Upm und einem Konzentrationsbereich von 2 – 12,2 μM GyrA (d. h. 0,7 – 4,1 μM GyrB) nur eine Komponente bei 245 – 254 kDa, bei der es sich tatsächlich um A_2B handeln könnte. Ein anderer Ansatz mit einem 4:1-Verhältnis (12 μM GyrA und 3 μM GyrB) liefert wiederum in Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit unterschiedliche Ergebnisse: Bei 4800 Upm ist nur ein Objekt mit 328 kDa (Tetramer) erkennbar, während bei 8000 Upm zwei leichtere Komponenten mit 174 bzw. 235 kDa detektiert wurden. Das GyrA-Dimer und das Trimer erscheinen also, analog zur 1:1-Messung, nur bei der höheren Drehzahl.

4.4 Fluoreszenzmarkierung

4.4.1 Farbstoffspektren

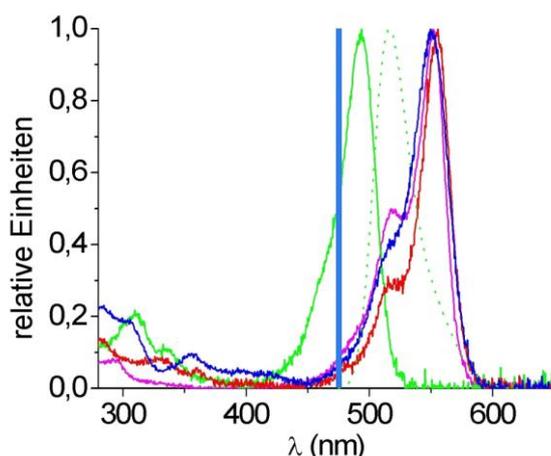


Abbildung 55: Farbstoffspektren. Das Diagramm zeigt die normierten Absorptionsspektren des Donors Alexa488 (grün) sowie der Akzeptoren TMR (rot), Alexa546 (dunkelblau) und Alexa555 (magenta) in H_2O . Außerdem sind das normierte Emissionsspektrum von Alexa488 (grün gepunktet) und die Laseranregungswellenlänge $\lambda = 475 \text{ nm}$ (hellblau) eingezeichnet. Alle Farbstoffe weisen eine Absorption bei 280 nm und bei 494 nm auf, woraus sich bestimmte Korrekturfaktoren für die Analyse von Fluoreszenzmarkierungen ergeben.

Der Donorfarbstoff Alexa488 wird bei der Laserwellenlänge von 475 nm etwa halb so gut angeregt wie beim Absorptionsmaximum (494 nm). Das Emissionsspektrum des Donors (Maximum 516 nm) überlappt sich zu einem bestimmten Anteil mit den Absorptionsspektren der drei Akzeptoren TMR, Alexa546 bzw. Alexa555 (Abb. 55). Je größer dieser Anteil ist, desto höher ist auch der entsprechende Förster-Radius R_0 . Alle drei Akzeptorfarbstoffe werden auch durch den Laser (475 nm) angeregt, wenn auch nur mit einer Intensität von 5 – 10 % im Vergleich zum jeweiligen Absorptionsmaximum. Diese direkte Anregung des Akzeptors spielt bei der Bestimmung von FRET-Korrekturfaktoren eine Rolle. Aus den Spektren können weiterhin die Korrekturfaktoren für die Konzentrationsbestimmung nach den Fluoreszenzmarkierungen

entnommen werden: TMR bzw. Alexa555 weisen bei 494 nm eine Absorption auf, die 19 % bzw. 21 % des Maximums bei 555 nm bzw. 556 nm entspricht. Bei einer statistischen Doppelmarkierung muss dieser Akzeptoranteil von der A_{494} abgezogen werden, um den Alexa488-Anteil und somit die Konzentration des Donors zu berechnen. Alexa488 zeigt keine Absorption bei 555 nm, so dass für die Bestimmung der Akzeptorkonzentration kein Donoranteil herausgerechnet werden muss. Alle Farbstoffe absorbieren außerdem bei 280 nm mit einer Intensität, die zwischen 8 und 23 % des entsprechenden Maximums liegt. Diese Farbstoffanteile an der A_{280} müssen analog berücksichtigt werden, um nach einer Einzelmarkierung oder nach einer statistischen Doppelmarkierung die Konzentration des markierten Proteins zu bestimmen.

4.4.2 Spektrale Verschiebung

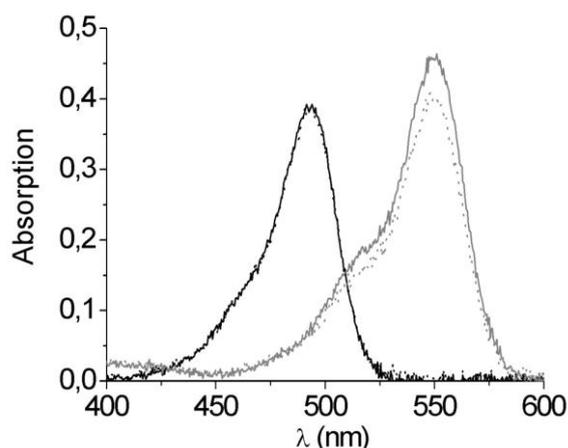


Abbildung 56: Verschiebung der Farbstoffabsorption nach einer Cystein-Kopplung. 5 μM freies Alexa488 (schwarze Kurve) wurde mit 45 μM Cystein vermischt (15 min RT) und die Absorption bestimmt (schwarz gepunktet). Die beiden Messungen vor und nach der Reaktion zeigen, dass sich das Absorptionsspektrum von Alexa488 durch eine Kopplung an die Aminosäure nicht ändert. Dagegen nimmt die Absorption von 5 μM TMR (graue Kurve) nach einer Reaktion mit 45 μM Cystein um ca. 10 % ab (grau gepunktet). Der Verdünnungseffekt bei der Zugabe von Cystein wurde in beiden Fällen berücksichtigt.

Mit den Farbstoffen Alexa488, TMR und Alexa546 wurden verschiedene Kopplungstests durchgeführt, um herauszufinden, inwieweit die spektralen Eigenschaften von der molekularen Umgebung der Fluorophore abhängen. 5 μM freies Alexa488 zeigt beispielsweise vor und nach einer Reaktion mit einem Überschuss an Cystein (45 μM L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat; Inkubation 15 min bei RT) ein identisches Absorptionsverhalten. Dagegen nimmt die Absorption von TMR um ca. 10 % ab, nachdem es an die freie Aminosäure bindet (Abb. 56). Ein gleichartiger Rückgang der Amplitude nach einer Cystein-Kopplung kann beim Akzeptormolekül Alexa546 beobachtet werden. Ähnliche Tests wurden auch unter Verwendung der Mutante GyrA oC N399C, die zuvor durch eine NAP-5-Chromatographie von β -Mercaptoethanol getrennt wurde, durchgeführt. Eine Zugabe von 45,1 μM des Proteins zu 5 μM freiem

Alexa488 ändert (verdünnungskorrigiert) nach einer Reaktion (20 min RT) nichts an der Absorption des Donors, was mit dem entsprechenden Cystein-Alexa488-Test in Einklang zu bringen ist. Dagegen nimmt die TMR-Absorption um ca. 5 % zu, nachdem der Farbstoff mit GyrA oC N399C vermischt wurde. Die Absorption von TMR sinkt also bei einer Kopplung an freies Cystein, während sie bei einer Reaktion mit der GyrA-Mutante steigt. Schließlich wurden Spaltungstests mit GyrA oC N399C, das mit Alexa488 bzw. mit TMR einzelmarkiert war, durchgeführt. Nach einer Zugabe von 0,22 mg/ml Proteinase K (30 min 37°C) sollte theoretisch Cystein-Farbstoff vorliegen (siehe auch Abb. 57). Sowohl bei Alexa488 als auch bei TMR ergab sich nach der Spaltung ein Absorptionsrückgang um ca. 10 %.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die molekulare Umgebung der Farbstoffe einen Einfluss auf deren Absorptionsverhalten ausübt, der sich im Bereich von 5 – 10 % der Amplitude bewegen kann. Je nach Kopplungspartner (freies Cystein oder Protein-SH-Gruppe) zeigen die verschiedenen Farbstoffe entweder einen leichten Rückgang bzw. Anstieg oder gar keine Änderung der Absorptionsintensität. Die Extinktionskoeffizienten für die freien Farbstoffe, die in allen Konzentrationsmessungen verwendet werden, stellen also nur Näherungswerte dar, sobald die Fluorophore an Gyrase gekoppelt werden. Daraus folgt, dass die Bestimmung der Farbstoffkonzentration nach Einzel- oder Doppelmarkierungen keine exakten Werte liefert, sondern mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Die Abweichung der gemessenen von der tatsächlichen Konzentration der Fluorophore dürfte je nach der markierten Gyrasemutante im Bereich von wenigen Prozent liegen.

4.4.3 Einzelmarkierung

Mit allen Gyrasemutanten, die für eine Markierung mit Fluorophoren ausgewählt wurden (4.1.6), wurden Farbstoffzugänglichkeitstests durchgeführt. Die Proteinansätze wurden zunächst durch eine NAP-5-Chromatographie von β -Mercaptoethanol befreit und danach mit einem fünffachen Überschuss an Farbstoff bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen 1 min und ∞) wurden Aliquots entnommen, die Reaktion durch Zugabe von β -Mercaptoethanol gestoppt und die Ansätze mit 10%iger SDS-PAGE (Fluoreszenz- und Coomassiefärbung) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sämtliche verwendeten cysteinhaltigen GyrA-Mutanten für alle eingesetzten Farbstoffe sehr leicht zugänglich waren, d. h. die Markierungen waren bereits nach einer Minute bei RT praktisch abgeschlossen. Die cysteinfreie Mutante GyrA C350L (GyrA oC) kann erwartungsgemäß nicht markiert werden. Dagegen benötigen die Farbstoffe Alexa488, Alexa546 und TMR mindestens einige Stunden, um an die Mutante GyrB C414S zu binden, da sich deren einziges Cystein (C58) in einer molekularen Tasche befindet und daher schwerer erreichbar ist (Abb. 57). Deshalb wurden im Folgenden alle GyrA-Markierungen 20 (oder maximal 60) min bei RT durchgeführt. GyrB C414S wurde ∞ bei 4°C behandelt, wobei die niedrige Temperatur gewählt wurde, um die Aktivität des Proteins beizubehalten. Die Kopplung dieser Mutante

mit dem Akzeptor TMR führt allerdings dazu, dass pUC18 in einem anschließenden Aktivitäts-Schnelltest nur schwach relaxiert und überhaupt nicht ATP-abhängig superspiralisiert wird. GyrB C414S, das mit dem Donorfarbstoff Alexa488 bzw. mit dem Akzeptor Alexa546 einzelmarkiert ist, weist dagegen eine WT-artige DNA-Topoisomerisierungsaktivität auf. Tab. 4 gibt einen Überblick über alle durchgeführten Einzelmarkierungen.

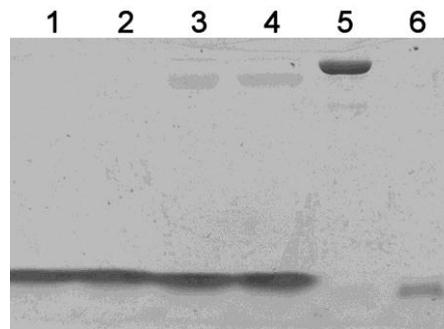


Abbildung 57: Verschiedene Einzelmarkierungsexperimente. GyrB C414S wurde bei 4°C mit dem Farbstoff Alexa488 markiert und die Reaktion nach bestimmten Zeitpunkten (Spur 1: 30 min; 2: 2 h; 3: 4 h; 4: ÜN) durch Zugabe von β -Mercaptoethanol gestoppt. Nach mehreren Stunden ist in der oberen Bildhälfte markiertes Protein erkennbar (die starken Banden in der unteren Hälfte sind freier Farbstoff). Spur 5 zeigt eine Einzelmarkierung von GyrA oC N399C mit Alexa488 (20 min RT) mit anschließender Beseitigung des restlichen freien Farbstoffs durch eine NAP-5-Säulenchromatographie. Die Mutante ist hervorragend zugänglich und die Reinigung des markierten Proteins von freien Fluorophoren ist 100%ig. Nach der Zugabe von 0,22 mg/ml Proteinase K (30 min 37°C) wird GyrA oC N399C vollständig gespalten, so dass Cystein-Alexa488 entsteht (Spur 6).

| Mutante | Farbstoff | Reaktionsbedingungen | Markierungseffizienz |
|---------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| GyrA oC | Alexa488/TMR | 30 min RT | keine Markierung |
| GyrA oC S117C | Alexa488/TMR | 20 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC T140C | Alexa488/TMR | 20 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC G152C | Alexa488/TMR | 20 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC S153C | Alexa488/TMR | 20 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC N399C | Alexa488/TMR | 20 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC T408C | Alexa488/TMR | 20 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC Q445C | Alexa488/TMR | 20 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC K594C | Alexa488/TMR/Alexa555 | 60 min RT | ca. 80 % |
| GyrA oC E726C | Alexa488/TMR/Alexa555 | 60 min RT | ca. 80 % |
| GyrB C58L | Alexa488 (für trFRET) | 60 min RT | ca. 80 % |
| GyrB C414S | Alexa488/TMR/Alexa546 | ÜN 4°C | ca. 55 % |

Tabelle 4: Übersicht über alle durchgeführten Einzelmarkierungen (jeweils fünffacher Farbstoffüberschuss gegenüber Protein). Die dritte Tabellenspalte gibt an, bei welchen Bedingungen die entsprechende Markierungseffizienz (Spalte 4) erreicht wird.

Nach der Markierung wurde der freie Farbstoff durch eine modifizierte Reinigungsmethode vollständig entfernt (Abb. 57). Das Protein wird dazu (ohne β -Mercaptoethanolbehandlung) auf eine mit Markierungspuffer äquilibrierte NAP-5-Säule aufgetragen und mit lediglich 300 μ l desselben Puffers eluiert. Bei einer Elution nach Angabe des Herstellers (1000 μ l Markierungspuffer) wäre es dagegen nicht möglich, das markierte Protein von freiem Farbstoff zu trennen.

4.4.4 Statistische Doppelmarkierung

Ausgewählte GyrA-Mutanten wurden mit dem Donor Alexa488 sowie mit dem Akzeptor TMR bzw. Alexa555 statistisch doppelmarkiert. Das Protein wurde dafür zu einer vorbereiteten Mischung aus beiden Fluorophoren zugegeben, die so eingestellt war, dass sich nach der Markierung und der anschließenden Beseitigung von freiem Farbstoff ein etwa zwei- bis dreifacher Überschuss von Akzeptor gegenüber dem Donor am Protein ergab. Je nach der Position der Cysteine sowie der Art der Farbstoffe musste diese Mischung ein unterschiedliches Donor-Akzeptor-Verhältnis aufweisen, um nach der Reaktion den gewünschten Akzeptorüberschuss zu erhalten. Die gesamte Farbstoffmenge war in allen Ansätzen fünfmal so hoch wie die Menge an Protein. Aus dem Absorptionsspektrum (Abb. 58) konnten anschließend die Konzentrationen von GyrA, Alexa488 und TMR/Alexa555 und damit die Qualität der Markierung bestimmt werden. Das gewünschte Kopplungsverhältnis wurde in allen Fällen recht gut erreicht, wobei Mischungsverhältnisse (Donor: Akzeptor) zwischen 5:1 und 1:10 für die Reaktion eingesetzt wurden. Die Markierungseffizienz lag jeweils bei 70 – 85 %; lediglich die Mutante GyrA oC S117C macht eine Ausnahme (35 %). Tab. 5 gibt einen Überblick über alle durchgeführten statistischen Doppelmarkierungen.

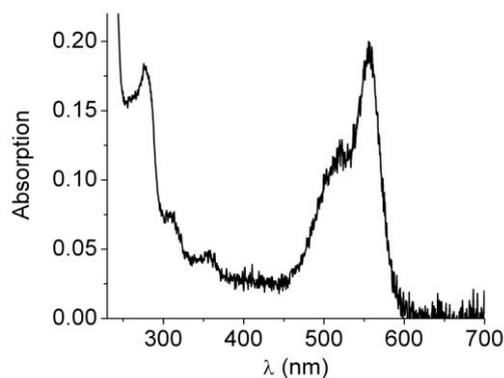


Abbildung 58: Typisches Ergebnis einer statistischen Doppelmarkierung. GyrA oC K594C wurde 1 h bei RT mit einer 1:1-Mischung aus Alexa488 und TMR (fünffacher Farbstoffüberschuss gegenüber dem Protein) inkubiert und anschließend der restliche freie Farbstoff vollständig durch eine NAP-5-Säulenchromatographie entfernt. Aus dem Absorptionsspektrum können die Konzentrationen von GyrA, Alexa488 und TMR und damit die Qualität der Markierung bestimmt werden (im vorliegenden Fall: Markierungseffizienz 82 %, Donor-Akzeptor-Verhältnis 1:2,5)

| Mutante GyrA oC | Donor | Akzeptor | Mischungs- verhältnis | Reaktions- bedingungen | Markierungs- effizienz | Kopplungs- verhältnis |
|--------------------|----------|----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| S117C | Alexa488 | TMR | 1:2,5 | 1 h RT | 35 % | 1:2,4 |
| T140C | Alexa488 | TMR | 1:2,5 | 1 h RT | 85 % | 1:2,0 |
| G152C | Alexa488 | TMR | 1:2,5 | 1 h RT | 77 % | 1:2,5 |
| S153C | Alexa488 | TMR | 1:3 | 1 h RT | 80 % | 1:1,7 |
| N399C | Alexa488 | TMR | 5:1 | 20 min RT | 79 % | 1:2,3 |
| T408C | Alexa488 | TMR | 1:2 | 20 min RT | 77 % | 1:2,6 |
| Q445C | Alexa488 | TMR | 2:1 | 20 min RT | 76 % | 1:2,5 |
| K594C | Alexa488 | TMR | 1:1 | 1 h RT | 82 % | 1:2,5 |
| K594C | Alexa488 | Alexa555 | 1:10 | 1 h RT | 75 % | 1:2,4 |
| E726C | Alexa488 | TMR | 1:3 | 1 h RT | 73 % | 1:2,3 |
| E726C | Alexa488 | Alexa555 | 1:10 | 1 h RT | 70 % | 1:3,1 |

Tabelle 5: Übersicht über alle statistischen Doppelmarkierungen. Spalte 4 gibt das optimale Mischungsverhältnis (Donor:Akzeptor) an, das bei den angegebenen Reaktionsbedingungen zum entsprechenden Markierungsergebnis (Spalten 6 und 7) führt. Die letzte Spalte bezeichnet das Mengenverhältnis Donor:Akzeptor in gekoppelter Form am Protein.

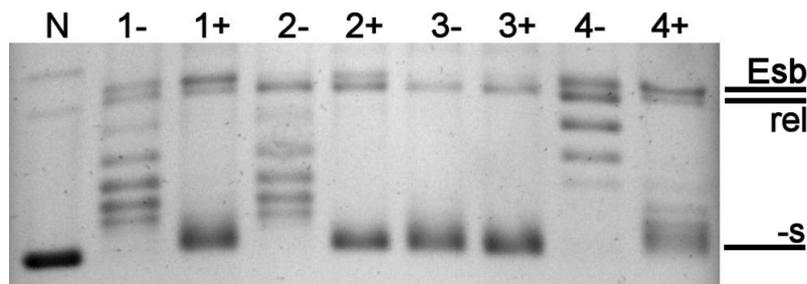


Abbildung 59: Aktivität von markierten Gyrasemutanten. Die mit Alexa488 und TMR doppelmarkierten Mutanten GyrA oC S117C (Spur 1), GyrA oC T140C (2), GyrA oC G152C (3) und GyrA oC S153C (4) wurden zusammen mit GyrB WT in den Aktivitäts-Schnelltest eingesetzt. Die Spur N enthält natives superspiralisiertes pUC18. Die Mutante GyrA oC G152C ist im markierten Zustand vollständig inaktiv, während alle anderen Ansätze eine normale ATP-unabhängige Plasmidrelaxation (2 h 37°C; Spuren mit Minuszeichen) bzw. ATP-abhängige Superspiralisierung (10 min 37°C; Spuren mit Pluszeichen) zeigen. Abkürzungen: -s = negativ superspiralisiertes pUC18, rel = relaxiertes pUC18, Esb = pUC18 mit Einzelstrangbruch.

Mit allen Protein-Donor-Akzeptor-Ansätzen wurden anschließend Aktivitäts-Schnelltests durchgeführt, um herauszufinden, ob das Enzym durch die gekoppelten Farbstoffe in seiner Aktivität beeinträchtigt wird oder nicht. Dabei stellte sich heraus, dass die Mutante GyrA oC G152C, die in Abwesenheit von Farbstoffen eine WT-artige Aktivität zeigt, im doppelmarkierten Zustand völlig inaktiv ist, so dass sie für FRET-Experimente nicht weiter berücksichtigt wurde (Abb. 59). Alle anderen Mutanten sind auch nach einer Kopplung mit Donor und Akzeptor in der Lage, Plasmid-DNA WT-artig (siehe auch Ansatz 1 in Abb. 22) zu relaxieren bzw. zu superspiralisieren.

4.5 Bestimmung des Förster-Abstands

4.5.1 Donor-Quantenausbeute

Die Quantenausbeute von freiem Alexa488 (Φ_D) beträgt unter den gegebenen Voraussetzungen (pH = 7,5) 0,51, d. h. jeder zweite Anregungsvorgang führt zur Emission eines Photons. Koppelt man den Donorfarbstoff kovalent an ein Cystein in GyrA, so erhält man Werte, die je nach der Position unterschiedlich stark abweichen. Während Φ_D auf 0,33 abnimmt, wenn das Fluorophor an die Mutanten GyrA oC T140C bzw. S153C bindet, ergibt sich in anderen Fällen eine Zunahme auf maximal 0,66 (GyrA oC E726C). Die Quantenausbeute hängt also zu einem bestimmten Grad von der molekularen Umgebung des Donors ab, was wiederum den Förster-Abstand in Anwesenheit eines Akzeptors beeinflusst. Dieser Effekt ist wegen der sechsten Potenz, die in der R_0 -Formel vorkommt, allerdings recht gering: Eine Erhöhung von Φ_D um 20 % führt beispielsweise nur zu einer R_0 -Verschiebung von etwa 0,2 nm. Alle gemessenen Φ_D -Werte sind in Tab. 6 in 4.5.3 eingetragen.

4.5.2 Überlappungsintegral

Betrachtet man eine Mischung aus den freien Farbstoffen Alexa488 und TMR, so ergibt sich für das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ ein Wert von $2,89 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Verwendet man als Akzeptor dagegen Alexa546 bzw. Alexa555, so nimmt $J(\lambda)$ die Werte 3,88 bzw. $6,86 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ an. Wie bei der Donor-Quantenausbeute gilt aber auch hier, dass die molekulare Umgebung der Fluorophore einen Einfluss auf deren Absorptions- bzw. Emissionsspektren hat. Bei einer Kopplung von Alexa488 bzw. TMR an GyrA ergeben sich daher für das Überlappungsintegral etwas unterschiedliche Werte. Je nach Position der zwei gleichartigen Cysteine im GyrA₂-Dimer, die mit den Fluorophoren reagieren, erhöht sich $J(\lambda)$ in den meisten Fällen um etwa ein Drittel (Tab. 6 in 4.5.3). Die Zunahme des Integrals nach einer Kopplung an GyrA hat unmittelbar mit der Erhöhung der Intensität der Akzeptorabsorption zu tun, die in 4.4.2 festgestellt wurde. Der Einfluss von $J(\lambda)$ auf den Förster-Abstand ist – ebenso wie im Fall der Donor-Quantenausbeute – allerdings relativ begrenzt: Eine Änderung des Überlappungsintegrals um 20 % führt lediglich zu einer geringen R_0 -Verschiebung von weniger als 0,2 nm.

4.5.3 Förster-Abstand

Verwendet man einen Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$ sowie den Brechungsindex für wässrige Lösungen ($n = 1,33$), so ergibt sich für das freie Farbstoffpaar Alexa488/TMR ein Förster-Abstand $R_0 = 5,5$ nm. Dieser Wert weicht nur um 0,1 nm vom Literaturwert (5,4 nm) ab. Koppelt man die beiden Farbstoffe an GyrA, so erhöht sich wegen der Zunahme des Überlappungsintegrals bzw. der Donor-Quantenausbeute auch R_0 .

In einigen Fällen (z. B. GyrA oC Q445C) liegt der R_0 -Wert sogar oberhalb von 6,0 nm (Tab. 6). Der Förster-Abstand kann also je nach der molekularen Umgebung der gekoppelten Fluorophore, d. h. je nach der Position des reaktiven Cysteins in GyrA, um bis zu 10 % vom Standardwert variieren. Für die in freier Form vorliegenden Donor-Akzeptor-Paare Alexa488/Alexa546 bzw. Alexa488/Alexa555 ergeben sich R_0 -Werte von ca. 5,8 bzw. 6,4 nm, die jeweils um 0,6 nm unter den entsprechenden Literaturwerten (6,4 nm bzw. 7,0 nm) liegen.

| Position | Farbstoffpaar | Φ_D | $J(\lambda)$ [$\text{nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] | R_0 [nm] |
|------------------|-------------------|----------|---|------------|
| freie Farbstoffe | Alexa488/TMR | 0,51 | $2,89 \cdot 10^{15}$ | 5,5 |
| freie Farbstoffe | Alexa488/Alexa546 | 0,51 | $3,88 \cdot 10^{15}$ | 5,8 |
| freie Farbstoffe | Alexa488/Alexa555 | 0,51 | $6,86 \cdot 10^{15}$ | 6,4 |
| GyrA oC S117C | Alexa488/TMR | 0,44 | $2,86 \cdot 10^{15}$ | 5,4 |
| GyrA oC T140C | Alexa488/TMR | 0,33 | $3,66 \cdot 10^{15}$ | 5,3 |
| GyrA oC S153C | Alexa488/TMR | 0,33 | $7,14 \cdot 10^{15}$ | 5,9 |
| GyrA oC N399C | Alexa488/TMR | 0,48 | $3,63 \cdot 10^{15}$ | 5,7 |
| GyrA oC T408C | Alexa488/TMR | 0,59 | $4,52 \cdot 10^{15}$ | 6,1 |
| GyrA oC Q445C | Alexa488/TMR | 0,64 | $4,42 \cdot 10^{15}$ | 6,1 |
| GyrA oC K594C | Alexa488/TMR | 0,62 | $3,65 \cdot 10^{15}$ | 5,9 |
| GyrA oC K594C | Alexa488/Alexa555 | 0,62 | $6,11 \cdot 10^{15}$ | 6,4 |
| GyrA oC E726C | Alexa488/TMR | 0,66 | $3,58 \cdot 10^{15}$ | 6,0 |
| GyrA oC E726C | Alexa488/Alexa555 | 0,66 | $6,00 \cdot 10^{15}$ | 6,5 |

Tabelle 6: Abhängigkeit des Förster-Abstands R_0 von der Position der Farbstoffe im Protein. R_0 kann aus der Quantenausbeute des Donors Φ_D , dem Überlappungsintegral $J(\lambda)$, dem Brechungsindex für Wasser ($n = 1,33$) sowie dem Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$ berechnet werden. Einige der Φ_D - und $J(\lambda)$ -Werte wurden von Airat Gubaev (Universität Basel) gemessen.

Die angegebenen Förster-Abstände stellen keine exakten Ergebnisse dar, sondern können aufgrund von verschiedenen Unsicherheiten leicht von den tatsächlichen Werten abweichen. So wird beispielsweise κ^2 willkürlich auf den Wert $2/3$ gesetzt⁵⁹, was dem Orientierungsfaktor des freien (beliebig rotierbaren) Farbstoffs entspricht. Da alle Alexa-Farbstoffe über einen C_6 -Linker verfügen, kann in der Regel davon ausgegangen werden, dass die gekoppelten Fluorophore eine ähnliche Beweglichkeit aufweisen. Die Möglichkeit, dass die Farbstoffrotation in bestimmte Richtungen wegen der Anwesenheit von Sekundärstrukturen bzw. Seitenketten des Proteins stark behindert sein könnte, ist jedoch nicht auszuschließen. Bei einer extremen Mobilitätseinschränkung der Fluorophore durch die Enzymstruktur könnte κ^2 theoretisch Werte zwischen 0 und 4 einnehmen, woraus sich ein Förster-Abstand zwischen 0 und 7,3 nm ergeben würde. Aufgrund der Tatsache, dass alle Kopplungsstellen, die in GyrA eingefügt wurden, an der Peripherie des Enzyms liegen und gut zugänglich sind, dürfte der Standardwert $\kappa^2 = 2/3$

die Realität jedoch sehr gut beschreiben. Der Fehler in der R_0 -Bestimmung, der durch den schlecht bestimmbar orientierungsfaktor verursacht wird, sollte also sehr gering sein. Der eingesetzte Brechungsindex für Wasser ($n = 1,33$) ist ebenfalls ein Näherungswert, da der Energietransfer zwischen dem Donor-Akzeptor-Paar (abhängig von der Position) ganz oder teilweise durch das Protein hindurch erfolgt. Eine daraus folgende empirische Erhöhung von n auf $1,4 - 1,5$, wie sie teilweise in der Literatur vorgeschlagen wird⁷⁸, würde zu einer Abnahme des ermittelten Förster-Abstands um bis zu $0,5$ nm führen. Es ist allerdings auch vertretbar, bei neuen Mutanten statt einer individuellen R_0 -Messung den Literaturwert zu verwenden. Bei der smFRET-Auswertung sollten die erwähnten Unsicherheiten in der Förster-Radius-Bestimmung berücksichtigt, aber nicht überbewertet werden.

4.6 Ensemble-FRET

4.6.1 ssFRET mit markierter DNA

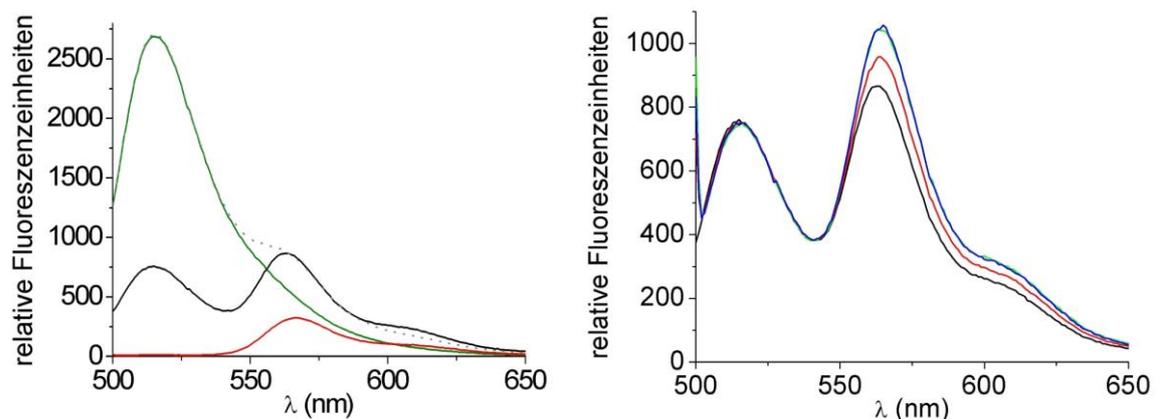


Abbildung 60: Steady-state-FRET-Messungen mit markierter DNA. Das linke Bild zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{ex} = 494$ nm) bei 25°C von jeweils 100 nM Einzelstrang-DNA (60 bp), die mit Alexa488 (grüne Kurve) bzw. mit Alexa555 (rot) markiert ist. Eine Mischung aus beiden Einzelsträngen führt zur Bildung von doppelmarkierter dsDNA (schwarz). Es ist klar zu erkennen, dass die schwarze Kurve nicht der Addition (grau gepunktet) der grünen und der roten Kurve entspricht. Aufgrund eines stattfindenden Förster-Transfers nimmt der Donoranteil vielmehr deutlich ab, während die Akzeptorfluoreszenz erhöht ist. Im rechten Bild sind alle Spektren zur besseren Veranschaulichung auf $\lambda = 516$ nm normiert. Die Fluoreszenz von 100 nM doppelmarkierter dsDNA (schwarze Kurve) verschiebt sich zu Gunsten des Akzeptors, wenn zunächst 5 μM GyrA (rot) und danach 5 μM GyrB (grün) dazugegeben wird (der Verdünnungseffekt wurde berücksichtigt). Die FRET-Effizienz nimmt also durch die Interaktion zwischen dem Enzym und dem Substrat zu. Bei einer Zugabe von 2 mM ATP (blau) findet dagegen keine Änderung mehr statt.

Steady-state-FRET-Messungen wurden bei 25°C mit einem 60-bp-dsDNA-Substrat durchgeführt, das mit dem Donor Alexa488 und dem Akzeptor Alexa555 doppelmarkiert war. Die beiden einzelmarkierten ssDNA-Fragmente wurden zuvor durch eine Thermobehandlung zu einem Doppelstrang vereinigt. Bei der Messung eines Fluoreszenzemissionsspektrums von 100 nM ssDNA-Alexa488 ($\lambda_{ex} = 494$ nm) erhält

man eine Kurve mit einem Maximum bei 516 nm, während der ebenfalls (schwach) angeregte Akzeptoreinzelstrang bei 572 nm emittiert. Nach einer Hybridisierung der beiden Stränge weist das dsDNA-Produkt ein Emissionsspektrum auf, das nicht der Addition der beiden Einzelspektren entspricht (Abb. 60 links). Stattdessen ist das Fluoreszenzverhältnis der beiden Farbstoffe stark zum Akzeptor verschoben, da nun zwischen den beiden Fluorophoren FRET stattfindet. Eine Auswertung der ssDNA-Alexa488- sowie der dsDNA-Kurve liefert eine FRET-Effizienz $E_{\text{FRET}} = 0,72$ für den Doppelstrang, was bei $R_0 = 7,0$ nm einer Farbstoffdistanz von 6,0 nm entspricht. Bei einer Zugabe von Gyrase zur doppelmarkierten DNA ergibt sich eine schwache Zunahme der Transfereffizienz (Abb. 60 rechts): 5 μM GyrA WT verschiebt E_{FRET} auf 0,73 (entspricht 5,9 nm) und eine darauf folgende Zugabe von 5 μM GyrB führt zu einem Anstieg auf 0,75 (5,8 nm). Bei dieser quantitativen Auswertung wurden wiederum die verdünnungskorrigierten Emissionsspektren mit dem Spektrum von ssDNA-Alexa488 verglichen. Eine anschließende Zugabe von Nukleotid hat auf die FRET-Effizienz keinen Einfluss: Sowohl bei einer Verwendung von 2 mM ATP als auch bei 2 mM AMPPNP bleibt E_{FRET} unverändert bei einem Wert von 0,75. Es sieht also danach aus, als ob durch die Interaktion zwischen der markierten DNA und dem Protein das Substrat sterisch leicht modifiziert wird. Möglicherweise führt die Bindung an das aktive Zentrum der Gyrase zu einer Verbiegung des Substrats, wodurch sich der Abstand der beiden Farbstoffe verringert und somit die FRET-Effizienz erhöht. Eine andere Erklärung für die Zunahme des Förster-Transfers wäre eine entsprechende Beeinflussung der Quantenausbeuten der beiden Farbstoffe durch die molekulare Umgebung im Protein-DNA-Komplex. Die Anwesenheit von Nukleotiden hat dagegen keinen Einfluss auf den Abstand zwischen dem Donor und dem Akzeptor bzw. auf die auftretende FRET-Effizienz. Eine theoretisch denkbare reversible Spaltung der dsDNA durch die Gyrase (analog zur G-DNA-Öffnung im Nukleotidzyklus des Enzyms), die zu einem deutlichen Anstieg der Farbstoffdistanz und damit zu einer messbaren FRET-Abnahme führen würde, konnte nicht festgestellt werden. Allerdings war dies auch nicht zu erwarten, da die beiden Fluorophore nicht links und rechts von der spezifischen Gyrase-Schnittstelle, sondern im Abstand von acht Basenpaaren auf der gleichen Seite der Konsensussequenz platziert sind.

4.6.2 Zeitaufgelöste Messungen

4.6.2.1 IRF

Die Instrumentenfunktion, die für die Auswertung von Lebensdauer- und Anisotropiemessungen benötigt wird, ist in Abb. 61 zu sehen. Die Länge der Messung (25 ns) ist dabei in 4096 Schritte unterteilt. Nachdem ein Laserpuls auf die Wassermoleküle in der Küvette trifft, wird das elastisch gestreute Anregungslicht frühestens mit einer Verzögerungszeit von ca. 430 Zeitschritten (2,6 ns) vom Detektor erfasst. Etwa 1100 Schritte (6,7 ns) nach dem Puls ist die Elektronenkaskade im Photomultiplier

vollständig abgeflaut, d. h. der genaue Zeitpunkt der Photonendetektion bewegt sich in einem Intervall von ca. 4 ns.

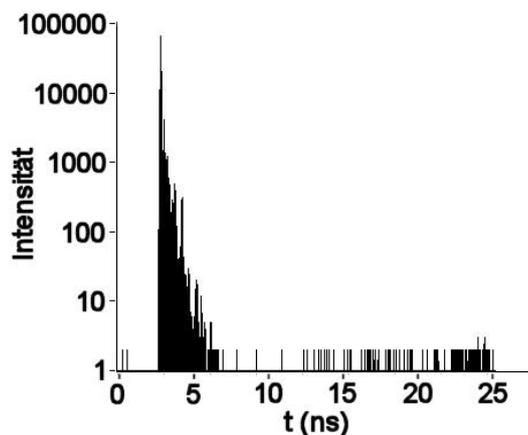


Abbildung 61: Instrumentenfunktion. Die IRF wurde 5 min unter Verwendung von reinem H_2O bei paralleler Analysatorposition (0°) bestimmt. Die Intensität ist logarithmisch gegen die Zeitschritte der Messung aufgetragen (4096 Schritte entsprechen 25 ns).

4.6.2.2 Donor-Lebensdauer

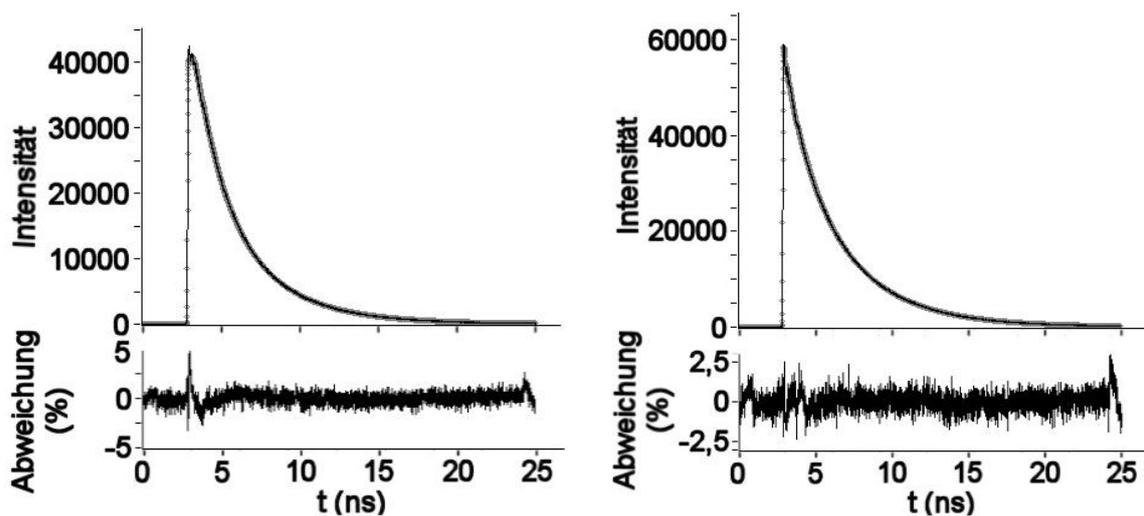


Abbildung 62: Donor-Lebensdauer. Die Fluoreszenzzerfallskurve von Alexa488 in freier Form (linkes Bild; schwarze Kurve) lässt sich mit einer doppelten Exponentialfunktion fitten. Aus der Anpassung (graue Punkte) ergibt sich für den freien Donorfarbstoff eine mittlere Lebensdauer $\tau = 3,9$ ns (zweiter Exponent: 1,6 ns). Nach einer Kopplung an die Mutante GyrB C414S bleibt der τ -Wert praktisch unverändert (4,0 ns; weitere τ -Werte: 1,7 ns und 0,3 ns); allerdings sind in diesem Fall drei Exponenten notwendig, um die Zerfallskurve gut zu beschreiben (rechtes Bild). Die Messdauer (25 ns) nach jedem Anregungspuls wurde in 4096 Zeitschritte unterteilt.

Die Fluoreszenzlebenszeit von Alexa488 wurde sowohl in freier als auch in gekoppelter Form bestimmt. Freier Donorfarbstoff, der mit einem kurzen 475-nm-Laserpuls angeregt wird, fällt nach einer mittleren

Lebensdauer von $\tau = 3,9$ ns wieder in den Grundzustand zurück (Abb. 62 links). Die Zerfallskurve lässt sich mit einer doppelten Exponentialfunktion zufriedenstellend analysieren, wobei die zweite Phase eine niedrigere Zeitkonstante im Bereich von 1,6 ns besitzt. Verwendet man drei Exponenten, so wird die Anpassung nur unwesentlich besser. Eine einfache Funktion liefert dagegen keine brauchbare Beschreibung der Messkurve, d. h. Alexa488 geht möglicherweise in einem zweistufigen Prozess vom angeregten in den Grundzustand über. Die Lebensdauer von Alexa488 ändert sich praktisch nicht, wenn der Farbstoff an verschiedene Cysteine der Gyrase gekoppelt wird. Die Zeitkonstante bewegt sich bei fünf Messungen an unterschiedlichen Positionen im Protein relativ konstant im Bereich von 3,9 – 4,1 ns (Tab. 7), d. h. die Umgebung des Farbstoffs (Seitenketten des Proteins) übt keinen Einfluss auf die Lebensdauer aus. Bei den drei untersuchten GyrA-Mutanten reicht eine doppelte Exponentialfunktion mit einer zweiten Phase bei 0,7 – 1,7 ns aus, um die Kurven gut zu beschreiben, während im Fall der GyrB-Ansätze drei Exponenten erforderlich sind. Die Phase mit der niedrigsten Zeitkonstante (0,2 – 0,3 ns) kann bei GyrB C58L-Alexa488 sowie bei GyrB C414S-Alexa488 nicht mehr vernachlässigt werden (Abb. 62 rechts). Insgesamt lässt sich feststellen, dass die mittlere Lebensdauer des Donors, die auch zur qualitativen Auswertung von smFRET-Ergebnissen benötigt wird, in allen Messungen praktisch konstant ist und daher nicht für jede Gyrasemutante einzeln bestimmt werden muss.

| Probe | Funktion | Lebensdauer τ | 2. Exponent | 3. Exponent |
|------------------------|----------|--------------------|---------------|---------------|
| freies Alexa488 | doppelt | 3,9 ns (50 %) | 1,6 ns (50 %) | – |
| GyrA oC N399C-Alexa488 | doppelt | 3,9 ns (71 %) | 0,7 ns (29 %) | – |
| GyrA oC T408C-Alexa488 | doppelt | 4,1 ns (95 %) | 1,4 ns (5 %) | – |
| GyrA oC Q445C-Alexa488 | doppelt | 4,1 ns (90 %) | 1,2 ns (10 %) | – |
| GyrB C58L-Alexa488 | dreifach | 4,0 ns (65 %) | 1,6 ns (18 %) | 0,2 ns (16 %) |
| GyrB C414S-Alexa488 | dreifach | 4,0 ns (50 %) | 1,7 ns (22 %) | 0,3 ns (28 %) |

Tabelle 7: Bestimmung der Donor-Lebenszeit. Angegeben ist jeweils diejenige Exponentialfunktion (doppelt bzw. dreifach), die mit einer möglichst geringen Exponentenanzahl eine gute Anpassung der Fluoreszenzzerfallskurve ermöglicht. Die Amplituden der einzelnen Exponenten sind in Klammern angefügt. In allen Messungen bewegt sich die gesuchte Lebensdauer des Donors (τ) stabil bei 3,9 – 4,1 ns.

4.6.2.3 Rotationskorrelationszeit

Freies Alexa488 zeigt nach einer Anregung mit einem kurzen 475-nm-Laserpuls eine Anisotropie r im Bereich von 0,3, die mit einer Zeitkonstante $\tau_c = 0,18$ ns zerfällt (Abb. 63 links). Der freie Farbstoff rotiert so schnell um sich selbst, dass bereits etwa 1 ns nach dem Beginn der Aufzeichnung die Anisotropie auf den Nullwert gefallen ist. Eine einfache Exponentialfunktion ist zur Beschreibung der Messkurve ausreichend, da der Farbstoff nicht durch äußere Einflüsse an seiner freien Eigenrotation

gehindert wird. Koppelt man Alexa488 an verschiedene Positionen in der Gyrase, so verschiebt sich die Rotationskorrelationszeit τ_c in den Bereich zwischen 0,22 und 0,37 ns (Tab. 8). Da diese Werte jedoch in der gleichen Größenordnung liegen wie der τ_c -Wert von freiem Farbstoff, kann davon ausgegangen werden, dass das gebundene Fluorophor (wohl aufgrund seines C₆-Linkers) in der Lage ist, an seiner jeweiligen Cystein-Kopplungsstelle frei zu rotieren. Dies ist ein wichtiger Hinweis für die Qualität von späteren smFRET-Messungen mit Gyrase, die an den untersuchten Cysteinen mit Donor- und mit Akzeptorfarbstoff markiert ist: Die Rotation des gebundenen Alexa488 an der Kopplungsstelle entspricht annähernd derjenigen des freien Fluorophors, d. h. der Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$, der für die Bestimmung des Förster-Abstands und somit für die smFRET-Auswertung wichtig ist, gilt auch in Messungen mit doppelmarkiertem Protein.

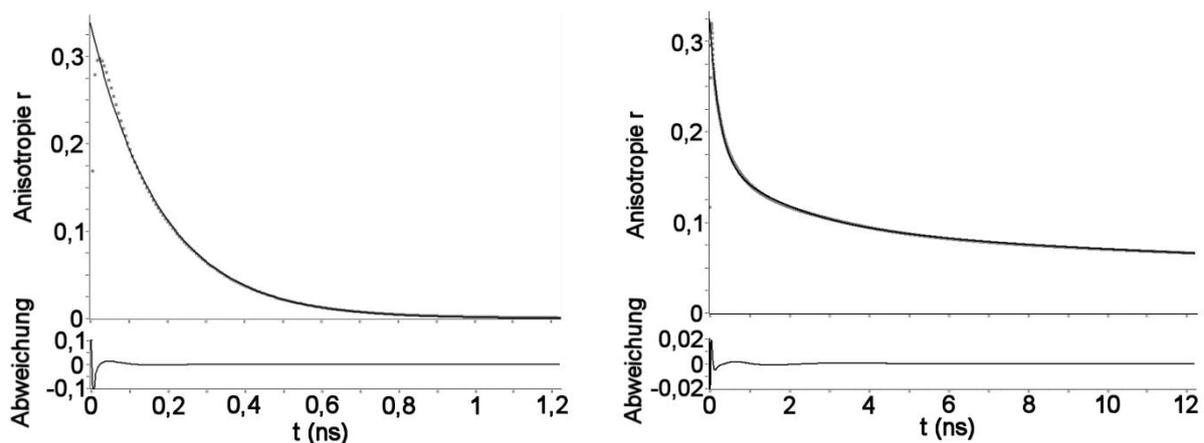


Abbildung 63: Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten. Die Anisotropiezerfallskurve von Alexa488 in freier Form (linkes Bild; schwarze Kurve) lässt sich gut mit einer einfachen Exponentialfunktion beschreiben. Aus der Anpassung (graue Punkte) ergibt sich für den freien Donorfarbstoff eine Rotationskorrelationszeit $\tau_c = 0,18$ ns. Nach einer Kopplung an die Mutante GyrA oC Q445C verschiebt sich der Wert auf 0,25 ns, wobei in diesem Fall drei Exponenten notwendig sind, um die Kurve gut zu beschreiben (rechtes Bild). Die Messdauer (25 ns) nach jedem Anregungspuls wurde in 4096 Zeitschritte unterteilt.

Die schnelle Rotation des gekoppelten Fluorophors um die eigene Achse wird jedoch von zwei langsameren Komponenten überlagert, die dadurch zustande kommen, dass das relativ kleine Alexa488 der globalen Rotation des sehr viel schwereren Proteins unterworfen ist. Für alle fünf untersuchten GyrA- bzw. GyrB-Mutanten ist daher eine dreifache Exponentialfunktion mit weiteren Phasen bei 1,6 – 3,6 ns sowie bei 25 – 46 ns zur Anpassung der Kurve erforderlich, die im Vergleich zur Messung mit freiem Farbstoff deutlich in die Länge gezogen ist (Abb. 63 rechts). Die längste Rotationskorrelationszeit ist allerdings nicht sehr gut definiert und dürfte relativ hohe (vom Evaluationsprogramm nicht bestimmte) Fehlergrenzen aufweisen. Diese Unsicherheit kommt dadurch zustande, dass die Photonendetektion ab etwa 10 ns (ca. 1600 Zeitschritte) nach dem Beginn der Aufzeichnung schon so niedrig ist, dass sie zunehmend vom Hintergrundsignal überlagert wird. Deshalb konnten in einigen Fällen (z. B. GyrA oC

N399C-Alexa488) nur die ersten 2000 (12,2 ns) der insgesamt 4096 Zeitschritte (25 ns) der Anisotropiezerfallsmessung für die Kurvenanpassung verwendet werden, so dass die längste Phase (> 25 ns) deutlich außerhalb dieses Bereichs liegt.

| Probe | Funktion | τ_c | 2. Exponent | 3. Exponent |
|------------------------|----------|-----------------|---------------|--------------|
| freies Alexa488 | einfach | 0,18 ns (100 %) | – | – |
| GyrA oC N399C-Alexa488 | dreifach | 0,37 ns (58 %) | 3,2 ns (17 %) | 40 ns (25 %) |
| GyrA oC T408C-Alexa488 | dreifach | 0,24 ns (57 %) | 1,6 ns (18 %) | 25 ns (25 %) |
| GyrA oC Q445C-Alexa488 | dreifach | 0,25 ns (47 %) | 2,1 ns (25 %) | 37 ns (28 %) |
| GyrB C58L-Alexa488 | dreifach | 0,33 ns (35 %) | 3,6 ns (32 %) | 41 ns (32 %) |
| GyrB C414S-Alexa488 | dreifach | 0,22 ns (18 %) | 3,0 ns (18 %) | 46 ns (64 %) |

Tabelle 8: Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten. Angegeben ist jeweils diejenige Exponentialfunktion (einfach bzw. dreifach), die mit einer möglichst geringen Exponentenanzahl eine gute Anpassung der Anisotropiekurve ermöglicht. Die Amplituden der einzelnen Exponenten sind in Klammern angefügt. Die gesuchte Rotationskorrelationszeit des Donors (τ_c) bewegt sich im Bereich von 0,22 – 0,37 ns, d. h. die Beweglichkeit des gekoppelten Farbstoffs ist mit derjenigen des freien Fluorophors (0,18 ns) gut vergleichbar.

4.7 Einzelmolekül-FRET

4.7.1 Optimierung der Messparameter

4.7.1.1 Donor-Akzeptor-Verhältnis

Für die Bestimmung des optimalen Donor-Akzeptor-Verhältnisses wurde GyrA oC N399C zunächst mit vier unterschiedlichen Alexa488-TMR-Mischungen statistisch doppelmarkiert. Dabei stellte sich heraus, dass das Akzeptormolekül deutlich schneller an das eingefügte Cystein bindet als der Donor, so dass sich erst bei einem ca. acht- bis zehnfachen Alexa488-Überschuss während der Markierung ein ungefähr ausgeglichenes Kopplungsverhältnis ergibt (Tab. 9). Mit den vier unterschiedlichen Ansätzen wurden anschließend jeweils zehninütige smFRET-Messungen bei RT und einer Anregungsintensität von 200 μ W sowie einer Proteinkonzentration von 70 pM durchgeführt (Abb. 64). Alle vier FRET-Histogramme bestehen aus dem 0-Signal, das von Protein-Donor-Donor erzeugt wird, und aus einem weiteren Signal bei $E_{\text{FRET}} = 1$. Dabei handelt es sich um eine Überlagerung des FRET-Zustandes (4.7.3.1) mit dem relativ schwachen Störsignal, das von Protein-Akzeptor-Akzeptor durch direkte TMR-Anregung verursacht wird. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Markierungsverhältnisse 3:1 sowie 5:1 zu einem FRET-Signal führen, welches das unerwünschte 0-Signal am deutlichsten überragt. Inkubiert man GyrA oC N399C mit einer solchen Mischung aus Alexa488 und TMR, so erhält man einen etwa 3,6- bzw. 2,3-

fachen Akzeptor-Kopplungsüberschuss gegenüber dem Donor am Protein. Daher wurden in der Folgezeit alle statistischen Doppelmarkierungen von Gyrase so durchgeführt, dass nach der Reaktion die doppelte bis dreifache Menge an Akzeptor im Vergleich zum Donor am jeweils eingefügten Cystein gekoppelt war. Bei einem Markierungsverhältnis von 1:2 bzw. 10:1 ergaben sich in den smFRET-Messungen dagegen Histogramme, in denen das FRET-Signal gegenüber dem 0-Signal schwächer ausgeprägt war.

| Markierungsverhältnis | Kopplungsverhältnis | Donor/Donor | Donor/Akzeptor | Akzeptor/Akzeptor |
|-----------------------|---------------------|-------------|----------------|-------------------|
| 1:2 | 1:9,7 | 1 % | 10 % | 49 % |
| 3:1 | 1:3,6 | 3 % | 21 % | 38 % |
| 5:1 | 1:2,3 | 6 % | 27 % | 30 % |
| 10:1 | 1:0,8 | 19 % | 29 % | 11 % |

Tabelle 9: Experimente mit unterschiedlichen Donor-Akzeptor-Verhältnissen. Das Markierungsverhältnis (Alexa488:TMR) gibt die Zusammensetzung der Farbstoffmischung an, die zusammen mit Gyrase oC N399C inkubiert wurde, um nach der Markierung das entsprechende Donor-Akzeptor-Kopplungsverhältnis am Protein zu erhalten. In den letzten drei Spalten sind die Anteile von Protein-Donor-Donor, gemischtmarkiertem Protein sowie Protein-Akzeptor-Akzeptor eingetragen, die sich aus der Analyse der Markierung ergeben und mit den Formeln in 3.6.4 berechnet wurden.

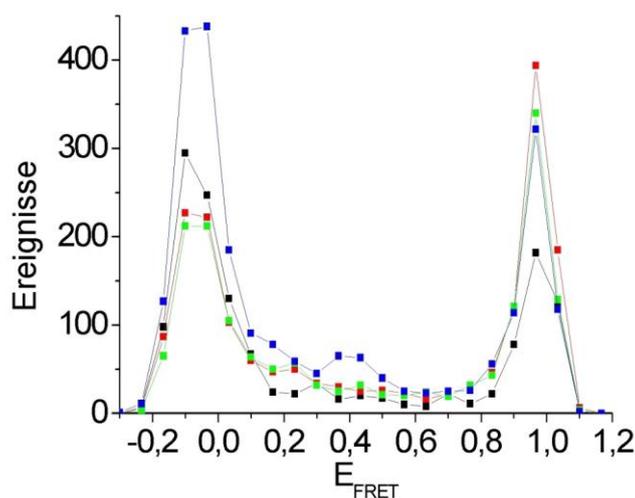


Abbildung 64: Bestimmung des optimalen Donor-Akzeptor-Verhältnisses. Die Darstellung zeigt vier smFRET-Histogramme in Punkt-Strich-Form von jeweils zehnmütigen Messungen (200 μ W Anregungsintensität) mit 70 μ M Gyrase oC N399C. Das Protein wurde zuvor mit Alexa488 und TMR in unterschiedlichen Donor-Akzeptor-Verhältnissen statistisch doppelmarkiert: 1:2 (schwarz), 3:1 (rot), 5:1 (grün) und 10:1 (blau). Bei einem Markierungsverhältnis von 3:1 bzw. 5:1 ist das gewünschte FRET-Signal bei $E_{\text{FRET}} = 1$ gegenüber dem 0-Signal am deutlichsten ausgeprägt. Inkubiert man Gyrase oC N399C mit einer derartigen Mischung, so erhält man einen zwei- bis dreifachen Akzeptor-Kopplungsüberschuss gegenüber dem Donor am Protein.

Mit den Formeln in 3.6.4 lassen sich für jeden Markierungsansatz die Anteile von gemischtmarkiertem Gyrase sowie von Protein, das entweder nur mit Donor oder nur mit Akzeptor markiert ist, berechnen (Tab. 9). Die auf diese Art ermittelten Werte bestätigen, dass bei einer statistischen Doppelmarkierung ein

zwei- bis dreifacher Akzeptor-Kopplungsüberschuss gegenüber dem Donor angestrebt werden sollte, um später möglichst aussagekräftige smFRET-Histogramme zu erhalten. Bei den Markierungsverhältnissen 3:1 bzw. 5:1 ergibt sich ein fünf- bis siebenmal höherer Anteil an der gewünschten Spezies Protein-Donor-Akzeptor gegenüber Gyrase, die nur mit Alexa488 verknüpft ist. Der hohe Protein-TMR-TMR-Anteil in diesen Ansätzen spielt kaum eine Rolle, da der Akzeptor bei $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$ nur schwach direkt vom Laser angeregt wird. Ein Verhältnis von 10:1 führt zu einem hohen Anteil an Protein-Alexa488-Alexa488, wodurch das unerwünschte 0-Signal gegenüber dem FRET-Zustand deutlich anwächst. Auf der anderen Seite ergibt sich eine ungünstige Ausbeute von gemischtmarkiertem Protein, wenn der Kopplungsüberschuss des Akzeptors gegenüber dem Donor weiter zunimmt (Markierungsverhältnis 1:2).

4.7.1.2 Anregungsintensität

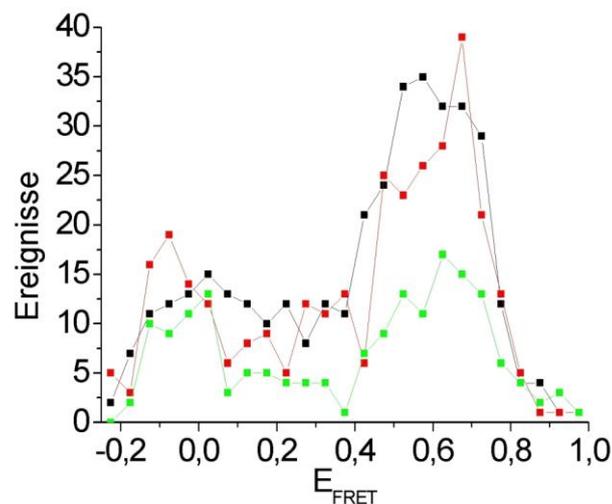


Abbildung 65: Bestimmung der optimalen Anregungsintensität. Die Darstellung zeigt drei smFRET-Histogramme in Punkt-Strich-Form von jeweils fünfminütigen Messungen mit 100 pM doppelmarkiertem GyrA oC Q445C bei unterschiedlicher Anregungsintensität. Die Photonenschwelle wurde jeweils so gewählt, dass ein möglichst aussagekräftiges Histogramm entsteht. Während bei einer Intensität von 20 μW (schwarz; Photonenschwelle 40) bzw. 75 μW (rot; 100) jeweils ein niedriges 0-Signal sowie ein klares FRET-Signal bei etwa $E_{\text{FRET}} = 0,6$ erkennbar ist, tritt bei einer Leistung von 150 μW (grün; 180) eine deutliche Bleichung der Farbstoffe auf. Da die 20- μW -Messung nur zu einer geringen Photonenzahl pro Burst führt, wird die optimale Anregungsintensität für smFRET-Messungen auf 75 μW festgesetzt.

Für die Bestimmung der optimalen Anregungsintensität wurde GyrA oC Q445C mit Alexa488 und TMR statistisch doppelmarkiert. Mit 100 pM (Proteinkonzentration) wurden daraufhin bei RT jeweils etwa fünfminütige smFRET-Messungen bei einer unterschiedlichen Anregungsintensität durchgeführt (Abb. 65). Wählt man eine geringe Leistung von 20 – 50 μW , so erhält man ein FRET-Histogramm mit einem deutlichen Signal bei $E_{\text{FRET}} = 0,6$, das vom markierten Protein stammt und das 0-Signal bei weitem überragt. Leider bestehen die Photonenergebnisse bei einer niedrigen Intensität nur aus relativ wenigen Photonen in beiden Kanälen, was für eine spätere Einzelmolekülauswertung nachteilig ist. Bei einer 75-

μW -Anregung ergibt sich ein ähnliches Histogramm, in dem das Proteinsignal noch immer deutlich ausgeprägt ist, wobei die mittlere Photonenzahl pro *Burst* deutlich erhöht ist. So kann die Photonenschwelle bei $75 \mu\text{W}$ auf einen Wert von $100 - 150$ gesetzt werden, um unter Ausblendung von Hintergrundereignissen klar definierte Signale im Histogramm zu erhalten. Eine derartige Photonenzahl ist für eine qualitative Analyse der *Bursts* in jedem Fall ausreichend. Bei einer Anregungsleistung von $20 \mu\text{W}$ müsste die Photonenschwelle zur Auswertung der Histogramme dagegen auf etwa 40 reduziert werden, was nur sehr kleine und wenig aussagekräftige Signale liefern würde. Eine hohe Leistung (oberhalb von $100 \mu\text{W}$) führt relativ schnell zu einer Bleichung der gekoppelten Farbstoffe, was sich daran bemerkbar macht, dass das Proteinsignal im Histogramm zunehmend reduziert ist und das unerwünschte 0 -Signal konstant bleibt oder sogar ansteigt. Für alle folgenden smFRET-Experimente wird daher eine Anregungsleistung von $75 \mu\text{W}$ gewählt, da unter diesen Bedingungen ausreichend deutliche Photonenergebnisse entstehen, die noch nicht von einem spürbaren Bleicheffekt betroffen sind. Eine Lösung mit markierter Gyrase, die von Lichtpulsen mit dieser Intensität bestrahlt wird, erzeugt über einen Zeitraum von mindestens 2 h praktisch konstante FRET-Signale.

4.7.1.3 Proteinkonzentration

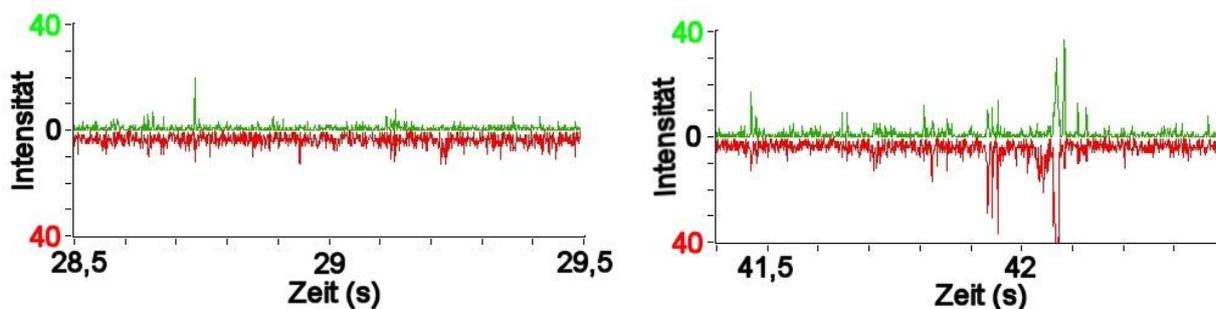


Abbildung 66: Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration. Es wurden Einzelmolekülmessungen mit doppelmarkiertem GyrA oC Q445C bei einer Anregungsintensität von $75 \mu\text{W}$ durchgeführt. Die Zeitdiagramme zeigen jeweils einen Ausschnitt von einer Sekunde, dessen Photonenvverlauf für die Messung typisch ist. Während bei einer Konzentration von 20 pM (linkes Bild) nur sehr selten Photonenergebnisse auftreten, erhält man bei 75 pM (rechtes Bild) etwa $1 - 2$ Ausschläge pro Sekunde. Die Donor- bzw. Akzeptorintensität ist jeweils über 1-ms -Intervalle integriert und wird mit einer grünen bzw. roten Linie dargestellt.

Für die Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration wurde GyrA oC Q445C mit Alexa488 und TMR statistisch doppelmarkiert. Anschließend wurden smFRET-Messungen bei einer Anregungsintensität von $75 \mu\text{W}$ und RT durchgeführt, wobei die Proteinkonzentration in der Lösung im Bereich von $25 - 100 \text{ pM}$ variiert wurde (Abb. 66). Bei einer niedrigen Proteinmenge (25 pM) sind in einem Zeitdiagramm nur sehr selten deutliche Photonenergebnisse sichtbar. Die Anzahl der hochwertigen *Bursts* nimmt proportional zur eingesetzten Konzentration zu. Ebenso steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei oder mehrere *Bursts* überlappen, was die Auswertung von smFRET-Messungen stören kann. Um dieses Problem weitgehend

zu vermeiden, wurde in Einzelmolekülexperimenten eine Proteinkonzentration von 75 pM eingesetzt. Unter diesen Bedingungen treten pro Sekunde etwa 1 – 2 photonenreiche *Bursts* auf, die wegen ihrer geringen mittleren Länge von 10 – 30 ms nur sehr selten überlappen. Die Messdauer in smFRET-Experimenten wird auf 30 min festgelegt, um einige Tausend solcher Photonenergebnisse und damit aussagekräftige FRET-Histogramme mit klar definierten Signalen zu erhalten. In Einzelfällen wurden allerdings auch Messungen mit einer höheren Proteinkonzentration durchgeführt, was an der entsprechenden Stelle im Ergebnisteil vermerkt ist.

4.7.2 Korrekturparameter

| Mutante | Farbstoffpaar | α | β | γ | δ |
|---------------|-------------------|----------|---------|----------|----------|
| GyrA oC S117C | Alexa488/TMR | 0,36 | 0,011 | 1,93 | 0,15 |
| GyrA oC T140C | Alexa488/TMR | 0,35 | 0,020 | 1,73 | 0,18 |
| GyrA oC S153C | Alexa488/TMR | 0,36 | 0,017 | 0,35 | 0,38 |
| GyrA oC N399C | Alexa488/TMR | 0,39 | 0,006 | 1,76 | 0,21 |
| GyrA oC T408C | Alexa488/TMR | 0,39 | 0,011 | 1,06 | 0,19 |
| GyrA oC Q445C | Alexa488/TMR | 0,38 | 0,014 | 1,04 | 0,30 |
| GyrA oC K594C | Alexa488/TMR | 0,33 | 0,007 | 0,42 | 0,15 |
| GyrA oC K594C | Alexa488/Alexa555 | 0,33 | 0,015 | 1,65 | 0,30 |
| GyrA oC E726C | Alexa488/TMR | 0,33 | 0,015 | 1,82 | 0,15 |
| GyrA oC E726C | Alexa488/Alexa555 | 0,33 | 0,024 | 0,75 | 0,32 |

Tabelle 10: Korrekturparameter für Einzelmolekül-FRET-Messungen mit verschiedenen GyrA-Mutanten. Einige Werte wurden von Airat Gubaev (Universität Basel) bestimmt.

Die Korrekturparameter für smFRET-Messungen wurden für alle GyrA-Mutanten bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass der Kreuzdetektionsparameter α für das Farbstoffpaar Alexa488/TMR relativ konstant bei 0,33 – 0,39 liegt, was auf eine ähnliche Umgebung der Fluorophore in allen Konstrukten hinweist. Der umgekehrte Parameter β nimmt Werte zwischen 0,006 und 0,024 an, wobei diese Abweichung in FRET-Histogrammen praktisch zu keiner Veränderung führt. Der Korrekturfaktor γ , der die Unterschiede in der Quantenausbeute sowie in der Detektionseffizienz der Farbstoffe berücksichtigt, zeigt dagegen je nach Mutante eine gewisse Varianz: Während er beispielsweise für GyrA oC T408C bzw. Q445C unter Verwendung der Farbstoffe Alexa488 und TMR 1,06 bzw. 1,04 beträgt, erhöht sich der Parameter für N399C auf 1,76. In anderen Fällen liegt γ deutlich unter dem Wert 1, da hier der Donor vermutlich besser detektiert wird als der Akzeptor. δ nimmt schließlich Werte zwischen 0,15 und 0,38 an, d. h. auch die direkte Akzeptoranregung durch den Laser ist von der Farbstoffumgebung abhängig (Tab. 10).

Es ist festzuhalten, dass die verschiedenen Korrekturfaktoren lediglich die exakte Lage der FRET-Maxima sowie ihre Amplitude in den Histogrammen beeinflussen. Neue Transfersignale, die auf weitere Enzymkonformationen in der Messlösung hindeuten würden, können durch eine Variation von α , β oder γ nicht erzeugt werden. So führt z. B. eine Erhöhung von α lediglich zu einer Verschiebung des 0-Signals nach links in den negativen Bereich. Die experimentell gemessenen Kreuzdetektionsparameter erscheinen plausibel, da mit ihnen das Nur-Donor-Signal (0-Signal) in allen smFRET-Messungen zwischen -0,09 und 0,00 liegt. Bei einer zu großen negativen Abweichung vom Nullwert ($E_{\text{FRET}} < -0,1$) wäre dagegen zu vermuten, dass ein zu hoher α -Wert verwendet wurde. Der Faktor β ist so gering, dass er so gut wie gar keinen Einfluss auf das Aussehen der FRET-Histogramme hat. Ein zu hoher Parameter γ führt allgemein zu einer schwachen Verringerung der Transfereffizienz von Photonenergebnissen und somit auch zu einer Zunahme des 0-Signals gegenüber dem jeweiligen FRET-Zustand im Histogramm. Da die Anzahl der sichtbaren Transfersignale nicht von den verwendeten Korrekturfaktoren abhängt und deren Bestimmung grundsätzlich mit experimentellen Unsicherheiten verbunden ist, können für neue Gyrasevarianten auch Standardwerte ($\alpha = 0,39$; $\beta = 0,011$; $\gamma = 1,06$) eingesetzt werden.

4.7.3 C-Tor

4.7.3.1 Verschiedene Farbstoffpositionen

Das C-Tor der Gyrase wurde durch smFRET-Messungen mit drei unterschiedlichen Fluorophorpositionen in der Untereinheit GyrA untersucht, wobei in allen Fällen das Farbstoffpaar Alexa488/TMR eingesetzt wurde (Markierungsverhältnisse siehe 4.4.4). Die Einzelmolekülmessungen wurden jeweils 30 min bei RT mit 75 pM des markierten Proteins und einer Anregungsintensität von 75 μW ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$) ohne 1:1-Teleskop durchgeführt. Die Mutante GyrA oC N399C erzeugt ein sehr deutliches FRET-Signal mit einer hohen Transfereffizienz sowie ein kleineres 0-Signal, das von GyrA mit zwei Donormolekülen erzeugt wird. Legt man eine Gauß-Verteilung über das FRET-Histogramm, so ergeben sich E_{FRET} -Maxima von $0,95 \pm 0,01$ (FRET-Zustand) sowie $0,00 \pm 0,02$ für das Störsignal (Abb. 67 oben links). Bei einem Förster-Radius von 5,4 nm entspricht dies einem experimentell bestimmten Farbstoffabstand von 3,3 nm, der recht gut mit dem theoretischen Wert aus der *E. coli*-Kristallstruktur⁷ (2,4 nm) übereinstimmt. Da die Röntgendaten mit einem C-Tor im geschlossenen Zustand aufgenommen wurden, ist dies die Konformation, in der das GyrA₂-Dimer in der Regel vorliegt. Ein zweiter Konformationszustand mit einer niedrigeren FRET-Effizienz, bei dem es sich um ein geöffnetes C-Tor handeln würde, ist nicht zu erkennen. Die Ereignisse im Histogramm werden bei einer gewählten Photonenschwelle von 100 fast ausschließlich vom markierten Protein verursacht, was eine Kontrollmessung mit reinem FRET-Puffer ohne GyrA (30 min) beweist. In Abwesenheit von Protein erhält man nur eine äußerst geringe Anzahl an Signalen mit hoher E_{FRET} -Streuung, während 75 pM GyrA oC N399C unter ansonsten gleichen

Messbedingungen fast 2000 Ereignisse liefern. Zwischen den beiden deutlichen Maxima im FRET-Histogramm sind bei allen Transfereffizienzen weitere Signale in geringer Anzahl erkennbar, bei denen es sich um eine Überlagerung von Hintergrundereignissen bzw. Artefakten sowie Proteinsignalen mit dynamischen Konformationsänderungen bzw. Farbstoffbleichprozessen handeln dürfte. Trägt man nun alle Photonenergebnisse dreidimensional gegen den jeweils ermittelten Alexa488-TMR-Abstand sowie gegen die Donor-Lebenszeit auf, so ergibt sich ein Contourdiagramm, in dem *Burst*-Häufigkeiten durch unterschiedliche Graustufen dargestellt sind (Abb. 67 oben rechts). In einem solchen 3D-Histogramm ist eine starke Häufung von Photonenergebnissen bei etwa 3,3 nm erkennbar, bei denen durch eine Analyse der Mikrozeiten eine Alexa488-Lebensdauer im Bereich von etwa 0,3 – 0,6 ns ermittelt wurde (Einstellung im Evaluationsprogramm: Kurvenanpassung ab dem 108. Zeitschritt nach dem Laserpuls). Dieser Signalbereich liegt ziemlich genau auf der theoretischen Ideallinie, die durch eine Berechnung des Abstands in Abhängigkeit von der Lebensdauer τ bei bekannten konstanten Parametern τ_0 und R_0 entsteht. Daraus folgt unmittelbar, dass es sich bei den detektierten Photonenergebnissen um tatsächliche FRET-Signale handelt und die Messung qualitativ in Ordnung ist. Würde die Verteilung der *Bursts* dagegen deutlich von der Ideallinie abweichen, so müsste man davon ausgehen, dass die gemessenen FRET-Effizienzen keinen realen Förster-Transfer darstellen, sondern durch Farbstoffbleichungen oder ähnliche Störprozesse verursacht würden.

Auch die beiden anderen GyrA-Mutanten liefern nur ein einziges FRET-Signal, das auf ein geschlossenes C-Tor hindeutet: Eine smFRET-Messung mit GyrA oC T408C unter ansonsten gleichen Bedingungen wie oben führt zu einem Histogramm, das neben dem 0-Signal ($E_{\text{FRET}} = -0,03 \pm 0,02$) einen FRET-Zustand bei einer Effizienz von $0,83 \pm 0,01$ zeigt (Abb. 67 Mitte; Photonenschwelle 100). Dieser Wert entspricht einem Alexa488-TMR-Abstand von 4,1 nm, was wiederum in der Nähe des theoretischen Wertes (3,5 nm) aus der Kristallstruktur⁷ liegt. Noch besser ist die Übereinstimmung im Fall der Cysteinmutante GyrA oC Q445C, bei der ein Abstand von 4,7 nm zu erwarten wäre: Die gemessene Transfereffizienz mit einem Maximum bei $E_{\text{FRET}} = 0,64 \pm 0,01$ deutet auf einen Donor-Akzeptor-Abstand von 4,9 nm hin (Abb. 67 unten). Auch hier existiert ein 0-Signal ($E_{\text{FRET}} = -0,03 \pm 0,02$), welches eine deutlich geringere Anzahl an Photonenergebnissen aufweist als der FRET-Zustand. Bei näherer Betrachtung der Messungen fällt auf, dass die Breite der FRET-Signale im Histogramm steigt, wenn sich das Maximum vom Extremwert $E_{\text{FRET}} = 1$ zunehmend entfernt. Dies ist auch verständlich, wenn man bedenkt, dass die Farbstoffe über C₆-Linker an das eingefügte Cystein gekoppelt sind und somit an der Verknüpfungsstelle frei rotieren können. Diese Beweglichkeit führt zu einer kontinuierlichen Fluktuation des Donor-Akzeptor-Abstands, die sich wiederum in einer Variation der berechneten FRET-Effizienz der einzelnen Photonenergebnisse äußert. Je näher der Abstand zwischen Alexa488 und TMR im Protein am Förster-Radius liegt, desto deutlicher machen sich solche Fluktuationen in der Breite der Glockenkurve im Histogramm bemerkbar (siehe auch Abb. 5 in 1.2.1).

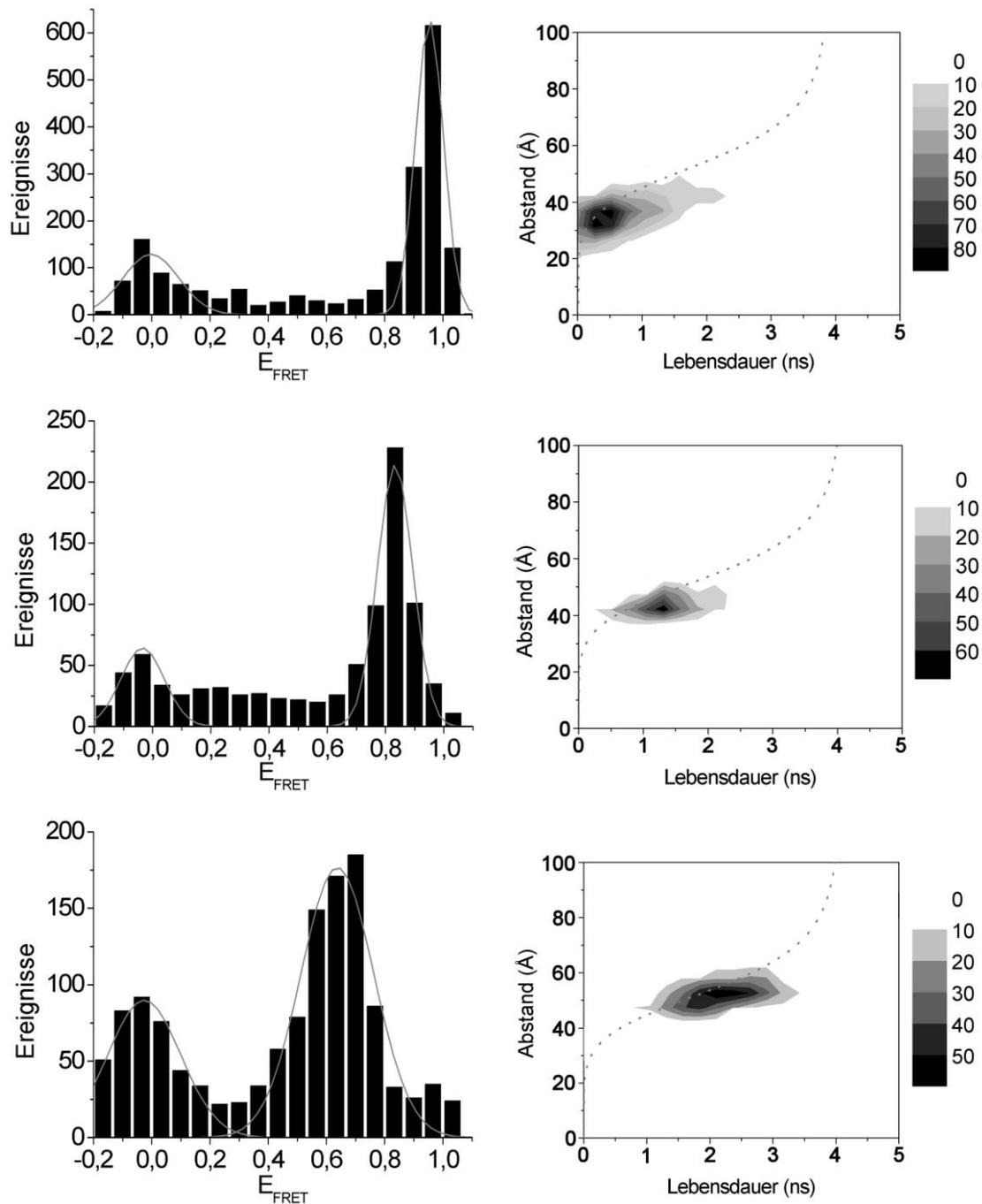


Abbildung 67: Einzelmolekül-FRET-Messungen mit GyrA an verschiedenen Positionen. 75 pM GyrA oC N399C (obere Reihe), GyrA oC T408C (mittlere Reihe) bzw. GyrA oC Q445C (untere Reihe) zeigen deutliche FRET-Signale bei $E_{\text{FRET}} = 0,95$, $0,83$ bzw. $0,64$ sowie ein schwächeres 0-Signal. Die Histogramme (jeweils links) stellen die Verteilung der Ereignisse dar (Photonenschwelle 100) und wurden mit Gauß-Funktionen (graue Linien) angepasst. Bei den Diagrammen auf der rechten Seite handelt es sich um 3D-Histogramme, in denen die Anzahl der Photonenergebnisse in Abhängigkeit vom Farbstoffabstand und von der Donor-Lebenszeit durch unterschiedliche Graustufen dargestellt sind. Fast alle Bursts liegen auf oder an der Ideallinie (grau gepunktet), d. h. es handelt sich bei den Stellen mit höchster Dichte um tatsächliche FRET-Ereignisse ohne Bleichung der Farbstoffe. Die 0-Signale, die keinen realen Förster-Transfer anzeigen, streuen in den Contourbildern über einen weitläufigen Bereich und sind daher (bei den eingestellten Graustufenniveaus) nicht sichtbar.

Eine Multiparameteranalyse (Fit des Donor-Lebensdauerzerfalls ab dem 108. von 256 Zeitschritten) ergibt, dass sowohl im Fall von GyrA oC T408C als auch bei Q445C keine Bleichung der Farbstoffe oder sonstige Störeffekte aufgetreten sind. Auch bei diesen beiden Mutanten liegen die Stellen mit der höchsten Dichte im 3D-Histogramm erfreulicherweise genau auf der berechneten Ideallinie.

4.7.3.2 Gyrase mit Substraten

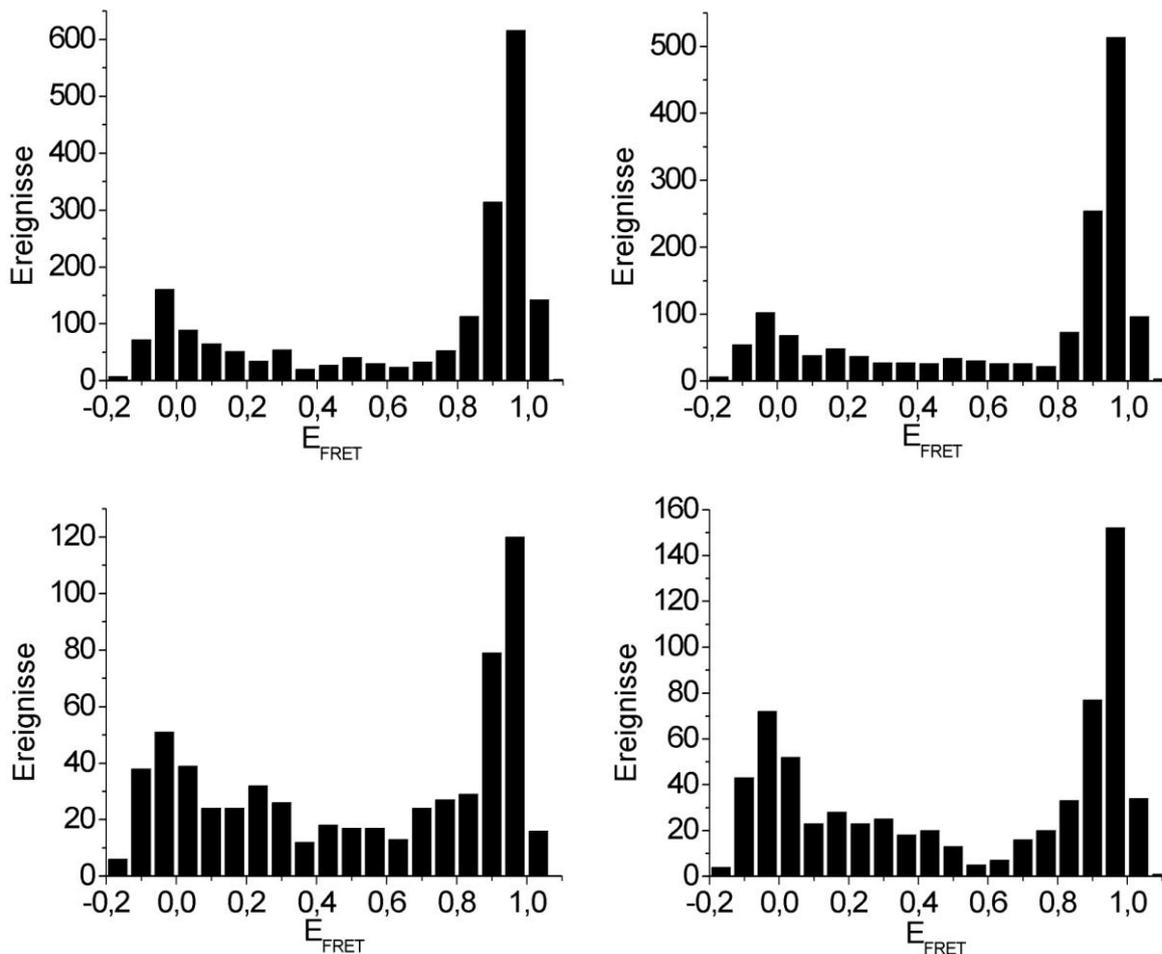


Abbildung 68: Einzelmolekül-FRET-Messungen mit GyrA oC N399C. 75 pM des mit Alexa488 und TMR markierten Proteins (oben links) wurden der Reihe nach mit 2 μ M GyrB WT (oben rechts), 146 nM pUC18 (unten links) und 2 mM ATP (unten rechts) versetzt. Alle Messungen fanden jeweils 30 min bei RT und bei einer Anregungsintensität von 75 μ W statt. Die Anzahl der Ereignisse nimmt wegen der zunehmenden Hintergrundverunreinigung ab. Es konnte neben dem bekannten Signal bei $E_{\text{FRET}} = 0,95$ kein zweiter FRET-Zustand detektiert werden.

Neben der geschlossenen C-Tor-Konformation sollte auch eine offene existieren, was durch smFRET-Messungen unter Zugabe von verschiedenen Substraten untersucht wurde. 75 pM GyrA oC N399C, das mit Alexa488 und TMR doppelmarkiert ist, zeigt im FRET-Histogramm (30 min RT, Anregungsintensität 75 μ W) nur ein einziges Transfersignal bei $E_{\text{FRET}} = 0,95$, das dem geschlossenen Torzustand

zuzuschreiben ist. Nach der Zugabe von 2 μM GyrB WT zur Bildung der tetrameren Gyrase ändert sich daran nichts (Abb. 68). Bei den eingesetzten Konzentrationen sowie den Dissoziationskonstanten (4.3.4) ist zu erwarten, dass etwa 99 % des markierten GyrA in A_2B_2 -Form vorliegen. Das FRET-Histogramm weist die gleiche Form wie in Abwesenheit von GyrB auf, d. h. das Verhältnis zwischen dem FRET- und dem 0-Signal ist identisch und es konnte keine zweite (geöffnete) Konformation des C-Tores festgestellt werden. Lediglich die Anzahl der *Bursts*, die die Photonenschwelle von 100 überschreiten, ist um etwa 10 – 15 % reduziert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die GyrB-Präparation nicht in FRET-, sondern in normalem Proteinpuffer vorliegt und daher zu einem bestimmten Grad fluoreszierende Kontaminanten enthält. Diese erhöhen während der Messung die Hintergrundzählraten in beiden Detektionskanälen, was aufgrund des verwendeten *Burst*-Erkennungsalgorithmus dazu führt, dass das Evaluationsprogramm bei der Messung mit GyrB weniger *Bursts* findet als zuvor in Abwesenheit der Untereinheit. Außerdem tritt nach der Zugabe der Substrate ein Verdünnungseffekt ein, der die Proteinkonzentration und damit die Ereignisanzahl um weitere 5 – 10 % reduziert.

Bei einer anschließenden Zugabe von 146 nM ethanolgefälltem pUC18 nimmt die Anzahl der Ereignisse im FRET-Histogramm aus demselben Grund deutlich ab, da das Plasmid in sehr hoher Konzentration eingesetzt wird und trotz der Ethanol-fällung noch viele fluoreszierende Verunreinigungen enthält. Die hohe pUC18-Menge ist aufgrund des ungünstigen K_D (GyrA/pUC18) (0,17 μM) erforderlich, damit ein signifikanter Anteil des Enzyms (46 %; Formel siehe 7.2.1) an DNA bindet. Dies ist leider ein Grundproblem in Einzelmolekül-FRET-Messungen: Eine höhere Ligandenkonzentration führt zu einer besseren Substratsättigung des Enzyms und damit zu einer höheren Komplexkonzentration; allerdings nimmt gleichzeitig die Hintergrundzählrate zu, so dass die Detektion der Photonenergebnisse erschwert wird. Die Konzentrationen aller Bindungspartner wurden in allen Messungen so gewählt, dass ein guter Kompromiss zwischen Enzym-Substrat-Sättigung sowie Belastung durch fluoreszierende Kontaminanten vorliegt. Außerdem wurde die Photonenschwelle bei der pUC18-Messung auf einen höheren Wert (150) gesetzt, um die Anzahl der unerwünschten Hintergrundartefakte zu reduzieren. Abgesehen von der niedrigeren Ereignisanzahl im Histogramm hat die DNA-Zugabe nicht zu einer Verhaltensänderung des markierten Proteins geführt: Nach wie vor liegt nur ein FRET-Zustand bei einer Transfereffizienz von etwa 0,95 vor, der dem geschlossenen C-Tor-Zustand entspricht. Die geöffnete Enzymkonformation, die man im Nukleotidzyklus erwarten würde, ist unter den gegebenen Konditionen im Histogramm nicht erkennbar. Eine weitere Zugabe von 2 mM ATP (74 % Sättigung bei K_D (GyrB/ATP) = 0,71 mM, Berechnung siehe 7.2.1) führt zum gleichen Ergebnis wie bei der nukleotidfreien Messung in Anwesenheit von pUC18 (Photonenschwelle 150). Gleiches gilt, wenn statt ATP wahlweise 1 mM des nicht-hydrolysierbaren Nukleotidanalogs AMPPNP (entspricht einer 90%igen Sättigung), 2 mM ATP γ S (94 %) oder 2 mM ADP (98 %) eingesetzt wird.

Die Mutanten GyrA oC T408C und Q445C zeigen nach einer Zugabe von GyrB bzw. Substraten ein gleichartiges Verhalten wie N399C. Weder die Zugabe von Plasmid-DNA noch von Nukleotiden führt dazu, dass sich die jeweiligen FRET-Signale bei $E_{\text{FRET}} = 0,83$ bzw. $0,64$ verschieben; oder dass an einer anderen Stelle neue Konformationszustände sichtbar werden. Alle drei untersuchten C-Tor-Positionen verhalten sich übereinstimmend und belegen reproduzierbar, dass das Tor während des Nukleotidzyklus der Gyrase in der Regel geschlossen ist. Der geöffnete Zustand, der für die Freisetzung der T-DNA nach der Strangpassage notwendig ist, und der eine niedrigere Transfereffizienz haben sollte, konnte in keinem FRET-Histogramm sichtbar gemacht werden. Verwendet man statt ringförmigen Plasmiden lineare Kalbsthymus-DNA, so bleibt das Transfersignal von GyrA oC N399C ebenfalls konstant bei $E_{\text{FRET}} = 0,95$. Bei diesen Messungen (zusammen mit GyrB WT und ATP bzw. AMPPNP) wurden etwa 0,5 mg DNA abgewogen und direkt in der FRET-Küvette gelöst, um eine maximale Substratsättigung des Enzyms sicherzustellen. Diese Menge entspricht bei einer angenommenen mittleren Kettenlänge von 2000 Basenpaaren einer DNA-Konzentration von ca. $2 \mu\text{M}$, was mehr als eine Größenordnung über der zuvor eingesetzten pUC18-Menge liegt. Mit einer solchen Substratmenge sollten rein rechnerisch etwa 90 % des Enzyms ein DNA-Molekül zur Verfügung haben (7.2.1), ohne dass die Hintergrundzählrate in den Detektionskanälen nennenswert ansteigt. Dennoch ist nicht einmal annäherungsweise ein zweites FRET-Signal im Histogramm erkennbar, das einem offenen C-Tor-Zustand zuzuschreiben wäre.

4.7.3.3 Einzelmolekülereignisse

Da FRET-Histogramme keinen Hinweis auf eine geöffnete C-Tor-Konformation geben, wurden einzelne Photonenergebnisse näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass selten, d. h. wenige Male pro 30-min-Messung, *Bursts* auftreten, die einen definierten Sprung zwischen zwei FRET-Niveaus vollziehen. Dabei entsprach das obere Effizienzniveau in der Regel dem Zustand, der als Maximum im Histogramm deutlich sichtbar war. Die untere E_{FRET} -Ebene im Diagramm war von der untersuchten Cysteinposition abhängig. So findet man beispielsweise bei der Mutante GyrA oC N399C einzelne Photonenergebnisse, bei denen plötzlich ein Sprung von $0,95$ auf etwa $0,5$ (oder auch $0,4$) vorkommt (Abb. 69 links). Das Enzym hat also seine Konformation am C-Tor geändert, während es den Laserfokus durchquert hat. Zu Beginn des abgebildeten 20-ms-*Bursts* war das Tor geschlossen, so dass die Farbstoffe eine geringe Distanz hatten und ein deutlicher Förster-Transfer stattfand. Nach etwa 10 ms öffnete das Tor, was zu einem größeren Donor-Akzeptor-Abstand und damit zu einer niedrigeren FRET-Effizienz führte. Eine Bleichung des Akzeptors kann hierbei ausgeschlossen werden, da E_{FRET} in diesem Fall nicht auf $0,5$, sondern auf den Wert 0 springen würde. Beim dargestellten Einzelmolekülereignis handelt es sich also tatsächlich um eine reale Konformationsänderung des Enzyms.

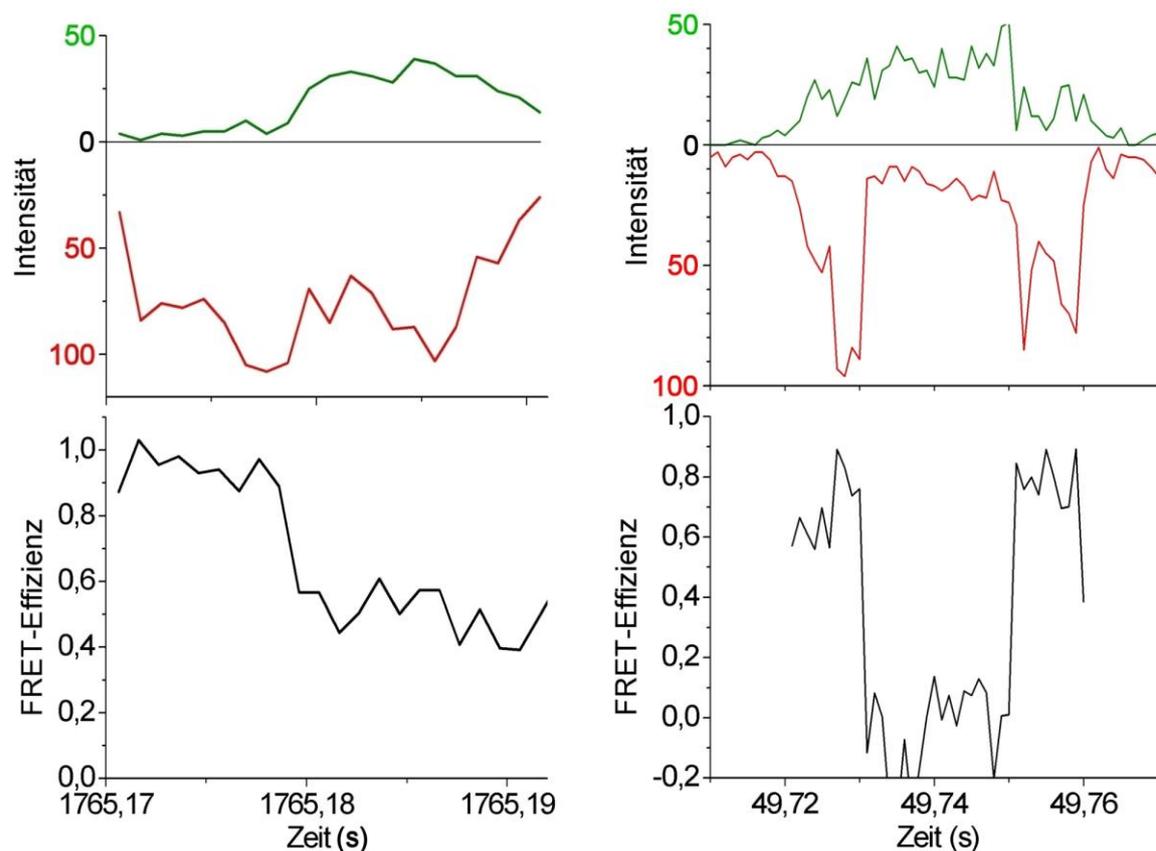


Abbildung 69: Einzelmolekülereignisse. Bei smFRET-Messungen mit GyrA oC N399C sind seltene Bursts zu sehen, deren FRET-Effizienz von 0,95 auf 0,5 springt, während das Enzym durch den Laserfokus wandert (linke Seite). Im Zeitdiagramm (oben) sind die Donor- (grün) und Akzeptorzählraten (rot) pro ms gegen die Messzeit aufgetragen. Das FRET-Diagramm (unten) zeigt die entsprechende Transfereffizienz des Bursts (Länge: 20 ms) in ms-Zeitschritten. Die rechte Seite zeigt ein Ereignis aus einer Messung mit GyrA oC Q445C, in dem die FRET-Effizienz von etwa 0,7 auf 0 und wieder zurück auf 0,7 springt, d. h. das Enzym hat zweimal die Konformation geändert, während es (in 40 ms) den Laserfokus durchquert hat.

Eine Untersuchung anderer C-Tor-Mutanten bestätigt dieses Ergebnis: Im Fall von GyrA oC T408C treten bisweilen *Bursts* auf, die einen Sprung von $E_{\text{FRET}} = 0,85$ auf etwa 0,3 anzeigen. Bei Q445C liegen einzelne Photonenergebnisse vor, die vom geschlossenen Zustand ($E_{\text{FRET}} = 0,65$) in eine Konformation übergehen, die zu einer Transfereffizienz von 0 – 0,1 führt. In allen Fällen finden die Sprünge zwischen zwei Niveaus sehr schnell, d. h. innerhalb von 1 ms statt. Ereignisse mit zwei Konformationsänderungen wurden extrem selten detektiert, da die maximale Aufenthaltsdauer eines fluoreszierenden Objekts im Laserfokus wegen der molekularen Diffusion auf etwa 20 – 40 ms begrenzt ist. Abb. 69 rechts zeigt ein solches Photonenergebnis aus einer Messung mit GyrA oC Q445C, das zunächst einen Sprung von $E_{\text{FRET}} = 0,7$ auf etwa 0 und anschließend wieder auf 0,7 zeigt. Das anfangs geschlossene C-Tor hat sich in diesem Fall also erst geöffnet und ging ca. 20 ms später wieder in den stabileren Ausgangszustand zurück. Auch hier kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Sprünge nicht durch eine Konformationsänderung, sondern durch Farbstoffbleichung zustande kamen. Bei einem derartigen Ausfall des Akzeptormoleküls während der Beobachtung wäre die Transfereffizienz bei $E_{\text{FRET}} = 0$

konstant geblieben und hätte nicht wieder zurück in den Ausgangszustand (0,7) gehen können. Die beschriebenen Sprünge finden in der Regel statt, wenn GyrB sowie die Substrate DNA und ATP in der Küvette vorliegen, allerdings wurden derartige Ereignisse auch in reinen GyrA-Messungen entdeckt. Für eine exakte Häufigkeitsanalyse wäre es notwendig, wesentlich mehr smFRET-Experimente durchzuführen (mindestens 10 30-min-Messungen pro Mutante in An- bzw. in Abwesenheit der Substrate). Erst mit einer solchen Datenmenge können genaue statistische Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Zugabe von DNA/ATP und dem Auftreten von Photonenergebnissen mit interessanten Niveausprüngen getroffen werden.

Rechnet man die FRET-Effizienzen der offenen C-Tor-Zustände in Farbstoffabstände um, so erhält man die ungefähren Werte 5,4 – 5,8 nm (N399C), 6,2 nm (T408C) bzw. > 7,8 nm (Q445C). Zum Vergleich: In der geschlossenen Konformation wurden Donor-Akzeptor-Entfernungen von 3,3 nm (N399C), 4,1 nm (T408C) bzw. 4,9 nm (Q445C) gemessen. Die Differenz zwischen den Abständen beträgt also bei allen C-Tor-Mutanten etwa 2 – 3 nm, was den Durchmesser einer doppelsträngigen DNA (2,0 nm) etwas übertrifft. Die Ergebnisse aus den Einzelmolekülbetrachtungen erscheinen daher plausibel, da das C-Tor die Aufgabe hat, während des Nukleotidzyklus temporär zu öffnen, um die T-DNA freizusetzen. Bei der hier beschriebenen Öffnung der Region um ca. 2 – 3 nm kann das Substrat die Gyrase in jedem Fall problemlos verlassen.

4.7.3.4 Verwendung von Glycerin

Da sich ein fluoreszierendes Molekül nur maximal 20 – 40 ms im Laserfokus aufhält, findet man nur selten Einzelmolekülereignisse, bei denen während des Durchtritts eine Änderung des FRET-Zustands erfolgt. Es wäre daher wünschenswert, die Dauer des Aufenthalts im Fokus (d. h. die Beobachtungszeit) zu verlängern, um breitere *Bursts* mit mehr FRET-Änderungen zu erhalten. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Glycerin, da dieser Stoff eine relativ hohe Viskosität aufweist. Dies führt zu einer Verringerung der molekularen Diffusion und somit zu einer Verlängerung der Zeitspanne, die ein fluoreszierendes Objekt benötigt, um den Fokus zu durchqueren. Der vorhandene FRET-Puffer wurde 1:1 mit Glycerin vermischt und die entstandene 50%ige Glycerinlösung aktivkohlegereinigt, um Hintergrundkontaminationen zu entfernen. Anschließend wurde eine smFRET-Messung (30 min RT bei 75 μ W) mit GyrA oC Q445C, das mit Alexa488 und TMR doppelmarkiert war, in diesem Puffer durchgeführt. Das Zeitdiagramm zeigt tatsächlich deutlich längere Photonenergebnisse mit einer Dauer von bis zu 100 – 500 ms. Allerdings nimmt auch die Anzahl der *Bursts* pro Zeit deutlich ab, da wegen der hohen Viskosität wesentlich seltener ein fluoreszierendes Molekül durch den Laserfokus wandert. Außerdem fällt auf, dass sich Änderungen zwischen FRET-Niveaus teilweise über 10 – 20 ms erstrecken, während sie bei glycerinfreien Messungen in der Regel innerhalb von 1 ms stattfinden. Diese deutliche

Verlangsamung von Konformationsänderungen ist problematisch, da damit nicht mehr garantiert ist, dass der Nukleotidzyklus der Gyrase nach einer Substratzugabe korrekt und reibungslos durchlaufen wird. Das langsame Umschalten zwischen zwei FRET-Zuständen führt auch dazu, dass pro Photonenergebnis nicht mehr Niveauänderungen zu sehen sind als in Experimenten ohne Glycerin. Deshalb wurde in allen folgenden smFRET-Messungen auf die künstliche Erhöhung der Viskosität durch Glycerin verzichtet.

4.7.4 DNA-Tor

4.7.4.1 Verschiedene Farbstoffpositionen

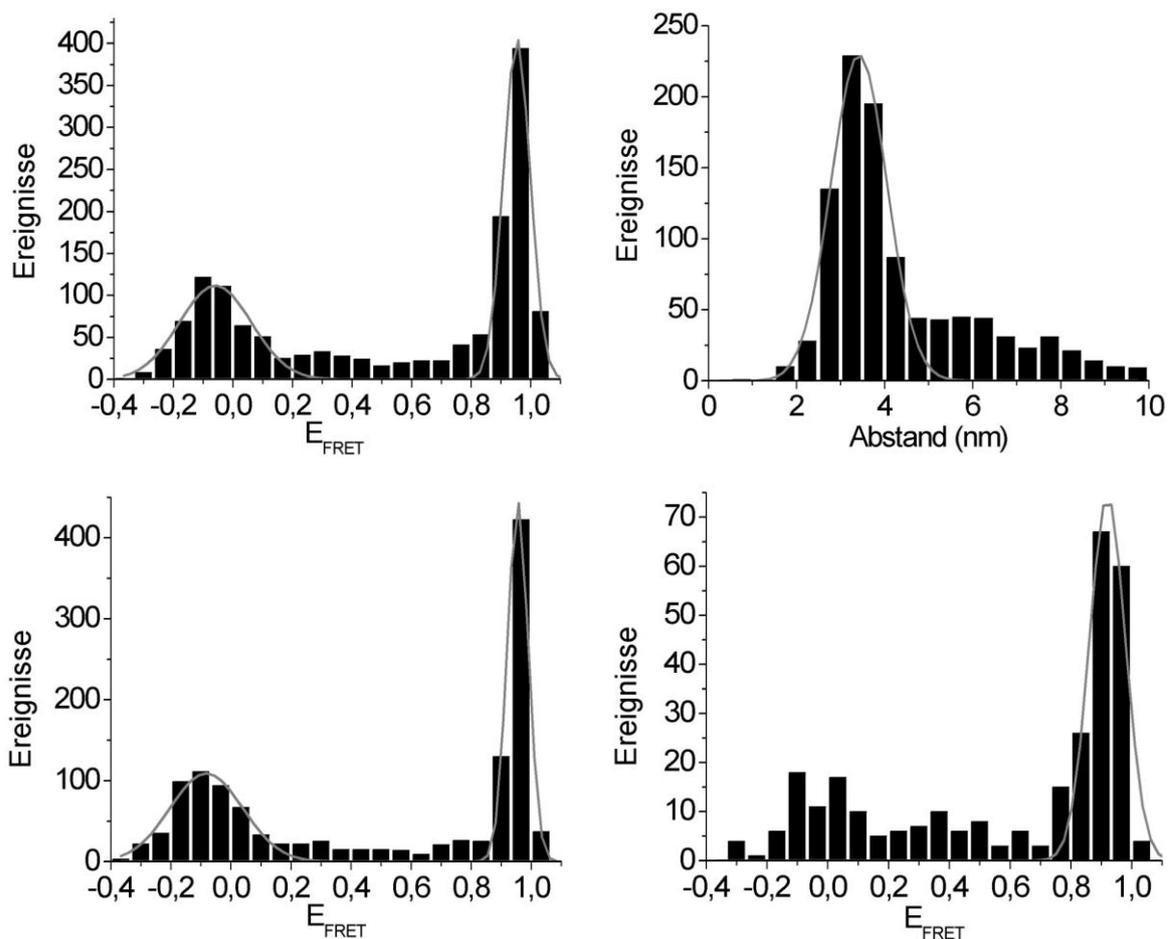


Abbildung 70: Untersuchung des DNA-Tores der Gyrase. Eine smFRET-Messung mit 150 pM GyrA oC S117C (mit Alexa488 und TMR) führt zu einem deutlichen Transfersignal bei $E_{\text{FRET}} = 0,95$ (links oben). Im entsprechenden Abstandshistogramm ist ein Maximum bei 3,4 nm erkennbar (rechts oben). Die Mutanten GyrA oC T140C (links unten) und S153C (rechts unten; jeweils 75 μM) zeigen ein ähnliches Verhalten und liefern Signale bei $E_{\text{FRET}} = 0,96$ bzw. 0,92 (Photonenschwelle in allen Messungen: 100).

Zur Untersuchung des DNA-Tores der Gyrase wurde GyrA an drei verschiedenen Positionen mit Alexa488 und TMR doppelmarkiert (Kopplungsverhältnisse siehe 4.4.4). Eine Einzelmolekül-FRET-Messung (30 min RT bei 75 μW) mit der Mutante GyrA oC S117C, bei denen die Farbstoffe etwas

oberhalb des Tores positioniert sind, führt zu einem sehr deutlichen FRET-Signal mit einem Maximum von $0,95 \pm 0,01$ (Abb. 70; 0-Signal: $-0,06 \pm 0,02$). Bei diesen Experimenten wurde wegen der mäßigen S117C-Markierungseffizienz die doppelte Menge an Protein (150 pM) eingesetzt (Photonenschwelle in allen DNA-Tor-Messungen: 100). Die Transfereffizienz entspricht bei $R_0 = 5,4$ nm einer gemessenen Alexa488-TMR-Distanz von 3,3 nm, was recht gut mit dem Erwartungswert aus der Kristallstruktur⁷ (3,0 nm) korreliert. Da diese mit einem DNA-Tor in geschlossener Konformation aufgezeichnet wurde, ist dies der Zustand, in dem das GyrA₂-Dimer in der Regel vorliegt. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 70 außerdem ein Abstands-FRET-Histogramm dargestellt, in dem die Häufigkeiten der Ereignisse gegen den Farbstoffabstand aufgetragen sind. Auch in diesem Fall lässt sich das Maximum mit einer Gauß-Analyse exakt bestimmen, was eine Donor-Akzeptor-Distanz von $3,4 \pm 0,1$ nm ergibt und mit der gemessenen Transfereffizienz übereinstimmt.

Verwendet man die Position GyrA oC T140C (75 pM), so erhält man ein FRET-Maximum bei $0,96 \pm 0,01$ (0-Signal: $-0,08 \pm 0,01$), woraus sich eine Donor-Akzeptor-Distanz von 3,2 nm errechnet. Bei dieser Mutante sind die Farbstoffe mit einem theoretischen Abstand von 3,4 nm unterhalb des DNA-Tores platziert. Eine Einzelmolekülmessung mit 75 pM GyrA oC S153C liefert dagegen ein Maximum bei $E_{\text{FRET}} = 0,92 \pm 0,01$ bzw. 3,6 nm (Erwartungswert: 2,6 nm). Interessanterweise werden bei dieser Mutante reproduzierbar wesentlich weniger *Bursts* detektiert als bei den anderen Positionen unter vergleichbaren Konditionen. Wegen der geringen Ereignisanzahl kann auch keine exakte Gauß-Analyse des 0-Signals (E_{FRET} ca. $-0,05$) durchgeführt werden. Der Grund für dieses Verhalten ist unklar, aber es besteht die Möglichkeit, dass die beiden Fluorophore an dieser Position – genau in der Mitte des DNA-Tores – durch die molekulare Umgebung stark gequenchet oder anderweitig behindert werden. Eine übermäßige Bleichung der Farbstoffe an dieser Position ist nicht anzunehmen, da das zugehörige 3D-Contourbild eine Dichteverteilung auf der theoretischen Ideallinie zeigt. Gleiches gilt auch für die beiden anderen DNA-Tor-Mutanten GyrA oC S117C bzw. T140C. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass dieser Bereich im GyrA₂-Dimer in einer geschlossenen Konformation vorliegt, was aufgrund der hohen Autoaffinität der GyrA-Untereinheit auch nicht überraschend ist.

4.7.4.2 Gyrase mit Substraten

Mit den Mutanten GyrA oC T140C und S117C wurden auch smFRET-Experimente in Anwesenheit von verschiedenen Substraten durchgeführt. Zum markierten GyrA wurden zunächst 2 μM GyrB WT und anschließend eine hohe Menge an ethanolgefälltem pUC18 (128 – 146 nM) gegeben, was einer DNA-Sättigung von 43 – 46 % entspricht (siehe 7.2.1). Statt ringförmiger Plasmid-DNA wurde in manchen Messungen auch 0,5 mg Kalbsthymus-DNA (Sättigung ca. 90 %) verwendet. Bei dem eingesetzten GyrB-Überschuss ist zu erwarten, dass etwa 99 % der markierten GyrA-Untereinheiten in Form von tetramerer

Gyrase vorliegen. Die Messreihen wurden in der Regel durch den Einsatz von 2 mM ATP (74%ige Sättigung) oder 1 mM AMPPNP (90 %) vervollständigt. Nach jedem Schritt wurden Einzelmolekül-Experimente (30 min RT bei einer Anregungsintensität von 75 μ W) durchgeführt, um den Einfluss der zugegebenen Substrate zu untersuchen. In allen FRET-Histogrammen ist jedoch nur das bereits bekannte Transfersignal bei $E_{\text{FRET}} = 0,96$ (T140C) bzw. 0,95 (S117C) erkennbar, das einer geschlossenen DNA-Tor-Konformation zuzuschreiben ist. Die darin enthaltenen Photonenergebnisse werden praktisch ausschließlich, d. h. zu etwa 99 %, vom markierten GyrA verursacht, was durch Kontrollmessungen mit reinem FRET-Puffer bzw. nach Zugabe von pUC18 und ATP bewiesen wurde. Ein zweiter Zustand mit einer niedrigeren Transfereffizienz, der ein offenes Tor andeuten würde, konnte in keinem Histogramm festgestellt werden. Dies gilt auch für FRET-Experimente mit GyrA oC T140C, die nicht bei RT, sondern unter Verwendung eines speziellen Küvettemperieraufsatzes bei 37°C durchgeführt wurden. Der einzige sichtbare Effekt in den Histogrammen ist die allgemeine Reduzierung der Ereignisanzahl nach einer Substratzugabe (v. a. durch pUC18), die einerseits auf den Verdünnungseffekt und andererseits auf die steigenden Hintergrundzählraten durch fluoreszierende Kontaminanten zurückzuführen ist. Während des Nukleotidzyklus der Gyrase ist das DNA-Tor also fast immer geschlossen. Die offene Konformation, die zur Passage der T- durch die G-DNA erforderlich ist, hat scheinbar nur eine sehr kurze Lebenszeit im Vergleich zur gesamten Zyklusdauer, so dass sie in FRET-Histogrammen nicht erkennbar ist.

4.7.4.3 Einsatz von Inhibitoren

Gyrasehemmer blockieren das Enzym, indem sie sich irreversibel an den Protein-DNA-Komplex anlagern (siehe auch 1.1.2). Sie arretieren dabei den Konformationszustand, in dem die G-DNA gespalten und kovalent mit den beiden aktiven Tyrosinen verknüpft ist. Man geht davon aus, dass diese Inhibitoren hochspezifisch an die einzelsträngigen G-DNA-Enden binden, die vorübergehend durch die Spaltung entstehen, und dadurch die Religation des Substrats verhindern. Durch den Einsatz von solchen Stoffen, die unter dem Oberbegriff Chinolone zusammengefasst werden, sollte es daher eventuell möglich sein, einen offenen DNA-Tor-Zustand auch in Einzelmolekül-FRET-Messungen sichtbar zu machen. Gyrasehemmer leiten sich vom Grundstoff Nalidixinsäure ab und liegen mittlerweile in einer Vielzahl von Varianten vor (Abb. 71). Nicht alle Chinolone inhibieren dieselben Zielenzyme; es wurde vielmehr beschrieben, dass bestimmte Vertreter gegen die Gyrase und andere gegen die bakterielle Topoisomerase IV vorgehen, wobei es wiederum Unterschiede zwischen gram-positiven und -negativen Organismen gibt. Zur smFRET-Untersuchung des DNA-Tores wurden die drei Gyrasehemmer Oxolinsäure, Ciprofloxacin und Sparfloxacin ausgewählt. 75 pM GyrA oC T140C bzw. 150 pM GyrA oC S117C wurden zunächst mit 2 μ M GyrB WT und einer hohen pUC18-Menge (128 – 150 nM) vermischt. Daraufhin wurden smFRET-Messungen (30 min RT bei 75 μ W) in Anwesenheit eines der drei Inhibitormoleküle durchgeführt. Im Fall von Ciprofloxacin wurde 50 μ M Hemmstoff eingesetzt, wobei

eine Stammlösung von 5 mM in 0,01 M HCl verwendet wurde. Der leicht saure pH-Bereich ist erforderlich, da der Inhibitor einen isoelektrischen Punkt von 7,4 hat und daher in FRET-Puffer kaum löslich ist. Ciprofloxacin hat einen IC_{50} -Wert von 7 μ M, d. h. bei dieser Konzentration werden 50 % der Zielenzymmoleküle inhibiert. Bei Messungen mit Oxolinsäure ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) wurden 200 $\mu\text{g/ml}$ aus der vorbereiteten Stammlösung (50 mg/ml in 0,5 M NaOH) verwendet. Das dritte Chinolon Sparfloxacin hat je nach Quelle einen IC_{50} zwischen 3 und 240 $\mu\text{g/ml}$ und ist – wie alle hydrophoben Gyrasehemmer – in wässrigen Lösungsmitteln relativ schlecht löslich, so dass nur eine geringe Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt werden konnte. In allen smFRET-Experimenten trat nur das bereits bekannte Signal bei einer Effizienz von 0,95 (S117C) bzw. 0,96 (T140C) auf (geschlossenes DNA-Tor), während in keinem Histogramm ein zweiter Zustand (geöffnetes DNA-Tor) sichtbar war. Dabei spielte es keine Rolle, ob zusätzlich zum Inhibitor noch 2 mM ATP im Ansatz enthalten war oder nicht. Möglicherweise lag eine zu geringe Chinolonkonzentration vor; oder die eingesetzten Hemmstoffe agieren nicht gegen die Gyrase aus *B. subtilis*, sondern spezifisch gegen die Topo IV oder gegen die homologen Enzyme aus anderen Organismen.

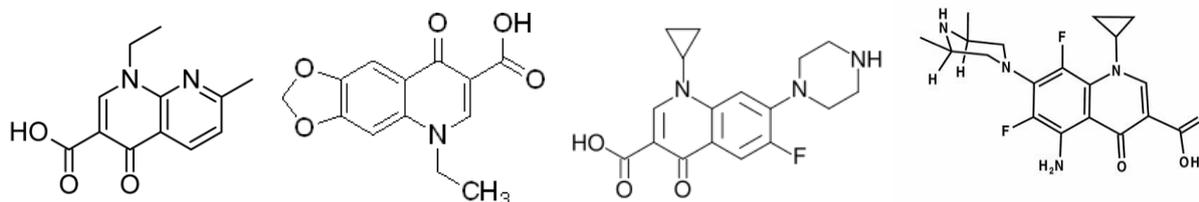


Abbildung 71: Verschiedene Gyrasehemmer. Die Strukturformeln zeigen von links nach rechts die Chinolonverbindungen Nalidixinsäure, Oxolinsäure, Ciprofloxacin und Sparfloxacin. Nalidixinsäure ist das Grundgerüst dieser Stoffklasse, während die anderen Moleküle durch Derivatisierungen aus dieser Verbindung entstanden sind. Quelle: Sigma-Aldrich

In Abwesenheit von Mg^{2+} wird Calciumionen ebenfalls zugeschrieben, einen stabilisierenden Einfluss auf den kovalenten Gyrase-DNA-Komplex mit einer offenen DNA-Tor-Konformation auszuüben^{25,49}. Daher wurden smFRET-Messungen mit GyrA oC S117C (150 pM) bzw. T140C (75 pM) in modifiziertem FRET-Puffer durchgeführt, der kein $MgCl_2$, aber stattdessen 4 mM $CaCl_2$ enthielt. Bei diesen Experimenten wurde wiederum markiertes Protein mit 2 μ M GyrB WT und 128 – 150 nM pUC18 in An- bzw. Abwesenheit von 2 mM ATP vermischt und in den Einzelmolekülaufbau eingesetzt. Auch diese Maßnahme führte jedoch nicht zu einem zweiten FRET-Signal in den Histogrammen, welches ein geöffnetes DNA-Tor anzeigen würde.

4.7.4.4 Einzelmolekülereignisse

Da die FRET-Histogramme keinen Hinweis auf eine offene Konformation des DNA-Tores ergeben, wurden einzelne *Bursts* aus den Messungen mit GyrA oC T140C näher untersucht. Dabei stellte sich

heraus, dass bisweilen Photonenergebnisse mit einem definierten Sprung zwischen zwei FRET-Niveaus vorliegen. Die Transferänderung erfolgt dabei zwischen einer oberen Ebene bei $E_{\text{FRET}} = 0,96$, die bereits als geschlossenes DNA-Tor in FRET-Histogrammen identifiziert wurde, und einem zweiten Zustand mit einer Effizienz von etwa 0,4 (Abb. 72). Dabei wird es sich höchstwahrscheinlich um die gesuchte offene Konformation des DNA-Tores handeln, die während des Nukleotidzyklus der Gyrase zum Durchtritt des T-Segments durch die G-DNA erforderlich ist. Andere mögliche Erklärungen wie z. B. eine Bleichung des Akzeptorfarbstoffs scheiden aus, da dieser Effekt zu einer vollständigen Beendigung des Transfers ($E_{\text{FRET}} = 0$) führen würde. Eine FRET-Effizienz von 0,4 entspricht bei $R_0 = 5,4$ nm einem Alexa488-TMR-Abstand von etwa 5,8 nm. Die Farbstoffe am geöffneten DNA-Tor sind also ungefähr 2,6 nm weiter voneinander entfernt als im Grundzustand, wenn dieser Enzyrbereich geschlossen vorliegt (Abstand 3,2 nm). Bei einem dsDNA-Durchmesser von 2,0 nm erscheint dieses Ergebnis plausibel: Eine derartige Toröffnung ist ausreichend, um den T-DNA-Doppelstrang problemlos durch die gesplante und kovalent gebundene G-DNA zu führen.

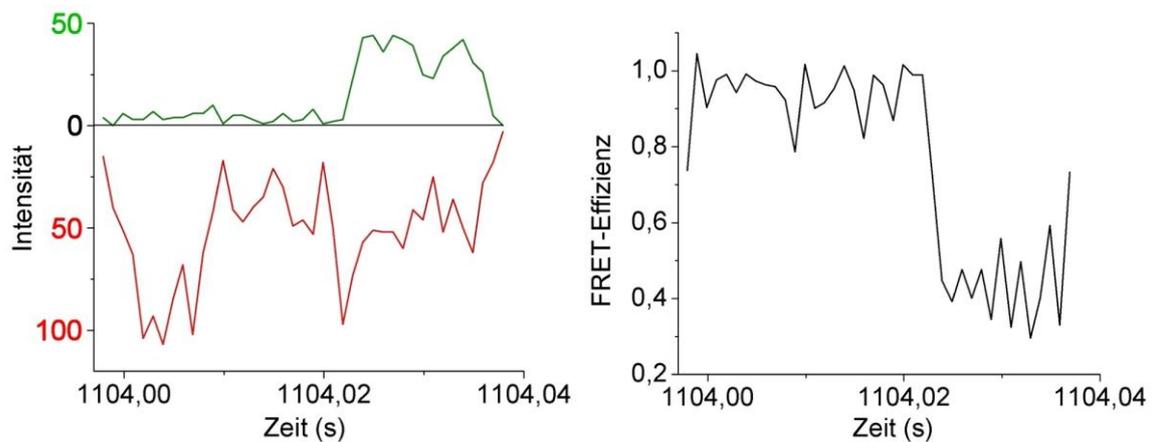


Abbildung 72: Ein Einzelmolekülereignis mit Niveauänderung. Bei smFRET-Messungen mit GyrA oC T140C sind manchmal Bursts zu sehen, deren FRET-Effizienz von 0,96 auf 0,4 springt, während das Enzym durch den Laserfokus wandert. Im Zeitdiagramm (linkes Bild) sind die Donor- (grün) und Akzeptorzählraten (rot) pro ms gegen die Messzeit aufgetragen. Das FRET-Diagramm (rechtes Bild) zeigt die entsprechende Transfereffizienz des Bursts (Länge: 40 ms) in ms-Zeitschritten.

Die beschriebenen Einzelmolekülereignisse mit einem E_{FRET} -Sprung zwischen 0,4 und 0,96 treten leider relativ selten (ca. 2 Bursts in 30 min) auf. Sie erscheinen allerdings nur in solchen Messungen, in denen neben doppelmarkiertem GyrA auch GyrB WT, DNA sowie ATP vorliegen. Dabei spielt es keine Rolle, ob ringförmige Plasmid-DNA oder lineare Kalbsthymus-DNA eingesetzt wurde. Die Anwesenheit eines Gyrasehemmers ändert nichts an der Häufigkeit solcher Photonenergebnisse, wobei fraglich ist, inwieweit die verwendeten Chinolonsubstanzen überhaupt in der Lage sind, *B. subtilis*-Gyrase zu blockieren. Reine Ereignisse mit $E_{\text{FRET}} = 0,4$ treten zwar (sehr selten) in allen T140C-Messungen auf, aber deren Anzahl erhöht sich auf ungefähr 8 – 10 pro 30-min-Messung, wenn alle Substrate einschließlich ATP in der

Küvette vorliegen. Im Vergleich dazu werden im gleichen Zeitraum ca. 200 – 300 *Bursts* mit einer Transfereffizienz von etwa 0,96 detektiert. Zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Messung liegen also nur 3 – 4 % der Enzyme in der offenen DNA-Tor-Konformation vor. Für eine exakte Aussage über die Häufigkeit von Einzelmolekülereignissen mit einer FRET-Niveauänderung wäre es allerdings sinnvoll, noch deutlich mehr Daten zu sammeln und auszuwerten. Mindestens 10 30-min-Messungen in An- bzw. Abwesenheit aller relevanten Substrate und Inhibitoren wären erforderlich, um den Zusammenhang zwischen der Zugabe von DNA bzw. ATP sowie dem Auftreten der Signale mit einem FRET-Niveau bei 0,4 statistisch abzusichern.

4.7.5 N-Tor

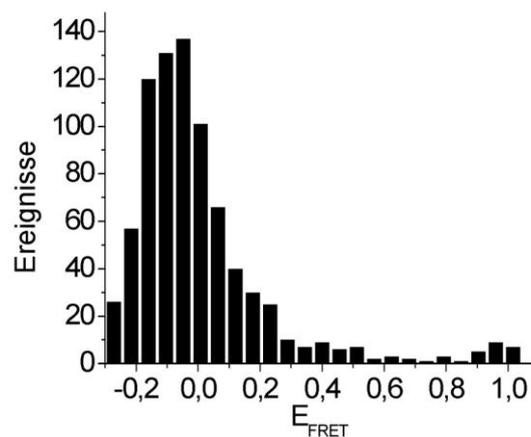


Abbildung 73: Einzelmolekül-FRET-Messung am N-Tor der Gyrase. 70 pM GyrB C414S-Alexa488, 70 pM GyrB C414S-Alexa546, 2 μM GyrA WT und 500 μM AMPPNP wurden vermischt und eine smFRET-Messung (30 min RT) bei 75 μW durchgeführt. Das Histogramm (Photonenschwelle 100) zeigt lediglich ein 0-Signal, aber kein weiteres Maximum, das auf einen Förster-Transfer zurückzuführen ist.

Zur Untersuchung des N-Tores der Gyrase wurde die Mutante GyrB C414S, die in Abwesenheit von GyrA und Nukleotid als Monomer vorliegt, in separaten Ansätzen mit Alexa488 bzw. mit Alexa546 einzelmolekülmäßig markiert. Jeweils 70 pM Protein-Donor und Protein-Akzeptor wurden daraufhin vermischt und mit dieser Probe smFRET-Messungen (30 min RT, 75 μW) durchgeführt. Anschließend wurden 2 μM GyrA WT bzw. AMPPNP oder pUC18 hinzugefügt und die Einzelmolekülexperimente wiederholt. In allen FRET-Histogrammen ist jeweils ein deutliches 0-Signal zu erkennen, das von GyrB C414S-Alexa488 erzeugt wird (Abb. 73). Gelegentlich erscheint auch ein schwaches Maximum bei $E_{\text{FRET}} = 1$, das durch eine direkte Laseranregung der Protein-Akzeptor-Moleküle entsteht. Abgesehen von diesen beiden Signalen kann in keiner Messung ein FRET-Zustand detektiert werden. Weder die Zugabe von 500 μM AMPPNP (Sättigung 81 %; siehe 7.2.1) noch der Einsatz von Plasmid-DNA (146 nM pUC18; 46 % Sättigung) führen dazu, dass in den Histogrammen ein Signal auftritt, das auf einen Förster-Transfer

zwischen dem Donor und dem Akzeptor zurückzuführen ist. Dabei spielt es keine Rolle, ob das nicht-hydrolysierbare Nukleotid in An- oder in Abwesenheit von GyrA zu den fluoreszierenden GyrB-Untereinheiten gegeben wurde. Aufgrund der Tatsache, dass die Röntgenkristallstruktur von GyrB als Dimer mit zwei AMPPNP-Molekülen aufgezeichnet wurde⁶, wäre bei der Verwendung dieses Nukleotidanalogs (ohne GyrA) eine deutliche GyrB₂-Bildung zu erwarten gewesen. Dies hätte zu einem theoretischen Farbstoffabstand von 5,7 nm geführt, so dass bei $R_0 = 6,4$ nm ein Transfersignal bei etwa $E_{\text{FRET}} = 0,67$ aufgetreten wäre. Die Dimerisierung von GyrB konnte jedoch unter den vorliegenden Bedingungen nicht erreicht bzw. detektiert werden, so dass es nicht möglich war, das N-Tor der Gyrase mit Einzelmolekül-FRET-Experimenten zu untersuchen. Es ist davon auszugehen, dass bei picomolaren Probenkonzentrationen in jedem Fall ausschließlich monomeres GyrB vorliegt, woran auch die Zugabe von GyrA bzw. von AMPPNP nichts ändern kann. Der K_D -Wert für die nukleotidinduzierte Dimerisierung von GyrB liegt im μM -Bereich (4.2.2.7) und daher mehrere Größenordnungen über der verwendeten Proteinkonzentration.

Eine FCS-Analyse der Kreuzkorrelationskurven aus den Einzelmolekülmessungen bestätigt dieses Ergebnis: Die Wahrscheinlichkeit, zum Zeitpunkt $t = \tau$ ein Akzeptorphoton zu detektieren, wenn bei $t = 0$ ein Donorquant erfasst wurde (bzw. andersherum), ist unabhängig von den Komponenten, die sich in der Küvette befinden. 70 pM GyrB C414S-Alexa488 erzeugt in Abwesenheit des Akzeptors eine Kreuzkurve, deren Form unverändert bleibt, wenn nach der Zugabe von 70 pM GyrB C414S-Alexa546 erneut gemessen wird. Bei einer Dimerisierung würde sich (zumindest teilweise) gemischtmarkiertes GyrB₂ bilden und somit die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass während der Diffusionszeit eines Moleküls im Fokus sowohl Donor- als auch Akzeptorphotonen detektiert würden. Dies hätte wiederum zu einer sichtbaren Änderung der Amplitude der Kreuzkorrelationskurve geführt, die jedoch nicht eingetreten ist.

4.7.6 C-terminale Domäne von GyrA

4.7.6.1 TMR als Akzeptor

Zur FRET-Untersuchung der CTD von GyrA wurden die beiden Positionen GyrA oC K594C sowie E726C mit Alexa488 und TMR doppelmarkiert (Kopplungsverhältnisse siehe 4.4.4). Die Mutante K594C (300 pM) erzeugt in einer 30-min-smFRET-Messung bei RT ein FRET-Maximum im Bereich des 0-Signals, wenn sie mit einer Leistung von 75 μW angeregt wird. Auch nach einer Zugabe von 2 μM GyrB zur Bildung der tetrameren Gyrase überlagert sich der FRET-Zustand mit dem Störsignal, so dass er nicht durch eine Gauß-Analyse exakt definiert werden kann (Abb. 74; Photonenschwelle 150). Der Parameter K für die *Burst*-Detektion wurde bei allen CTD-Experimenten auf den Wert 2 gesetzt, um auch schwächere Photonenergebnisse zu detektieren und ihre Gesamtanzahl zu erhöhen. Die niedrige

Transfereffizienz war zu erwarten, da die Distanz der beiden Farbstoffe sehr hoch ist, nachdem sie kovalent an die gleichartigen Cysteine (C594) in A_2B_2 gekoppelt werden. Im Gegensatz zu den Messungen am C- oder am DNA-Tor liegen die beiden C-terminalen Domänen im Tetramer nicht unmittelbar gegenüber, sondern sind auch im Grundzustand (in DNA-Abwesenheit) relativ weit voneinander entfernt. Das zugehörige 3D-Histogramm zeigt eine Stelle mit einer hohen Dichte an Photonenergebnissen, die unmittelbar an der theoretischen Ideallinie liegen und auf einen Donor-Akzeptor-Abstand von etwa 7 – 8 nm hindeuten. Diese Distanz stimmt mit dem Erwartungswert (7,4 nm)¹⁶ überein und entspricht bei $R_0 = 5,4$ nm einer Transfereffizienz von etwa 0,1 – 0,15. Eine weitere Zugabe von 150 nM pUC18 sowie von 2 mM ATP zur Messlösung in der FRET-Küvette führt zum gleichen Ergebnis.

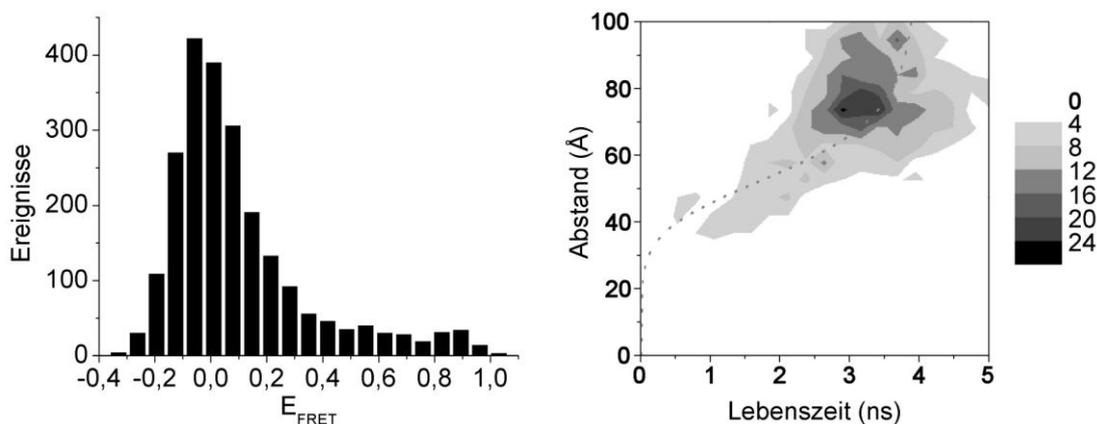


Abbildung 74: GyrA oC K594C mit Alexa488 und TMR. 300 pM markiertes Protein (+ 2 μ M GyrB WT) erzeugt ein FRET-Signal im Bereich von $E_{\text{FRET}} = 0$, das sich mit dem Nur-Donor-Störsignal überlagert (linkes Bild; Photonenschwelle 150; Burst-Detektionsparameter $K = 2$). Das 3D-Histogramm (rechtes Bild) deutet auf einen Farbstoffabstand von 7 – 8 nm hin, was einer Transfereffizienz von etwa 0,1 – 0,15 entsprechen würde.

Ein interessantes Verhalten zeigt die Mutante GyrA oC E726C, wenn sie mit Alexa488 und TMR doppelmarkiert wurde: Eine Einzelmolekül-FRET-Messung mit 300 pM Protein unter denselben Bedingungen wie oben ($K = 2$) führt zunächst zu einem Histogramm, das neben einem 0-Signal bei $E_{\text{FRET}} = -0,09 \pm 0,01$ einen FRET-Zustand bei $0,13 \pm 0,01$ anzeigt (Abb. 75 oben links; Photonenschwelle 250). Dabei spielt es keine Rolle, ob die Messung in An- oder Abwesenheit von 2 μ M GyrB WT durchgeführt wird. Der daraus berechnete Farbstoffabstand von 7,4 nm liegt deutlich unter dem Erwartungswert¹⁶ (12,9 nm), wobei derart niedrige Transfereffizienzen für eine exakte Distanzmessung nicht gut geeignet sind. Mischt man nun 150 nM ethanolgefälltes pUC18 in die GyrA/GyrB-Lösung, so erscheint reproduzierbar ein zweites FRET-Signal bei einer relativ hohen Transfereffizienz (Abb. 75 unten links). Bei der Gauß-Analyse des Histogramms (Photonenschwelle 120) wurden die beiden ersten (schwer trennbaren) Normalverteilungskurven mit den Maxima bei $E_{\text{FRET}} = -0,09$ und bei $0,13$ festgesetzt, um die Anzahl der Freiheitsgrade zu verringern. Aus der Kurvenanpassung ergibt sich daraufhin eine dritte Glockenkurve

bei $E_{\text{FRET}} = 0,87 \pm 0,02$, was einem Donor-Akzeptor-Abstand von 3,9 nm entspricht. Dieses Ergebnis ist überraschend, da eine Aufklappung der CTDs und damit eine deutliche Erhöhung der Farbstoffdistanz postuliert wurde, wenn das Protein an ein DNA-Molekül bindet. Eine weitere Zugabe von 2 mM ATP hat keinen Einfluss auf die Anwesenheit bzw. Höhe dieses FRET-Signals. Dagegen liegt bei einer Einzelmolekülmessung mit GyrA, GyrB und ATP kein Zustand mit einer hohen Transfereffizienz vor, d. h. das Signal bei $E_{\text{FRET}} = 0,87$ wird nur durch die Anwesenheit des Plasmids verursacht. Die entsprechenden 3D-Contourbilder zeigen bei Experimenten ohne pUC18 einen Schwerpunkt im hohen Distanzbereich (7 – 8 nm), während nach der DNA-Zugabe eine deutliche Verschiebung der Dichteverteilung (zu 3 – 4 nm) erkennbar ist (Abb. 75; rechte Seite). Alle FRET-Zustände liegen im 3D-Histogramm unmittelbar auf der berechneten Ideallinie, d. h. während der Messung sind keine Nebeneffekte wie z. B. Farbstoffbleichungen aufgetreten.

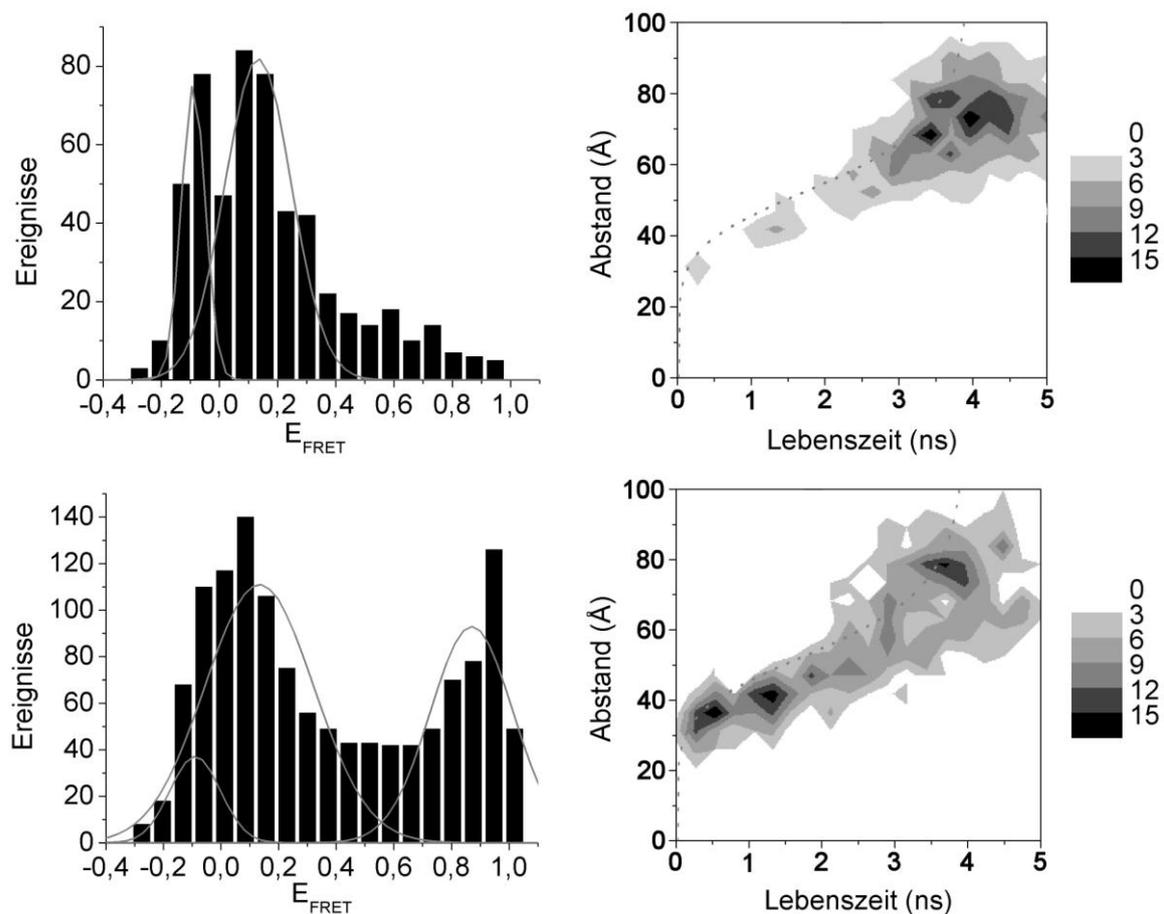


Abbildung 75: GyrA oC E726C mit Alexa488 und TMR. 300 pM markiertes Protein (+ 2 μM GyrB WT) erzeugt ein FRET-Signal bei $E_{\text{FRET}} = 0,13$ (links oben; Photonenschwelle 250; Burst-Detektionsparameter $K = 2$). Nach der Zugabe von 150 nM pUC18 erscheint ein weiterer FRET-Zustand bei einer Transfereffizienz von 0,87 (links unten; Photonenschwelle 120; $K = 2$). Auch die entsprechenden 3D-Contourbilder zeigen in Anwesenheit der DNA eine deutliche Verschiebung der Häufigkeitsverteilung zu einem geringeren Farbstoffabstand (rechte Seite).

4.7.6.2 Alexa555 als Akzeptor

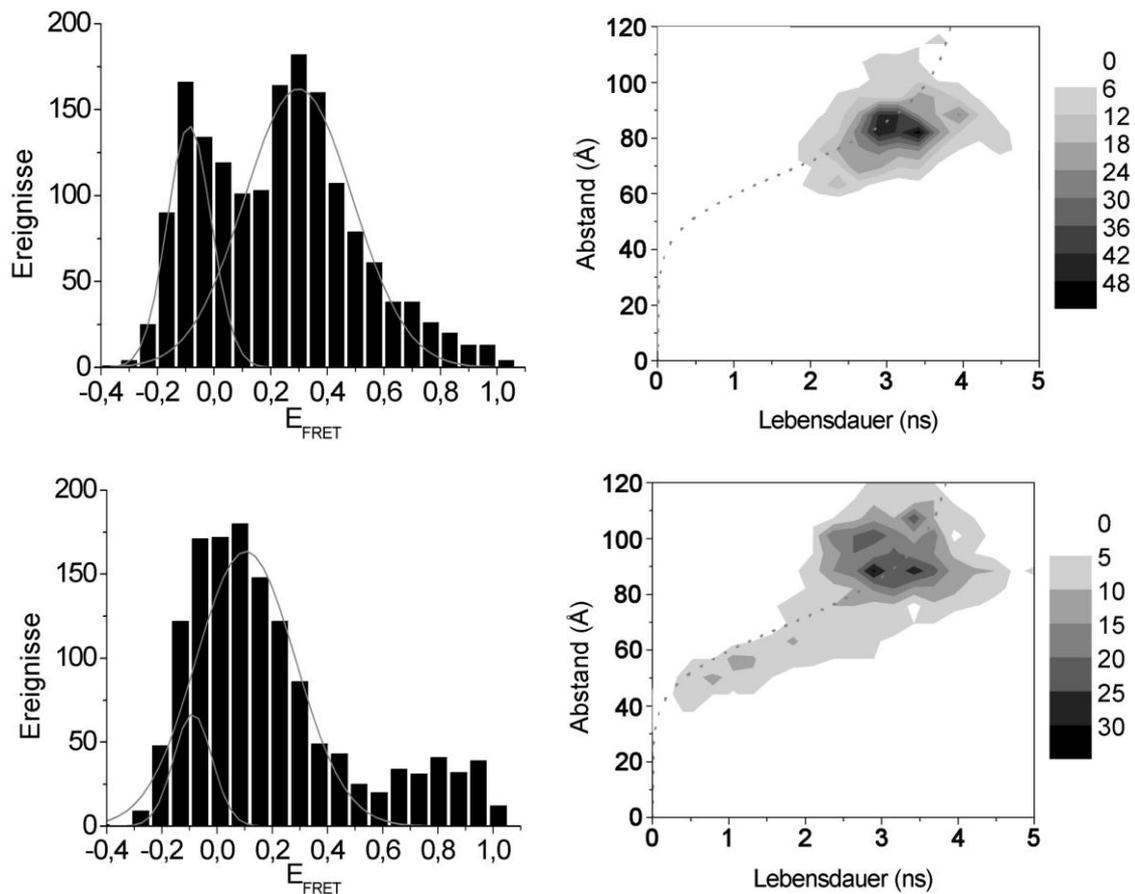


Abbildung 76: GyrA oC K594C mit Alexa488 und Alexa555. 300 pM markiertes Protein erzeugt ein FRET-Signal bei $E_{FRET} = 0,30$ (links oben; Photonenschwelle 200; Burst-Detektionsparameter $K = 2$). Nach der Zugabe von 2 μM GyrB WT und 150 nM pUC18 verschiebt sich das Transfersignal durch die DNA-Interaktion auf den Wert 0,1 (links unten). Die entsprechenden 3D-Contourbilder zeigen in Anwesenheit von pUC18 eine Verlagerung der Häufigkeitsverteilung zu einem höheren Farbstoffabstand (rechte Seite).

Da der Donor-Akzeptor-Abstand relativ hoch ist, wenn sich die Farbstoffe an der CTD befinden, wurde als alternativer Akzeptor Alexa555 eingesetzt, um den Förster-Radius R_0 auf 7,0 nm und damit die Aussagekraft der Messung zu erhöhen. Die Mutante GyrA oC K594C erzeugt daraufhin ein deutliches FRET-Signal bei einer Transfereffizienz von $0,30 \pm 0,01$ sowie ein 0-Signal bei $E_{FRET} = -0,09 \pm 0,01$ (Abb. 76). Bei dieser 30-min-Messung bei RT wurden 300 pM des markierten Proteins mit einer Leistung von 75 μW angeregt (Photonenschwelle 200; $K = 2$). Das Contourdiagramm zeigt eine Stelle mit einer hohen Ereignisdichte, die sich genau auf der berechneten Ideallinie befindet. Nach einer Zugabe von 2 μM GyrB WT und 150 nM pUC18 verlagert sich der FRET-Zustand in die Nähe des Nur-Donor-Störsignals. Im FRET-Histogramm (Photonenschwelle 200; $K = 2$) ist daher nur noch ein Zustand sichtbar, der aus der Überlagerung der beiden Komponenten entsteht. Fixiert man das Maximum bei

$E_{\text{FRET}} = -0,09$, um die Anzahl der Freiheitsgrade zu minimieren, so erhält man aus der Gauß-Analyse eine Transfereffizienz von $0,10 \pm 0,05$ für das FRET-Signal. Der Alexa488-Alexa555-Abstand nimmt also durch die Wechselwirkung mit dem Plasmid von 8 nm auf etwa 10 nm zu. In Abwesenheit von DNA korreliert die gemessene Distanz mit dem Erwartungswert¹⁶ (7,4 nm). Die Fluorophore entfernen sich nach der pUC18-Zugabe voneinander, offenbar weil die beiden C-terminalen Domänen von GyrA durch den Einfluss des Plasmids hochklappen. Die Dichteverteilung im Contourbild verlagert sich in Anwesenheit von DNA entsprechend zu einem höheren Farbstoffabstand. Eine weitere Zugabe von 2 mM ATP ändert nichts mehr am Ergebnis.

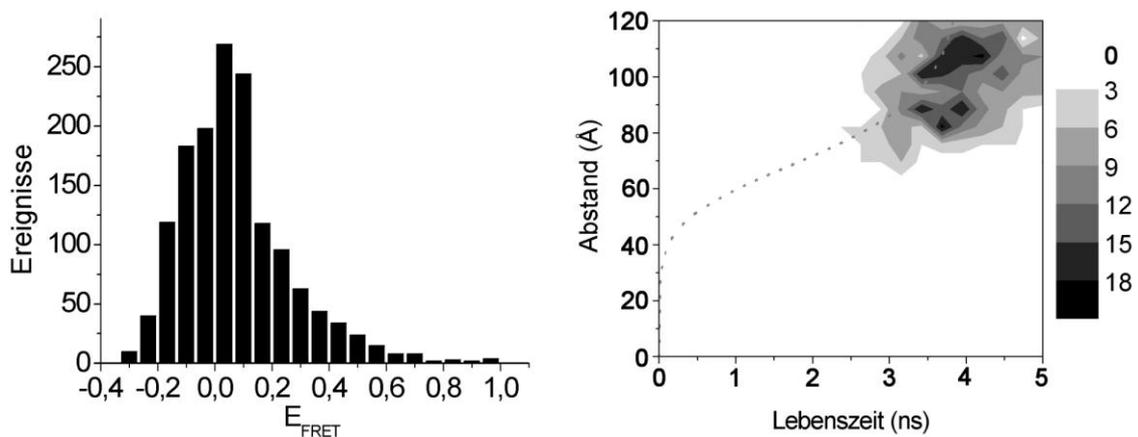


Abbildung 77: GyrA oC E726C mit Alexa488 und Alexa555. 300 pM markiertes Protein erzeugt ein FRET-Signal im Bereich von $E_{\text{FRET}} = 0$, das sich mit dem Nur-Donor-Störsignal überlagert (linkes Bild; Photonenschwelle 250; $K = 2$). Das zugehörige 3D-Histogramm deutet auf einen Farbstoffabstand von 10 – 11,5 nm hin (entspricht $E_{\text{FRET}} = 0,05 - 0,10$; rechtes Bild).

Eine Markierung der Mutante GyrA oC E726C mit Alexa488 und Alexa555 führt zu einem Histogramm, in dem sich der FRET-Zustand mit dem 0-Signal überlagert (Abb. 77). Die Einzelmolekülmessung erfolgte mit 300 pM Protein unter den gleichen Bedingungen wie oben (Photonenschwelle 250). Wegen der fehlenden Trennung der Maxima ist es nicht sinnvoll, das Histogramm mit einer Gauß-Funktion anzupassen. Das 3D-Contourbild zeigt dagegen einen definierten Zustand auf der Ideallinie, der kaum vom (weitläufig streuenden) 0-Signal überlagert wird. Der Kernbereich liegt bei ca. 10 – 11,5 nm, woraus sich bei $R_0 = 7,0$ nm eine Transfereffizienz von 0,05 – 0,10 ergibt, was mit dem FRET-Histogramm in Einklang zu bringen ist. Der Donor-Akzeptor-Abstand stimmt außerdem relativ gut mit dem Erwartungswert¹⁶ (12,9 nm) überein – bei derart niedrigen E_{FRET} -Werten ist eine solche Abweichung nicht ungewöhnlich. Nach einer Zugabe von 2 μM GyrB WT und 150 nM pUC18 in die Messküvette erhält man ein vergleichbares Histogramm wie in Abwesenheit des Plasmids. Es kann jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, ob das FRET-Maximum an exakt der gleichen Stelle verbleibt, oder ob es wegen einer eventuellen Zunahme der Farbstoffdistanz durch die DNA-Einwirkung noch näher zum Nullpunkt wandert. Auch das 3D-Contourbild von der E726C-Messung in pUC18-Anwesenheit unterscheidet sich

praktisch nicht von dem Diagramm, das in Abb. 77 dargestellt ist, d. h. es können in diesem Fall keine klaren Aussagen über den DNA-Einfluss auf die CTD-Orientierung abgeleitet werden.

4.7.7 FCS

4.7.7.1 Konfokales Volumen

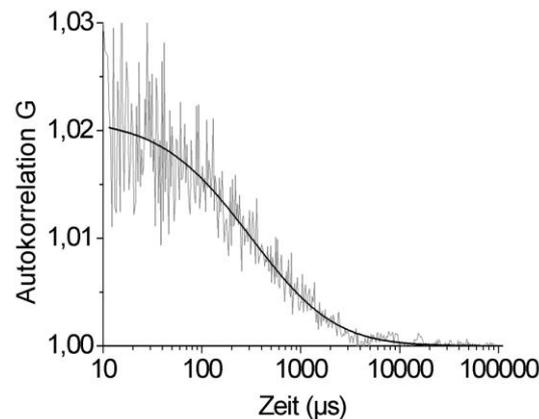


Abbildung 78: Bestimmung des konfokalen Volumens. Die Autokorrelation $G(\tau)$ von 4 nM Uranin (in 0,1 M NaOH) wurde 30 min bei RT gemessen (graue Kurve). Aus der Kurvenanpassung (schwarz) folgt, dass der ellipsoide Anregungsfokus einen Durchmesser von $1,23 \pm 0,22 \mu\text{m}$ und eine Länge von $0,43 \pm 0,07 \mu\text{m}$ hat. Das konfokale Volumen umfasst daher etwa 2,7 fl.

Zur Bestimmung der Ausmaße des konfokalen Volumens wurde eine Lösung aus 4 nM Uranin in 0,1 M NaOH (pH = 13) hergestellt. Diese Probe wurde anschließend 30 min bei RT im smFRET-Aufbau bei $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$ mit einer Intensität von $75 \mu\text{W}$ bestrahlt und die (Donor-)Autokorrelationskurve aufgezeichnet (Abb. 78). $G(\tau)$ nimmt im Bereich von $t = 10 \mu\text{s} - 100 \text{ ms}$, d. h. über vier Größenordnungen hinweg, von etwa 1,02 auf 1,00 ab und lässt sich durch die Autokorrelationsfunktion sehr gut beschreiben. Aus der Kurvenanpassung (mit $D = 280 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) folgt, dass sich im zeitlichen Mittel etwa 47 fluoreszierende Teilchen im Anregungsfokus befinden ($N = 47,3 \pm 1,4$). Das konfokale Volumen lässt sich durch ein Ellipsoid mit dem radialen Durchmesser $\omega_{xy} = 1,23 \pm 0,22 \mu\text{m}$ und der Länge $\omega_z = 0,43 \pm 0,07 \mu\text{m}$ beschreiben, was einem Volumen $V_k = 2,7 \cdot 10^{-15} \text{ l}$ (2,7 fl) entspricht. Die Diffusionszeit τ_D , welche angibt, wie lange ein einzelnes Uraninmolekül durchschnittlich benötigt, um den Laserfokus zu durchqueren, beträgt ca. 1,4 ms.

4.7.7.2 Plasmidbindung

FCS-Experimente wurden auch zur Bestimmung der Affinität zwischen Gyrase und DNA durchgeführt. GyrA oC T408C, das zuvor mit dem Fluorophor Alexa488 markiert wurde (Farbstoffkonzentration 4

nM), wurde zunächst 30 min bei RT und 75 μW mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$ bestrahlt. Die gemessene Donor-Autokorrelationskurve nimmt im Bereich von 10 μs bis 100 ms von ca. $G(\tau) = 1,11$ auf einen Endwert von 1,00 ab (Abb. 79 links). Der Graph lässt sich wiederum sehr schön mit einer $G(\tau)$ -Funktion beschreiben, was zu einer GyrA-Diffusionskonstante $D = 24,3 \pm 0,7 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ führt. Im zeitlichen Mittel befinden sich etwa 9 fluoreszierende Teilchen gleichzeitig im Fokus ($N = 9,2 \pm 0,1$). Bei dieser Auswertung wurden die bereits bekannten Ausmaße des konfokalen Volumens ($\omega_{xy} = 1,23 \mu\text{m}$ und $\omega_z = 0,43 \mu\text{m}$) fixiert, um die Anzahl der Freiheitsgrade zu verringern.

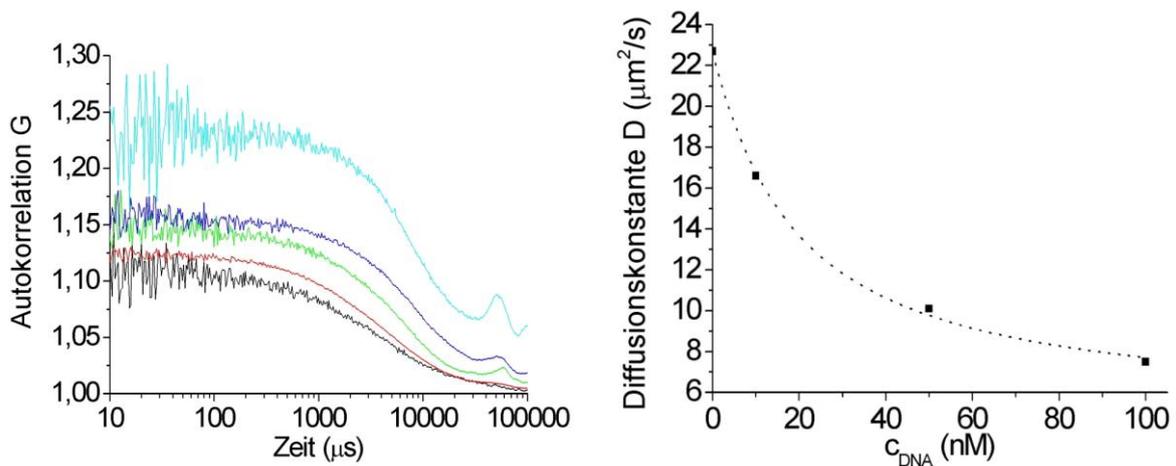


Abbildung 79: Bestimmung der Diffusionskonstante von Gyrase und DNA. Die Autokorrelation $G(\tau)$ von 4 nM GyrA oC T408C-Alexa488 wurde 30 min bei RT gemessen (linkes Bild; schwarze Kurve). Nach einer Zugabe von 1 μM GyrB WT (rot) und einer steigenden Menge an pUC18 (grün: 10 nM; dunkelblau: 50 nM; hellblau: 100 nM) wurde die Messung jeweils wiederholt. Aus der Analyse der $G(\tau)$ -Kurven ergibt sich eine Abnahme der Diffusionskonstante D bei konstanter Gyrase- und steigender DNA-Menge (rechtes Bild). Eine Kurvenanpassung mit einem einfachen Bindungsmodell führt zu einem minimalen D -Wert von $5,0 \pm 0,4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ im Sättigungsbereich sowie zu einer ungefähren Dissoziationskonstante K_D (Gyrase/pUC18) = $17,4 \pm 3,4 \text{ nM}$.

Bei einer anschließenden Zugabe von 1 μM GyrB WT und einer erneuten FCS-Messung nimmt die Diffusionskonstante etwas ab ($D = 22,7 \pm 0,2 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$; $N = 8,0 \pm 0,1$), da nun nicht mehr ein GyrA₂-Dimer, sondern tetramere Gyrase (A₂B₂) mit einem höheren Molekulargewicht vorliegt. Eine mehrstufige Zugabe von pUC18 (10, 50 bzw. 100 nM) führt zu einer deutlichen Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit bis auf etwa $D = 7,5 \pm 0,3 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, da der markierte Protein-Substrat-Komplex wegen der enormen Größe des DNA-Moleküls zunehmend retardiert wird. Gleichzeitig verringert sich die mittlere Teilchenanzahl im Anregungsfokus schrittweise auf einen Wert von $N = 4,2 \pm 0,1$. Bei den FCS-Messungen in Anwesenheit von pUC18 ist zu beachten, dass in der Autokorrelationskurve ein Nebenmaximum bei ca. $t = 50 - 60 \text{ ms}$ vorliegt, dessen Ursprung nicht genau geklärt werden konnte. Die DNA-haltigen Ansätze wurden daher nur bis zum Zeitpunkt $t = 30 \text{ ms}$ ausgewertet, um die Kurvenanpassung nicht durch den auftretenden Störeffekt zu erschweren. Die theoretische Diffusionszeit τ_D steigt während der Messreihe von 16 ms (GyrA) bzw. 17 ms (Gyrase) auf einen Wert von etwa 50 ms, der bei 100 nM pUC18 erreicht

wird. Dies ist auf die kontinuierliche Zunahme der Bildung des Protein-DNA-Komplexes zurückzuführen. Trägt man die Diffusionskonstante D in Abhängigkeit von der pUC18-Konzentration (0 – 100 nM) auf, so erhält man eine fallende Kurve, die in einen Sättigungsbereich übergeht und sich sehr gut mit einem einfachen Bindungsmodell beschreiben lässt (Abb. 79 rechts). Die Auswertung ergibt eine minimale Diffusionskonstante $D = 5,0 \pm 0,4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ bei vollständiger DNA-Sättigung und eine ungefähre Dissoziationskonstante K_D (Gyrase/pUC18) = $17,4 \pm 3,4$ nM bezogen auf die Plasmidkonzentration (bzw. $47 \pm 9 \mu\text{M}$ bezogen auf die Menge an Basenpaaren). Wegen der wahrscheinlich auftretenden Mehrfachbindung von Gyrase an einzelne Plasmidmoleküle gibt dieser Wert allerdings lediglich die Größenordnung der tatsächlichen Bindungskonstante an.

Normiert man die ermittelte Diffusionskonstante von GyrA₂ (184,2 kDa) auf 100 %, so erhält man für die Gyrase (327,2 kDa) einen Wert von 94 %, der bei vollständiger DNA-Sättigung (Molekulargewicht von pUC18: 1,75 MDa) auf 32 % absinkt. Theoretisch wird erwartet, dass die Diffusion mit dem Kehrwert der dritten Wurzel des Molekulargewichts skaliert⁸¹, was relativ gut mit den Messdaten übereinstimmt: Für A₂B₂ würde man folglich 83 % annehmen, während ein Protein-DNA-Komplex (2,08 MDa bei einer Einfachbindung bzw. ein höherer Wert bei einer Mehrfachbindung) eine Diffusionskonstante von maximal 44 % des Ausgangswertes aufweisen sollte.

5 Diskussion

5.1 Biochemische Charakterisierung

5.1.1 Reinigung der Untereinheiten

Die Herstellung der Gyrase wurde bezüglich Ausbeute, Reinheit und Einfachheit des Protokolls etabliert und optimiert. Für beide Untereinheiten sind nach dem Zellaufschluss nur zwei Chromatographiesäulen nötig, um das Produkt in hoher Qualität zu erhalten. Der *Microfluidizer* sorgt zunächst dafür, dass möglichst viel Protein aus den Zellen entnommen wird, wobei er den Ultraschallstab bezüglich Effektivität um etwa das Dreifache übertrifft. GyrA wird anschließend durch seine hohe Affinität zur Heparinsäule sehr erfolgreich von Kontaminanten getrennt und liegt bereits nach diesem Protokollschritt relativ rein vor. Gleichzeitig kann mit dieser Säule das hohe Probenvolumen unter Verwendung eines *Superloops* stark reduziert werden, nachdem eine Ammoniumsulfatfällung wegen Präzipitation des Proteins unmöglich ist. Mit derselben Säule kann auch die Untereinheit GyrB effektiv aus dem Rohextrakt absorbiert werden. In diesem Fall sorgt die vorgeschaltete DEAE-Säule für eine zusätzliche Trennung von DNA. Auf die Verwendung des *Superloops* kann bei GyrB verzichtet werden, da in diesem Fall eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung unter Beibehaltung des nativen Proteinzustands problemlos möglich ist. Weitere Behandlungen mit PEI oder Streptomycinsulfat brachten keine vollständige Trennung von DNA, so dass auf diese Schritte im Protokoll schließlich verzichtet wurde. Nach der Heparinbehandlung liegen beide Untereinheiten schon in über 90%iger Reinheit vor, die durch die anschließende Gelfiltration auf einen hervorragenden Endwert von etwa 98 – 99 % erhöht wird. Die Ausbeute von 6 – 8 mg Enzym pro Liter AIM – das in der Handhabung deutlich einfacher ist als LB-Medium – liegt im guten Bereich und stellt sicher, dass auch bei einem hohen experimentellen Proteinverbrauch nur selten eine Untereinheit neu gereinigt werden muss. Da auch beide Untereinheiten bei -80°C eine andauernde Stabilität aufweisen, kann man sich in der Regel auf die eigentlichen Problemstellungen des Projekts konzentrieren, ohne ständig mit zeitaufwändiger Proteinreinigung beschäftigt zu sein. Die Protokolle zur Herstellung der Gyrase wurden außerdem so konstruiert, dass zwei verschiedene Ansätze parallel gereinigt werden können, wodurch mehr Mutanten in kürzerer Zeit erzeugt wurden.

Die Verwendung von blauer Sepharose brachte keine Verbesserung der Reinheit bzw. führte dazu, dass GyrA nur unter Einsatz eines Denaturierungsmittels wieder von der Säule abgelöst werden konnte. Auf diesen chromatographischen Schritt wurde daher verzichtet. Ältere Reinigungsprotokolle aus der Literatur mit Novobiocin-Sepharose⁸³ weisen den Mangel auf, dass zur Gyraseelution eine hohe Harnstoffmenge nötig ist, was eventuell einen negativen Einfluss auf die Proteinaktivität haben könnte. Im Gegensatz dazu kommt das vorliegende Protokoll mit Heparin-Sepharose ganz ohne zeitweilige Denaturierung des

Enzyms aus. Außerdem erlaubt es eine getrennte Reinigung von GyrA und GyrB, die man später nach Bedarf in beliebigen Mischungsverhältnissen kombinieren kann, um die Funktionsweise der Gyrase zu untersuchen. Die Heparinsäulenmethode ist daher einem alternativen Reinigungsprotokoll aus der Literatur vorzuziehen, welches eine gemeinsame Reinigung beider Untereinheiten mittels *High-Q*-Säule und Phenyl-Sepharose vorsieht⁸⁴. Abgesehen von der dort beschriebenen mangelhaften Reinheit ist die Co-Herstellung von GyrA und GyrB äußerst unflexibel: Interaktionsstudien zwischen den beiden Untereinheiten wären z. B. mit dieser Vorgehensweise nicht möglich.

5.1.2 Rekonstitution der nativen Gyrase

Die native Gyrase lässt sich direkt durch einfaches Mischen der beiden Untereinheiten ohne weitere Inkubationszeit herstellen. Das Produkt zeigt alle typischen Aktivitäten einer funktionsfähigen bakteriellen Topoisomerase II: Negativ superspiralisiertes Plasmid wird vom vereinigten Enzym in Abwesenheit von Nukleotiden innerhalb von 1 – 2 h fast vollständig relaxiert. Der umgekehrte Prozess, die ATP-abhängige negative Superspiralisierung von relaxierten Plasmiden, läuft etwa zehnmal schneller ab, so dass das Gleichgewicht beider Reaktionen deutlich auf der Seite des nativen DNA-Zustands liegt. Mit Standard-Aktivitätstests lassen sich diese Funktionen ohne großen Arbeitsaufwand nachweisen. 2D-Experimente zeigen, dass die Gyrase aus *B. subtilis* nicht in der Lage ist, positive Superhelices in relaxierte DNA einzuführen – dabei handelt es sich um eine Eigenschaft, die ausschließlich der reversen Gyrase aus thermophilen Organismen vorbehalten bleibt⁴. Das untersuchte Enzym verhält sich in diesen Punkten also genauso wie der homologe Vertreter aus *E. coli*. Die *Bacillus*-Gyrase kann Plasmid-DNA bei RT genauso schnell modifizieren wie bei 37°C, was bei den niedrigen Bodentemperaturen, mit denen das Bakterium zu leben hat, auch notwendig ist. Dies ist wiederum günstig für spätere FRET-Versuche, da schon bei etwa 23°C die volle Aktivität des Enzyms vorliegt und eine aufwändige Temperierung der Küvette nicht erforderlich ist. Eine in manchen Versuchen erwünschte vollständige Deaktivierung der Gyrase ist durch eine SDS-/EDTA-Behandlung oder durch eine Hitzeinkubation bei 65°C möglich, ohne das Substrat zu schädigen oder topologisch zu modifizieren. Einzelne Untereinheiten sind nicht in der Lage, DNA zu topoisomerisieren, was ein Hinweis auf die Reinheit der beiden Proteinpräparationen ist.

Versuche mit einer analytischen Größenausschluss säule zeigen, dass es sich bei GyrA aus *Bacillus subtilis* im Grundzustand um ein stabiles Dimer handelt. Dagegen liegt die zweite Untereinheit GyrB über einen breiten Konzentrationsbereich (1 – 100 µM) hinweg vollständig als Monomer vor. GyrA₂ dient also offensichtlich als Grundgerüst für die Bildung des Tetramers A₂B₂, nachdem es in Kontakt mit GyrB tritt. Die ATPase-Untereinheit dimerisiert entweder in Anwesenheit von GyrA unter Bildung der funktionalen Gyrase oder alternativ ohne GyrA nach Zugabe eines geeigneten Nukleotids. Das entstehende GyrB₂ ist auch der Zustand, in dem die Untereinheit eine aktive ATPase ist. Ein Komplex aus GyrB und ATP ist

aber offenbar zu kurzlebig, um bei der analytischen Größenausschlusschromatographie ein sichtbares Signal zu erzeugen. Das nukleotidinduzierte transiente Dimer hydrolysiert das Substrat zu ADP und zerfällt anschließend unter Freisetzung der Spaltprodukte wieder in monomeres GyrB. Erst bei einer Verwendung des Analogons AMPPNP entsteht stabiles und in der Gelfiltration sichtbares GyrB₂, dessen Dissoziation durch das nicht-hydrolysierbare Substrat gehemmt ist. Röntgenstrukturaufnahmen mit dimerem GyrB wurden deswegen unter Zuhilfenahme desselben Nukleotidanalogs angefertigt⁶. Die Rekonstitution der nativen tetrameren Gyrase aus den Untereinheiten kann ebenfalls recht gut mit analytischer Größenausschlusschromatographie demonstriert werden: Nach der Vermischung von GyrA mit GyrB liegt ein Objekt vor, das schneller durch die S200-Säule wandert als ein Dimer aus GyrA. Das Elutionsvolumen dieser Komponente ist im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Molekulargewicht eines Tetramers vereinbar. Gut sichtbar ist die Interaktion beider Untereinheiten an der Tatsache, dass bei zunehmender GyrA-Menge im Ansatz das Monomersignal von GyrB immer kleiner wird. AUZ-Experimente, die eine wesentlich genauere Ermittlung des Molekulargewichts auch dann ermöglichen, wenn das Protein stark von der idealen Kugelform abweicht, bestätigen die Gelfiltrationsergebnisse. Diese Messungen zeigen, dass GyrA in GyrB-Abwesenheit als Dimer vorliegt und nach der Vereinigung beider Komponenten (zumindest teilweise) A₂B₂ entsteht. Das oligomere Verhalten und die Nicht-Globularität der Untereinheiten (aus *E. coli*) wurden bereits in früheren AUZ-Versuchen beschrieben^{16,17}.

Das untersuchte Enzym aus *B. subtilis* verhält sich also bezüglich Oligomerisierung sowie DNA-Topoisomerisierungsaktivität genauso wie sein homologes Gegenstück aus *E. coli*³¹. Die Ergebnisse bestätigen das bekannte Modell einer prokaryotischen Gyrase, bei der das aktive Heterotetramer aus einem GyrA-Dimer sowie aus zwei GyrB-Monomeren zusammengesetzt werden kann.

5.1.3 Charakterisierung der ATPase-Aktivität

5.1.3.1 GyrB als DNA-abhängige ATPase

Die ATPase-Aktivität von GyrB aus *B. subtilis* wurde in zahlreichen Experimenten eingehend untersucht. Zunächst wurde festgestellt, dass die aktive Form der Untereinheit ein Dimer ist, was auch schon bei *E. coli* beobachtet wurde¹⁸. In einem GyrB-abhängigen ATPase-Test steigt die Reaktionsgeschwindigkeit daher nicht linear mit der Enzymkonzentration, sondern kurvenförmig. Bei einer höheren Proteinmenge im Ansatz bilden sich entsprechend eher GyrB₂-Dimere im Komplex mit zwei ATP-Molekülen. Wie bereits in 5.1.2 erwähnt, ist dieser Zustand nur kurzlebig, da er nach der Nukleotidfreisetzung wieder in Monomere zerfällt. Die intrinsische ATPase-Rate von GyrB ist relativ gering – so wird z. B. die Spaltung von 5 mM ATP in Anwesenheit von 100 nM GyrB WT nur zu einem Viertel vom Enzym und zu drei Viertel durch ATP-Spontanhydrolyse verursacht.

Die volle Leistungsfähigkeit der ATPase wird bei sättigenden Konzentrationen von GyrA WT sowie DNA erreicht. Nur einer der beiden Bindungspartner allein hat noch keinen positiven Einfluss auf die ATP-Hydrolyse durch GyrB. Liegt dagegen eine ausreichend hohe Menge an nativer Plasmid-DNA vor, kann die Umsatzzahl k_{cat} der ATPase-Reaktion bei voller GyrA-Sättigung bis auf einen Maximalwert von etwa $0,55 \text{ s}^{-1}$ angehoben werden. Dies entspricht ungefähr der 60fachen intrinsischen Aktivität von 100 nM GyrB, was diejenige Konzentration ist, die für ssATPase-Tests eingesetzt wurde. Die Formierung der tetrameren Gyrase sowie die Bindung von negativ superspiralisierter Plasmid-DNA führen wohl zu einer Konformationsänderung des GyrB-Dimers, die eine deutliche Erhöhung der ATP-Spaltungsrate um fast zwei Größenordnungen auslöst. Das Nukleotid nähert sich in der aktiven Enzymstruktur offenbar an diejenigen Aminosäuren an, die für die spezifische Reaktion zuständig sind. Es ist bemerkenswert, dass die starke ATPase-Induktion in GyrB erst dann eintritt, wenn ein DNA-Ligand mit der anderen Untereinheit GyrA interagiert, was die Komplexität des Funktionsmechanismus der Gyrase aufzeigt. In drei verschiedenen Versuchsreihen mit GyrB, GyrA, ATP und DNA wurden die Michaelis-Menten-Konstante K_M (GyrB/ATP) sowie die apparenten K_M -Werte für DNA und GyrA gemessen. Dabei wurden neben 100 nM GyrB WT zwei der Liganden jeweils in einer konstanten Menge im sättigenden Bereich eingesetzt und der dritte Parameter variiert. Gleichartige k_{cat} -Werte in allen drei Messreihen beweisen, dass die Ergebnisse konsistent sind. Der K_M (GyrB/ATP) = 0,96 mM für *B. subtilis* liegt in derselben Größenordnung wie bei den nah verwandten Gyrasen aus *E. coli* (0,30 mM³¹ bzw. 0,50 mM⁸⁵) oder aus *Mycobacterium smegmatis* (0,68 mM⁸⁶). Auch bei einigen eukaryotischen Topo-II-Vertretern aus der Hefe (0,13 mM⁴²) bzw. aus *Drosophila* (0,28 mM⁸⁷) wurden vergleichbare K_M -Werte für ATP gemessen.

Der apparente K_M -Wert für GyrA WT liegt bei 61 nM und bei einem fünffachen Überschuss dieser Untereinheit gegenüber GyrB kann von einer Sättigung gesprochen werden. Interessant ist die Abhängigkeit der ATPase-Rate von DNA: Der K_M -Wert beträgt in diesem Fall 6,1 μM pro Basenpaare, was allerdings nur für natives, d. h. negativ superspiralisiertes Plasmid gilt. Dabei spielt es keine Rolle, ob eine zufällige Basenanordnung vorliegt, oder ob ein modifizierter DNA-Ligand mit einer spezifischen Konsensussequenz⁴⁷ für Gyrase aus *B. subtilis* verwendet wird. Die eingefügte Bindestelle hat weder einen Einfluss auf die Umsatzzahl noch auf die Michaelis-Menten-Konstante der ATPase-Reaktion. Es ist somit fraglich, inwieweit man tatsächlich von einer Spezifität der besagten Sequenz für *Bacillus*-Gyrase sprechen kann. In weiteren Experimenten im Projektverlauf wurde daher negativ superspiralisiertes pUC18 ohne Modifikation eingesetzt. Verwendet man lineare oder relaxierte DNA, so führt diese zwar ebenfalls zu einer Stimulation der ATPase-Aktivität von GyrB, allerdings fällt diese im Vergleich zu nativem pUC18 deutlich geringer aus. Ein gewisser Grad an Superspiralisierung ist also erforderlich, um die Nukleotidspaltung deutlich zu induzieren. Dies erscheint auch naheliegend, da Plasmide mit hohen negativen Windungszahlen die natürlichen Substrate der Gyrase *in vivo* sind. Es ist daher anzunehmen, dass sich die Enzymstruktur auf diese DNA-Liganden spezialisiert hat.

GyrB aus *Bacillus subtilis* ist also eine DNA-abhängige ATPase, worin sie sich nicht von homologen Vertretern aus anderen Organismen unterscheidet. Die Maximalgeschwindigkeit der Hydrolyse mit einer Umsatzzahl von $0,55 \text{ s}^{-1}$ liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie die Werte aus *Mycobacterium* ($0,39 \text{ s}^{-1}$)⁸⁶, aus eukaryotischen Systemen^{42,87} sowie aus *E. coli*²⁰ (zwischen $0,7$ und $1,4 \text{ s}^{-1}$). Ein Nukleotidzyklus mit einer Dauer im Sekundenbereich ist also ausreichend, damit die Gyrase ihre ATP-abhängigen DNA-Modifikationsaufgaben in der Zelle gut wahrnehmen kann. Topoisomerisierung ist außerdem ein sehr komplexer Prozess, der möglicherweise nicht über diese Geschwindigkeit hinaus beschleunigt werden kann, so dass eine weitergehende Stimulation durch DNA nicht erforderlich ist. Der apparente K_M -Wert für Plasmid ($6,1 \mu\text{M}$ pro Basenpaare) ist sogar vergleichsweise niedrig: Bei *E. coli* wurde für verschiedene DNA-Substrate ein Bereich von $0,21 - 0,5 \text{ mM}$ ^{20,22,85} gemessen. Im Gegensatz dazu beträgt der Wert in *Saccharomyces* $5 \mu\text{M}$ ⁴², so dass die *Bacillus*-Gyrase an dieser Stelle näher beim eukaryotischen homodimeren Topo-II-Enzym als beim heterotetrameren Vertreter aus *Escherichia* liegt.

5.1.3.2 Nicht-kooperatives Verhalten

In Experimenten mit der Gyrase aus *E. coli* wurde festgestellt, dass die beiden ATP- und DNA-Bindestellen in GyrB Kooperativität zeigen^{20,88}. Gleiches gilt auch für den eukaryotischen Topo-II-Vertreter aus *Saccharomyces*^{42,82}. Die Bindung eines Nukleotids an die erste Position erleichtert also in diesen Fällen die Anlagerung des zweiten ATP-Moleküls an die gegenüberliegende Seite. Im Gegensatz dazu wurden bei der Gyrase aus *B. subtilis* keine Anzeichen für kooperatives Verhalten festgestellt. Analysiert man die gemessenen ATPase-Daten unter Verwendung eines Kooperativitätsparameters oder mit der Hill-Gleichung, so erhält man keine bessere Kurvenanpassung als mit einer einfachen Michaelis-Menten-Funktion. Beide Parameter (r bzw. n) liegen in allen Experimenten sehr nahe beim Wert $1,00$, d. h. die Bindung des ersten ATP übt keinen Einfluss auf die Affinität des zweiten Nukleotids aus. In ATPase-Tests mit sehr niedrigen Substratmengen sind entsprechend quasi-lineare Abhängigkeiten der Reaktionsgeschwindigkeit von der ATP- bzw. DNA-Konzentration feststellbar, die bei einer weiteren Zugabe des Liganden in Sättigungskurven übergehen. Ein sigmoidales Verhalten, d. h. ein Verlauf mit einer Verzögerungsphase bei niedrigen Substratmengen, trat in keiner Messung auf.

Um das Verhalten der *Bacillus*-Gyrase direkt mit der in der Literatur beschriebenen Kooperativität der homologen Enzyme aus der Hefe bzw. aus *E. coli* zu vergleichen, wurde ein modifizierter ATPase-Test unter sehr ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde die Lösung verwendet, in der die *Escherichia*-Gyrase ein deutliches kooperatives Verhalten gezeigt hat²⁰. Beim eingesetzten Liganden handelt es sich um ein 60-bp-dsDNA -Fragment mit einer spezifischen Bindestelle, das mit den Substraten aus den *Saccharomyces*-Tests vergleichbar ist⁸². Die Messungen mit *Bacillus*-Gyrase ergaben sowohl im DNA- als auch im ATP-abhängigen ATPase-Test typische Michaelis-Menten-Sättigungskurven ohne

erkennbare Verzögerungsphase. Unter gleichen Bedingungen zeigen die Enzyme aus *E. coli* bzw. aus der Hefe sigmoidale Abhängigkeiten – das nicht-kooperative Verhalten in *Bacillus* ist also eine tatsächliche Eigenschaft des Enzyms und nicht etwa auf unterschiedliche Pufferbedingungen zurückzuführen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kooperativität keine notwendige Voraussetzung für eine effektive DNA-Topoisomerisierung durch die bakterielle Gyrase ist.

Vergleicht man GyrB aus *B. subtilis* mit anderen Vertretern der sogenannten GHKL-Superfamilie¹⁹, so findet man eine interessante Gemeinsamkeit: Das humane Chaperon Hsp90 weist ebenfalls kein kooperatives Verhalten zwischen seinen beiden ATP-Bindestellen auf⁸⁹. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Mitglieder der GHKL-Klasse – auch zwischen verschiedenen Organismen – ATP auf unterschiedliche Art und Weise behandeln und dass Kooperativität für diese Proteine nicht zwingend notwendig ist, um ihre jeweilige Funktion auszuführen.

5.1.3.3 Ratenkonstanten im Nukleotidzyklus

Die Gyrase aus *E. coli* war die einzige bakterielle Topo II, deren Nukleotidzyklus bislang Schritt für Schritt eingehend untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die Dissoziation der Spaltprodukte ADP bzw. Phosphat vom Enzym die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion ist^{18,24}. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass dies für GyrB aus *B. subtilis* nicht zutrifft: Die ADP-Freisetzung verläuft hier mit einer hohen Ratenkonstante ($k = 24,0 \text{ s}^{-1}$) und somit wesentlich schneller als die maximale ATP-Spaltung in ssATPase-Tests, bei denen die Umsatzzahl k_{cat} bei etwa $0,55 \text{ s}^{-1}$ liegt. Der k -Wert stammt aus einer *Stopped-Flow*-Messung mit dem fluoreszierenden Analogon mantADP, nachdem manuelle Mischungsexperimente kein vernünftiges Ergebnis brachten. Die Dissoziation der Produkte kann also als geschwindigkeitsbestimmender Schritt im Nukleotidzyklus von *Bacillus* ausgeschlossen werden. *Single-turnover*-ATPase-Tests ergaben für die Hydrolyse den Wert $k = 0,023 \text{ s}^{-1}$, der drei Größenordnungen unter der ADP-Dissoziationsrate liegt. Dieser stATPase-Wert reflektiert im Gegensatz zu den Ergebnissen aus *Steady-state*-Tests die tatsächliche Geschwindigkeit der Hydrolyse und wird nicht durch weitere Vorgänge im Reaktionszyklus beeinflusst. Die *single-turnover*-Ratenkonstante liegt im gleichen Bereich wie die Umsatzzahlen aus ssATPase-Tests in Abwesenheit von GyrA bzw. DNA ($0,006 - 0,039 \text{ s}^{-1}$) und etabliert daher die Spaltung von ATP als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Gyrase von *B. subtilis*. Die Produktdissoziation oder der Zerfall des GyrB₂-Dimers können dagegen keinen nennenswerten Einfluss auf die Gesamtdauer der Reaktion haben, da in diesem Fall die Ratenkonstante aus dem stATPase-Test deutlich höher wäre als die *steady-state*-Umsatzzahl. Leider war es nicht möglich, die vorliegenden ATPase-Ergebnisse mit einem komplexen Bindungsmodell¹⁸ anzupassen, das sämtliche Schritte von der reversiblen ATP-Bindung über die GyrB-Dimerisierung bis hin zur Hydrolyse und ADP-Dissoziation in sich vereinigt hätte. Bei einer Konvergenz dieser Analyse wären neben den

ATP-Spaltungs- und Freisetzungsgeschwindigkeiten auch alle anderen auftretenden Ratenkonstanten im Nukleotidzyklus direkt bekannt gewesen.

Die Kinetik der Abfolge der Nukleotidbehandlung ist ein weiterer Punkt, in dem sich *Bacillus*-GyrB von eng verwandten Enzymen unterscheidet. Sowohl bei der homologen Gyrase aus *E. coli*^{18,24} als auch bei der eukaryotischen Topo II aus Hefe⁹⁰ läuft die Hydrolyse deutlich schneller ab als die Dissoziation der Spaltprodukte. Betrachtet man allerdings die anderen Vertreter aus der GHKL-Superfamilie¹⁹, so zeigt sich, dass *Bacillus* nicht allein ist: Beim humanen Chaperon Hsp90 wurde die ATP-Spaltung ebenso als geschwindigkeitsbestimmender Schritt des Reaktionszyklus identifiziert⁹¹. Dagegen ist beim DNA-Reparaturenzym MutL aus *E. coli* die Dimerisierung der Untereinheiten der langsamste Schritt⁹². Die einzelnen GHKL-Mitglieder, deren kennzeichnendes Merkmal eine charakteristische Faltung der ATP-Bindedomäne ist, weisen also nicht nur bezüglich Kooperativität, sondern auch in der Kinetik der Nukleotidspaltung Unterschiede auf. Dennoch wird ATP von allen GHKL-Enzymen jeweils nach einer nukleotidinduzierten Dimerisierung der ATPase-Untereinheit effektiv gespalten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die biochemische Aktivität von Topoisomerasen nicht vom ratenbestimmenden Schritt im Nukleotidzyklus abhängig ist.

Die homologen Gyrase-Vertreter besitzen eine gleichartige Architektur und grundlegende Prinzipien sind bei dieser Stoffklasse konserviert. Die feinen strukturellen Unterschiede führen jedoch zu Abweichungen in mechanistischen Details, beispielsweise beim ratenbestimmenden Schritt im Nukleotidzyklus oder bei der Kooperativität der ATP-Bindestellen. Es stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen diesen Unterschieden und der Tatsache vorliegt, dass *E. coli* ein gram-negatives und *Bacillus* ein -positives Bakterium ist. Um dies zu klären, wären detaillierte Untersuchungen der Gyrasen aus einigen weiteren Organismen notwendig, die man anschließend mit den bereits bekannten Enzymeigenschaften aus *E. coli* und nun auch aus *B. subtilis* vergleichen könnte. Zumindest sind alle diese Proteine trotz ihrer mechanistischen Unterschiede gleichermaßen in der Lage, ATP-Spaltung und DNA-Topoisomerisierung miteinander zu koppeln. Gyrasen aus verschiedenen Organismen lösen dieselbe zelluläre Aufgabe – die Aufrechterhaltung einer bestimmten DNA-Superspiralisierung – auf unterschiedliche Art und Weise, aber mit einer vergleichbaren Effektivität.

5.1.4 Bindungseigenschaften der Gyrase

5.1.4.1 Affinität zu Nukleotiden

Die Bindung der ATPase GyrB an Nukleotide wurde durch eine Reihe von Fluoreszenztitrationen mit dem Analogon mantADP charakterisiert. Diese Substanz eignet sich hervorragend für Affinitätstests mit

Gyrase, da die Anwesenheit der fluorophoren Gruppe keinen negativen Einfluss auf die Bindung an das Enzym ausübt. Verdrängungstitrationen ergeben grundsätzlich nahezu identische Dissoziationskonstanten für ADP und für das signalgebende Analogon: In Messreihen mit reinem GyrB – in Abwesenheit von GyrA und DNA – wurde ein K_D (GyrB/ADP) von etwa 37 μM ermittelt, der mit dem mantADP -Wert (40 μM) übereinstimmt. Die vollständige Verdrängung des Analogons durch ADP bestätigt außerdem, dass sich mantADP direkt an die ATP-Bindetasche anlagert und keine weiteren unspezifischen Interaktionen mit GyrB eingeht. ADP bindet etwas besser an die *Bacillus*-Gyrase als an den eukaryotischen Topo-II-Vertreter aus *Drosophila* (120 μM)⁸⁷ bzw. an das menschliche Protein (130 μM)⁹³. In Anwesenheit von äquimolaren GyrA-Mengen bleibt die Affinität des *Bacillus*-Enzyms zu ADP konstant ($K_D = 34 \mu\text{M}$), d. h. das Monomer GyrB bindet Nukleotide genauso fest wie die tetramere Gyrase. Gleiches gilt auch dann, wenn hohe Mengen an Plasmid-DNA im Ansatz vorhanden sind, wie eine Einzelpunkttitration in einem Mikrotiterplattenlesegerät ergeben hat. Der dort ermittelte K_D -Wert von 44 μM ist zwar aufgrund der hohen Messungenauigkeiten nicht besonders aussagekräftig, deutet aber trotzdem darauf hin, dass auch die pUC18-Anwesenheit die Nukleotidaffinität von GyrB nicht beeinflusst. Die Bindung von superspiralierter DNA an Gyrase erhöht zwar die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung um ein Vielfaches, hat aber keinen Einfluss auf die vorherige Bildung des GyrB-Nukleotid-Komplexes.

Bei Fluoreszenzverdrängungstitrationen mit ATP tritt das Problem auf, dass das Nukleotid während der zwei- bis dreistündigen Messreihe enzymatisch zu ADP gespalten wird, wodurch das Ergebnis verfälscht wird. Die gemessenen Bindungskonstanten von reinem GyrB (75 μM) bzw. nach Zugabe von GyrA (65 μM) sind daher nur als eine Untergrenze des tatsächlichen K_D -Wertes aufzufassen. Eine verlässlichere Bestimmung der gesuchten Dissoziationskonstante ist mit einer globalen Kurvenanpassung einer Serie von ssATPase-Tests mit einem einfachen Bindungsmodell möglich. Die Daten liefern einen K_D (GyrB/ATP) = 0,71 mM, der direkt die Bindung des Nukleotids an das aktive Zentrum des Enzyms reflektiert. Dieses Ergebnis liegt eine Größenordnung über einer Literaturangabe für Gyrase aus *E. coli* ($k_{-1}/k_{+1} = 70 \mu\text{M}$)¹⁸. Ermittelt wurde dieser Vergleichswert aus einer Serie von ATPase-Daten durch eine globale Kurvenanpassung mit einem komplexen Bindungsmodell, das neben der Hydrolyse und der Produktfreisetzung auch die Dimerisierung von GyrB beinhaltet. Da genau dieses komplizierte Schema mit den vorliegenden *Bacillus*-Daten zu keiner Konvergenz geführt hat, ist davon auszugehen, dass es sich beim Literaturwert für *E. coli* (70 μM) lediglich um eine Näherung handelt. Der K_D -Wert von ATP und *Bacillus*-Gyrase (0,71 mM) stimmt im Rahmen der Genauigkeit mit der Michaelis-Menten-Konstante aus einer ATP-abhängigen ssATPase-Testreihe (0,96 mM) überein. Aus der Äquivalenz des K_M - und des K_D -Wertes lässt sich direkt ablesen, dass die Hydrolyse wesentlich langsamer abläuft als die vorherige Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Tatsache, dass die ATP-Spaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Nukleotidzyklus der Gyrase aus *B. subtilis* ist. Da der beschriebene K_M -Wert bei GyrA- und pUC18-Sättigung gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass

die ATP-Dissoziationskonstante von monomerem GyrB und von A₂B₂ – sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DNA – unverändert bleibt.

ADP ist also etwa 20mal affiner zu *Bacillus*-GyrB als ATP. Dies erscheint zunächst verwunderlich, da ATP das eigentliche energieliefernde Substrat des Enzyms ist, damit dieses seine zellulären DNA-Modifikationsaufgaben wahrnehmen kann. Die ATP-Konzentration *in vivo* (ca. 3 mM)⁹⁴ ist allerdings etwa viermal höher als die gemessene ATP-Bindungskonstante, so dass die Gyrase gut mit notwendiger Energie versorgt ist. Der K_D (GyrB/ADP) aus den Fluoreszenztitrationen liegt dagegen im Bereich der zellulären ADP-Konzentration, d. h. bei ATP handelt es sich um das bevorzugte Substrat von GyrB aus *B. subtilis*. Sowohl GyrA als auch DNA sind nicht in der Lage, die Affinität des Enzyms zu beiden Nukleotiden positiv oder negativ zu beeinflussen.

5.1.4.2 Affinität zu DNA

Die Affinität von Gyrase zu DNA wurde auf drei unterschiedliche Arten bestimmt. GEMSA-Experimente ergeben für die Bindung von GyrA an ein 94-bp-dsDNA-Substrat eine Dissoziationskonstante K_D (GyrA/bp) = 94 μM bezogen auf die Menge an Basenpaaren. Dieser Wert ist jedoch wegen der manuellen Intensitätsablesung sowie auftretendem Bandenschmier mit einer bestimmten Unsicherheit behaftet. Tests mit superspiralisiertem oder linearisiertem pUC18 sind zur K_D-Bestimmung ungeeignet, da das Substrat auf dem Gelfoto ein Bandenmuster erzeugt bzw. da eine Mehrfachbindung von Gyrase an das 2686-bp-Plasmid auftritt. Bei FCS-Messungen mit pUC18 ist ebenfalls mit einer solchen multiplen Bindung von mehreren Proteinmolekülen an das Substrat zu rechnen. Dieser Effekt verfälscht das Ergebnis – das bei der Auswertung zugrundeliegende 1:1-Bindungsmodell geht davon aus, dass ein Ligand nur mit exakt einem Enzym eine Bindung eingeht. Der Messwert gibt somit bestenfalls die Größenordnung der tatsächlichen Bindungskonstante an. Die FCS-Experimente mit einzelmarkiertem GyrA und pUC18 liefern einen K_D (GyrA/bp) = 47 μM bezogen auf die Konzentration an Basenpaaren, d. h. einen etwas niedrigeren Wert als die GEMSA-Tests. Vor allem aber zeigen diese Messungen sehr klar, dass das Protein mit der DNA interagiert; und dass seine Diffusion durch die Anlagerung an das etwa fünfmal schwerere Plasmid deutlich gebremst wird. Eine Anisotropietitration mit einem fluoreszierenden 94-bp-dsDNA-Substrat ergibt einen K_D (GyrA/bp) von 470 μM bezogen auf die Menge an Basenpaaren, der über den Werten aus den anderen beiden Experimenten liegt. Allerdings hat die Verwendung eines kurzen Oligofragments den Vorteil, dass GyrA nur einfach an dieses Substrat bindet. 94 Basenpaare sind vermutlich zu kurz, um Platz für viele Proteinmoleküle zu bieten. In der Literatur ist von 140 bp pro Enzymmolekül die Rede²⁹, so dass hier die Annahme eines 1:1-Bindungsmodells gerechtfertigt ist. Nur bei einem sehr hohen Proteinüberschuss gegenüber dem Oligonukleotid kann es zu einer Doppelbindung kommen, wie einzelne Gelverschiebungstests andeuten.

Der K_D (GyrA/bp) = 470 μM kann näherungsweise zu einer Bindungskonstante für das gesamte Plasmid pUC18 (2686 bp) umgerechnet werden (0,175 μM). Für die *E. coli*-Gyrase wurde allerdings ein K_D (*E. coli* GyrA/ColE1) im Bereich von 0,2 nM mit Nitrocellulosefilterexperimenten bestimmt⁹⁵. Das dort verwendete linearisierte ColE1-Plasmid hat eine Länge von 6646 bp, so dass sich ein Basenpaar- K_D von ca. 1,3 μM ergibt. Ähnliche Studien mit einem 171-bp-Fragment ergaben eine vergleichbar niedrige Konstante K_D (*E. coli* GyrA/171-bp-dsDNA) = 0,54 nM²⁰. Die DNA-Affinität von *Bacillus*-Gyrase ist also offenbar deutlich schwächer als diejenige des *Escherichia*-Enzyms. GEMSA-Studien mit einem 240-bp-Fragment und der Gyrase aus *Mycobacterium smegmatis* lieferten eine Bindungskonstante von 9,2 nM⁸⁶ (d. h. 2,2 μM bezogen auf die Menge an Basenpaaren). Für die *Escherichia*- bzw. *Mycobacterium*-Experimente wurde allerdings A_2B_2 eingesetzt, während die *Bacillus*-Anisotropietitrationen mit GyrA in Abwesenheit von GyrB durchgeführt wurden. Es besteht also die Möglichkeit, dass die Affinität von GyrA zu DNA zunimmt, wenn es zusammen mit der anderen Untereinheit die tetramere Gyraseform bildet. Dies ist möglicherweise eine Erklärung für die etwas niedrigere Bindungskonstante aus den FCS-Messungen (47 μM bezogen auf die bp-Konzentration), bei denen GyrB im Ansatz enthalten war. Doch auch dieser Wert zeigt, dass die DNA-Affinität von *Bacillus*-Gyrase deutlich geringer ist als diejenige von verwandten Enzymen aus anderen prokaryotischen Organismen. Auch die Anwesenheit von GyrB, das eventuell die DNA-Bindung erleichtern könnte, kann daran nichts ändern. Für ein DNA-Bindemotiv der humanen Topoisomerase II wird interessanterweise ein K_D (Topo II/40-bp-dsDNA) von 0,3 μM berichtet⁹⁶ (d. h. K_D (Topo II/bp) = 12 μM). Dieser Wert aus GEMSA- und Anisotropiestudien liegt näher bei den Ergebnissen aus den *Bacillus*-Experimenten. Das Enzym aus *B. subtilis* ist also, was die Interaktion mit DNA betrifft, eher mit eukaryotischen Topoisomerasen als mit homologen bakteriellen Vertretern vergleichbar. Der ungünstige K_D -Wert bedeutet für smFRET-Experimente mit *Bacillus*-Gyrase, dass eine hohe Menge an Plasmid eingesetzt werden muss, um bei der picomolaren Proteinkonzentration eine brauchbare Substratsättigung des Enzyms sicherzustellen. So sind mindestens 150 nM pUC18 erforderlich, damit etwa die Hälfte des markierten GyrA in den Einzelmolekülmessungen substratgebunden vorliegt.

Gyrase aus *B. subtilis* ist trotz der geringen DNA-Affinität zu einer effektiven Plasmidtopoisomerisierung in der Zelle fähig. Der niedrige apparente K_M -Wert für DNA sorgt dafür, dass die energieliefernde ATP-Hydrolyse auch schon bei einer niedrigen pUC18-Konzentration stark beschleunigt wird. In *E. coli* wird der hohe K_M -Wert dagegen offenbar durch eine äußerst günstige Dissoziationskonstante ausgeglichen, so dass hier zwei verschiedene Ansätze vorliegen, um die gleiche Aufgabe *in vivo* zu lösen. Möglicherweise hängen diese Unterschiede damit zusammen, dass *Escherichia* gram-negativ und *Bacillus* gram-positiv ist, aber zur Klärung dieses Zusammenhangs müssten weitere Topoisomerasen aus anderen Bakterienarten untersucht werden. Die verwandten Gyrasen aus *E. coli* und *B. subtilis* weisen eine Reihe von mechanistischen Unterschieden auf, was beweist, dass es sich lohnt, homologe Enzyme zu

untersuchen und miteinander zu vergleichen. Wenn ein Protein aus einem Organismus gründlich charakterisiert wurde, so kann man sich noch lange nicht sicher sein, dass sich das gleichartige Enzym aus einem anderen Bakterium genauso verhält.

5.1.4.3 Bindung von GyrA an GyrB

Die Affinität zwischen GyrA und GyrB wurde zunächst durch analytische Gelfiltration untersucht, wobei eine Oligomerisierung festgestellt wurde. Wegen der Nicht-Globularität der Gyrase und der folglich ungenauen Bestimmung des Molekulargewichts kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden, ob ausschließlich Tetramere oder auch andere Komponenten gebildet werden. AUZ-Experimente deuten auf die Existenz zweier Spezies hin: GyrA und GyrB können demnach entweder die vollständige tetramere Gyrase bilden oder alternativ ein A_2B -Trimer formen. Die Affinität von monomerem GyrB zu einem $GyrA_2$ -Dimer ist somit höher als zu sich selbst. Ein solcher A_2B -Komplex wurde zuerst in Dimethylsuberimidat-Verknüpfungsexperimenten mit der Gyrase aus *Micrococcus luteus* beschrieben²⁹. In der vorliegenden Arbeit über *B. subtilis* wird die Existenz des A_2B -Trimers erstmals nachgewiesen und quantifiziert. Die Rolle dieser Spezies *in vivo* ist unklar, aber es ist davon auszugehen, dass diese Form keine biochemische Aktivität besitzt und nur eine Zwischenstufe der Oligomerisierung von GyrA und GyrB ist. In *E. coli*-Studien wurde zwar festgestellt, dass Gyrase auch dann zu einer eingeschränkten Superspiralisierung von Plasmiden in der Lage ist, wenn eine der beiden ATPase-Untereinheiten durch eine zielgerichtete Mutation inaktiviert wurde⁹⁷. Allerdings liegt in diesem Fall ein vollständiger tetramerer A_2B_2 -Komplex mit zwei gebundenen Nukleotiden vor, von denen lediglich eines gespalten werden kann. Es ist anzunehmen, dass sich diese Beobachtung nicht auf trimere Komplexe übertragen lässt. Die für die Topoisomerisierung notwendige enzymatische Konformationsdynamik kann vermutlich nur dann stattfinden, wenn alle vier Untereinheiten vorliegen und sich in beiden ATP-Bindetaschen jeweils ein Nukleotid befindet. A_2B ist wahrscheinlich eine inaktive Form, deren Bildung *in vivo* aufgrund der Interaktionsverhältnisse zwischen GyrA und GyrB unvermeidlich ist. Die Trimerpopulation braucht einen bestimmten Anteil der zellulären Gyrase-Untereinheiten auf, die folglich nicht als Tetramer vorliegen und für eine DNA-Topoisomerisierung nicht zur Verfügung stehen. Es handelt sich dabei allerdings um ein dynamisches System aus Assoziation, gegenseitiger Umwandlung und Zerfall der beiden oligomeren Komponenten. Dies bedeutet auch, dass der reine Trimerzustand nicht isolierbar ist, so dass eine individuelle Untersuchung seiner Eigenschaften bzw. seiner fraglichen Aktivität kaum durchführbar ist.

Eine hervorragende Quantifizierung der Oligomerisierung war mit einer Serie von Anisotropietitrationen mit markiertem GyrB C414S möglich, das eine WT-artige Aktivität besitzt. Die Daten konvergieren in einer globalen Kurvenanpassung mit einem geeigneten Bindungsmodell zu $K_{D1} = 1,26 \mu\text{M}$ für die

Anlagerung des monomeren GyrB an ein GyrA₂-Dimer sowie $K_{D2} = 0,018 \mu\text{M}$ für die anschließende Tetramerbildung. Für diese Ergebnisse sind in der Literatur noch keine Vergleichswerte aus anderen Organismen erhältlich. In einer Kontroll-Verdrängungstitration mit einem Überschuss an unmarkiertem GyrB WT ergeben sich nahezu identische Dissoziationskonstanten. Der oligomere Zustand wird also weder durch die Cysteinmutation noch durch die kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit dem Protein beeinträchtigt. Die zweite ATPase-Untereinheit bindet etwa 60 – 70mal besser an GyrA₂ als die erste, d. h. der aktive Tetramierzustand ist die klar bevorzugte Spezies. Trimere tendieren dagegen zu einer Aufnahme eines weiteren GyrB unter Bildung von A₂B₂ oder alternativ zu einem Zerfall in die Grundbausteine GyrA₂ und GyrB. Die konsistenten Ergebnisse aus den Anisotropietitrationen stimmen mit den AUZ-Studien überein: Liegen beide Untereinheiten in einer 1:1-Stöchiometrie vor, so wird (abhängig von der Konzentration) hauptsächlich der tetramere Zustand detektiert. Bei einem drei- oder vierfachen GyrA-Überschuss nimmt der A₂B-Anteil dagegen erwartungsgemäß zu. Trimere werden also bevorzugt in einer Mischung gebildet, in der deutlich mehr GyrA als GyrB vorliegt.

Die mechanistischen Eigenschaften der Gyrase aus *Bacillus subtilis* wurden in der vorliegenden Arbeit gründlich und weitgehend untersucht. Neben der Affinität zu Nukleotiden und DNA wurde auch die Interaktion zwischen beiden Untereinheiten betrachtet, so dass nun alle relevanten Michaelis-Menten- bzw. Bindungskonstanten für dieses Enzym bekannt sind. Diese Informationen sind für aussagekräftige Einzelmolekül-FRET-Studien von großer Bedeutung: Nur wenn genaue quantitative Angaben zur Affinität der Bindungspartner vorliegen, können die Konzentrationen der Komponenten in der smFRET-Messung optimal eingestellt werden, um mit möglichst wenig Material eine gute Interaktion zu erreichen. Andernfalls wäre entweder die Hintergrundzählrate durch fluoreszierende Kontaminanten zu hoch oder die Enzym-Substrat-Sättigung zu niedrig. Die beiden K_D -Werte aus den Anisotropietitrationen (s. o.) erlauben bei beliebigen bekannten Ausgangsmengen von GyrA und GyrB eine Berechnung der Gleichgewichtskonzentrationen aller Komponenten, die im Ansatz enthalten sind. Interessant ist die Vorhersage der A₂B₂-Menge in allen Experimenten, bei denen beide Untereinheiten in einem bestimmten Verhältnis vermischt wurden: Simuliert man beispielsweise die Oligomerisierung im Standard-Aktivitätstest, so werden aus 200 nM GyrA (Monomere) und 800 nM GyrB exakt 89,4 nM A₂B₂ gebildet. Knapp 90 % des GyrA sind somit Teil eines aktiven tetrameren Komplexes. Von den anderen Formen, die GyrA enthalten (GyrA₂ und A₂B), liegen im Gleichgewicht nur jeweils 5 nM vor. Eine 99%ige Tetramerbildung würde bei einer Zugabe von mindestens 5 μM GyrB eintreten. In einem typischen ssATPase-Test mit 100 nM GyrB und 500 nM GyrA (Konzentrationen der Monomere vor der Vereinigung) sind im Gleichgewicht 20 nM A₂B₂ enthalten (monomeres GyrB: 45 nM; Trimer: 15 nM). Nur etwa 40 % der ATPase-Untereinheiten sind also Bestandteil eines vollständigen Tetramers. Dieser Prozentsatz würde bei weiterer GyrA-Zugabe zunächst auf 44 % steigen (Maximum bei 1400 nM) und danach wieder sinken, da bei einem hohen GyrA-Überschuss hauptsächlich Trimere vorliegen. Die GyrA-

abhängige ssATPase-Kurve würde aus diesem Grund oberhalb von 1400 nM wieder langsam abfallen, was eine Beeinträchtigung für die Michaelis-Menten-Auswertung wäre. Bei einem Einsatz von mindestens 5 μM GyrB und einer entsprechend hohen Menge an GyrA liegen ca. 90 % der ATPase-Untereinheiten als Teil eines Tetramers vor. Leider erlaubt die verwendete ssATPase-Methode nicht den Einsatz von solch hohen Enzymmengen, da die auftretende maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu groß wäre. Innerhalb von Sekundenbruchteilen nach der Zugabe aller Komponenten (GyrB, GyrA und DNA) wäre die A_{340} schon beim Nullwert angelangt. Stattdessen müssten andere (z. B. radioaktive) Verfahren angewendet werden, um die ATP-Hydrolyse in dieser Dimension zu erfassen.

Die zelluläre Konzentration der beiden Gyrase-Untereinheiten ist so eingestellt, dass *in vivo* eine effiziente DNA-Topoisomerisierung stattfindet. Es wird also eine ausreichend hohe A_2B_2 -Menge gebildet, die für die optimale Plasmidsuperspiralisierung im Organismus zuständig ist, während der restliche Teil von GyrA₂ oder GyrB entweder getrennt oder als inaktives Trimer vorliegt. Es wird geschätzt, dass sich in einer typischen *E. coli*-Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt etwa 500 – 1000 Exemplare von beiden Untereinheiten befinden⁹⁸. Nimmt man eine Bakterienlänge von 3 μm und einen Durchmesser von 1 μm an (d. h. Volumen $V = 2,4 \text{ fl}$), so ergeben sich zelluläre (monomere) GyrA- bzw. GyrB-Konzentrationen von jeweils etwa 0,5 μM . Bei diesen Voraussetzungen und unter der wagen Annahme, dass alle diese Werte auch für *B. subtilis* gelten, liefert die Simulation für tetramere Gyrase eine A_2B_2 -Konzentration von 0,14 μM (GyrA₂: 0,08 μM ; monomeres GyrB: 0,19 μM ; Trimer: 0,03 μM). Nur etwas mehr als die Hälfte der Untereinheiten, die in der Zelle vorkommen, sind also im Gleichgewichtszustand Bestandteil der aktiven Tetramerform. Dieser Anteil ist aber offenbar ausreichend, um für eine effiziente Relaxierung und Superspiralisierung der zellulären DNA zu sorgen.

5.1.5 Kontrolliertes Ausschalten des Enzyms

Die Aktivität der Gyrase lässt sich durch gezielte Mutationen im aktiven Zentrum ausschalten. So wird beispielsweise für GyrB aus *E. coli* eine ATPase-Defizienz für die Mutante E42Q beschrieben⁹⁹, da das Glutamat für die Interaktion mit dem γ -Phosphat des gebundenen Nukleotids benötigt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die entsprechende Mutation in Bacillus (E44Q) hergestellt und charakterisiert. GyrB E44Q ist genauso stabil wie der Wildtyp, allerdings ist die ATP-Hydrolyse vollständig blockiert. Mischt man diese Mutante mit GyrA WT, so erhält man konsequenterweise eine Gyraseform, die Plasmid-DNA nur relaxieren, aber nicht ATP-abhängig superspiralisieren kann. In Fluoreszenztitrationen mit mantADP wurde festgestellt, dass GyrB E44Q in der Lage ist, Nukleotide zu binden, wenn auch ungefähr sechsmal schlechter als der Wildtyp. Der Aminosäureaustausch von Glutamat nach Glutamin erlaubt also weiterhin eine Nukleotidbindung an das aktive Zentrum des Enzyms, während die anschließende Hydrolyse des Substrats ausgeschlossen ist. Ähnliche ATPase-Defizienzen wurden auch

für weitere Mutanten wie z. B. GyrB D73N in *E. coli* (entspricht D75N in *Bacillus*) berichtet⁹⁹. Ein Austausch des Tyrosins im aktiven Zentrum von GyrA zu Phenylalanin ergibt ein stabiles Protein, das jedoch nicht mehr in der Lage ist, die gebundene G-DNA zu spalten bzw. kovalent zu binden. GyrA Y123F kann folglich Plasmide im Standard-Aktivitätstest weder relaxieren noch superspiralisieren. Eine vergleichbare Inaktivität wurde bereits für die äquivalente *Escherichia*-Mutation Y122F beschrieben¹⁰⁰. Mit GyrB E44Q und GyrA Y123F stehen zwei Präparationen zur Verfügung, die in Einzelmolekülstudien zur Untersuchung des Nukleotidzyklus der Gyrase eingesetzt werden können. So ist es beispielsweise möglich, GyrB E44Q zusammen mit markiertem GyrA in eine smFRET-Messung einzusetzen, um die Kopplung zwischen der ATP-Hydrolyse und der Konformationsdynamik des C- oder DNA-Tores zu erforschen. Durch die ATPase-Defizienz von E44Q ist zu erwarten, dass der Nukleotidzyklus und damit die Farbstoffbewegungen an einer bestimmten Stelle in der Reaktionsabfolge behindert werden. Falls man also in einer solchen Messung ein unterschiedliches Ergebnis im Vergleich zu GyrB WT erhalten würde, so wäre dies ein Hinweis auf die Frage, welche Konformationsänderungen vor bzw. nach der ATP-Hydrolyse stattfinden. Dies würde zur Aufklärung der katalytischen Funktionsweise des Enzyms beitragen. Ebenso ist es möglich, den Austausch GyrA Y123F mit C- oder DNA-Tor-Mutationen zu kombinieren (z. B. GyrA oC Y123F S117C oder GyrA oC Y123F T140C). Einzelmolekülmessungen mit diesen fluoreszenzmarkierten Mutanten könnten zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen der G-DNA-Spaltung und der enzymatischen Konformationsdynamik dienen.

Die Aktivität der Gyrase kann jedoch auch durch Inhibitoren oder Nukleotidanaloga kontrolliert ausgeschaltet werden. Das ATP-Derivat AMPPNP ist für eine solche Blockierung des Nukleotidzyklus sehr gut geeignet, da es von GyrB zwar gebunden, aber nicht gespalten werden kann. Die Affinität dieser Substanz zur Nukleotidbindestelle in *B. subtilis* (K_D (GyrB/AMPPNP) = 117 μ M) ist sogar etwa zwei Größenordnungen stärker als beim homologen *E. coli*-Enzym (13 mM)²⁴. DNA-Topoisomerisierungen werden durch dieses nicht-hydrolysierbare Analogon vollständig unterbunden. In smFRET-Experimenten kann AMPPNP folglich ebenso wie die E44Q-Mutation verwendet werden, um den Zusammenhang zwischen der Nukleotidhydrolyse und der Konformationsdynamik in der Gyrase aufzuklären. Die Verbindung ATP γ S ist dafür eher ungeeignet, da sie von *Bacillus*-GyrB gespalten wird, wenn auch fünfmal langsamer als ATP. ATP γ S kann allerdings ATP nicht als Energielieferant für die negative Superspiralisierung ersetzen – möglicherweise ist die freigesetzte Energie aus dieser Bindung nicht ausreichend, um die notwendigen Konformationsänderungen im Enzym auszulösen. Die ATPase-Aktivität von GyrB WT lässt sich außerdem sehr spezifisch und vollständig durch den kompetitiven Gyraseinhibitor Novobiocin ausschalten. In der Literatur werden einige Aminosäuren beschrieben, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dieser Cumarinverbindung spielen. So zeigen beispielsweise die *E. coli*-Mutanten GyrB D73N und D73E eine hohe Novobiocinresistenz, so dass für die äquivalente Position in *Bacillus* (D75) das gleiche Verhalten zu erwarten ist. Interessanterweise besitzt GyrB D73E

aus *Escherichia* eine schwache ATPase-Aktivität, während bei D73N keine Hydrolyse stattfindet⁹⁹. Die entsprechende *Bacillus*-Mutante GyrB D75E wäre deshalb in Einzelmolekül-FRET-Experimenten ein interessantes Vergleichsobjekt zu GyrB WT, um die Funktionsweise des Hemmstoffes Novobiocin während des Nukleotidzyklus der Gyrase zu untersuchen.

5.2 Von der Mutation zum Laseraufbau

5.2.1 Herstellung und Fluoreszenzmarkierung der Cysteinmutanten

Für die Fluoreszenzmarkierung der Gyrase an interessanten Positionen wurden zunächst die drei nativen Cysteine durch geeignete andere Aminosäuren ersetzt. GyrB C58S C414S ist genauso ATPase-aktiv wie der Wildtyp und gemeinsam mit GyrA WT zu einer normalen Plasmidmodifikation fähig. Der Austausch von beiden Aminosäuren mit SH-Gruppen gegen Serin zu GyrB oC ist also eine Basis für die Einführung neuer Cysteine für spätere FRET-Versuche. Ebenso steht mit GyrA C350L (GyrA oC) eine Mutante zur Verfügung, die pUC18 WT-artig relaxiert und negativ superspiralisiert. Ausgehend von den jeweiligen oC-Ansätzen wurden anschließend neue Cysteine in 13 verschiedenen GyrA- und 7 GyrB-Positionen eingefügt; allein GyrB S7C ließ sich bislang nicht produzieren. Die Cysteine in GyrA dienen zur Untersuchung der drei Bereiche C-Tor, DNA-Tor sowie der C-terminalen Domäne, während bei den Ersetzungen in der ATPase-Untereinheit das N-Tor von Interesse ist. Bei allen drei Regionen in GyrA wurden jeweils zwei bis drei Mutationen entdeckt und untersucht, die für spätere Einzelmolekül-FRET-Studien geeignet sind: GyrA oC N399C, T408C und Q445C rahmen im GyrA₂-Dimer in drei unterschiedlichen Abständen das C-Tor ein, so dass drei verschiedene FRET-Effizienzen zu erwarten sind. GyrA oC S117C, T140C und S153C sind zur Untersuchung des DNA-Tores geeignet, wobei die drei Cysteine unter- und oberhalb bzw. in der Mitte dieses Bereiches positioniert sind. Mit den Mutanten GyrA oC K594C bzw. E726C kann schließlich das Verhalten der CTD betrachtet werden. Die Abstände der äquivalenten Cysteine im symmetrischen GyrA₂-Dimer liegen zwischen 2,5 und 6 nm (Ausnahme: CTD), was bei den vorliegenden Förster-Radien für smFRET-Messungen vielversprechend ist. Alle genannten Mutanten sind stabil und zeigen eine WT-artige Aktivität sowohl vor als auch nach einer statistischen Doppelmarkierung. Die fünf übrigen GyrA-Mutanten sind entweder schwach oder gar nicht aktiv (bei G152C erst nach der Markierung) bzw. wurden nicht mehr benötigt (K449C), da schon genügend andere C-Tor-Positionen zur Verfügung standen.

Die Zugänglichkeit der eingefügten Cysteine für kleine Fluoreszenzfarbstoffe ist in allen Fällen sehr günstig: Innerhalb von einer Minute nach dem Reaktionsstart wird generell eine Markierungseffizienz von etwa 80 % erreicht (Ausnahmen: GyrA oC S117C und GyrB C414S). Dies gilt sowohl für Farbstoffe der Alexa-Reihe, die über einen mobilen C₆-Linker zwischen der reaktiven und der fluorophoren Gruppe

verfügen, als auch für TMR, das keine solche aliphatische Kette besitzt. Eine vollständige Markierung stellt sich leider auch bei einer längeren Reaktionszeit nicht ein. Ein geringer Teil der SH-Gruppen ist unter den gegebenen Bedingungen offenbar oxidiert oder anderweitig blockiert und steht daher für eine Interaktion mit den Maleimidgruppen der Farbstoffe nicht zur Verfügung. Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon beispielsweise in Studien mit einem Fusionsprodukt aus Calmodulin und dem Maltose-Bindeprotein beschrieben¹⁰¹. Trotz der Zugabe eines Anti-Oxidationsmittels ohne Sulfhydrylgruppe (TCEP), das nicht mit der reaktiven Maleimidgruppe der Fluorophore reagiert und das für eine Reduktion aller Cysteine vor der Kopplung sorgen soll, lag dort die Proteinmarkierungseffizienz nur zwischen 50 und 90 %.

Ferner gelang es, in allen statistischen Doppelmarkierungen die vorbereitete Donor-Akzeptor-Mischung so einzustellen, dass sich am Ende der Reaktion ein gewünschter zwei- bis dreifacher Akzeptorüberschuss am Protein ergab. Auch in Einzelmarkierungen wurde grundsätzlich eine hohe Kopplungseffizienz erzielt. Unspezifische Protein-Farbstoff-Interaktionen finden dagegen nicht statt, wie ein Kontrollexperiment mit SH-freiem GyrA oC zeigt. Das vorliegende Markierungsprotokoll wurde zeit- und arbeitstechnisch optimiert und liefert unabhängig von der Cysteinposition und den eingesetzten Fluorophoren gute reproduzierbare Ergebnisse. Insbesondere sorgt es nach dem Ende der Reaktion für eine vollständige Trennung zwischen den markierten Proteinen und den restlichen ungekoppelten Farbstoffmolekülen, die andernfalls einen schlechten Einfluss auf smFRET-Messungen haben könnten. Dazu wurde das NAP-5-Elutionsprotokoll des Herstellers auf eine geeignete Weise modifiziert. Weitere chromatographische Arbeitsschritte (z. B. hydrophobe Phenyl-Sepharose an einer FPLC-Anlage) sind für eine Entfernung der freien Fluorophore aus der Lösung nicht mehr erforderlich. Die eingesetzten reaktiven Farbstoffe sind also, insgesamt betrachtet, für den Zweck in der vorliegenden Arbeit sehr gut geeignet. Auch das Homologiemodell anhand der bekannten 3D-Struktur von Gyrase aus *E. coli*, das die Grundlage für die Auswahl der Cysteinpositionen in *B. subtilis* bildet, hat sich sehr bewährt – Aminosäuren, die sich in *Escherichia* an der Peripherie des Proteins befinden, tun dies offensichtlich auch in *Bacillus*. Mit dem vorliegenden Homologiemodell ist es möglich, Positionen in der *B. subtilis*-Gyrase vorherzusagen, die dem Lösungsmittel zugewandt und folglich für reaktive Farbstoffe zugänglich sind.

Problematisch war die Situation am N-Tor in der Untereinheit GyrB: Alle sieben untersuchten Cysteinmutanten waren instabil und fielen bereits während der Reinigungsprozedur aus. Offenbar sind die Positionen in der Nähe der ATPase-Bindestelle derart von Bedeutung, dass schon ein einzelner nicht-konservativer Austausch genügen kann, um die Stabilität des Proteins zu gefährden. Möglicherweise hätte die Ersetzung S7C, die trotz mehrerer Versuche nicht gelingen wollte, zu einer GyrB-Mutante geführt, die nicht sofort ausfällt. Es stellte sich aber heraus, dass eines der beiden nativen Cysteine in GyrB für eine Fluoreszenzmarkierung geeignet ist: GyrB C414S besitzt eine SH-Gruppe an der Aminosäure C58,

die in der Nähe des N-Tores liegt und für Farbstoffe in einer mehrstündigen Reaktion zugänglich ist. Bei dieser Mutante wurden ausschließlich Einzelmarkierungen durchgeführt, da GyrB (im Gegensatz zu GyrA) im Grundzustand als Monomer vorliegt. Erst nach einer Vermischung von GyrB-Donor und -Akzeptor kann eine Assoziation zu gemischtmarkierten Tetrameren stattfinden. Abgesehen davon ist auch in diesem Fall – genau wie bei der statistischen GyrA-Doppelmarkierung – mit unerwünschten A₂B₂-Komponenten zu rechnen, die mit zwei identischen Farbstoffen verknüpft sind. Da GyrB C414S auch nach einer Kopplung an Alexa488 bzw. Alexa546 (aber nicht TMR) eine WT-artige ATPase-Aktivität aufweist, kann diese Mutante theoretisch für Untersuchungen des N-Tores eingesetzt werden. Diese sollten schließlich aus einem anderen Grund scheitern (siehe 5.3.2.3).

5.2.2 Spektrale Eigenheiten der Mutanten

Im Laufe des Projekts wurde die Gyrase an vielen verschiedenen Positionen kovalent mit Donor- und Akzeptorfarbstoffen markiert. In jeder Mutante befinden sich die Fluorophore in einer unterschiedlichen molekularen Umgebung im Enzym, die einen gewissen Einfluss auf die Eigenschaften des Farbstoffs ausübt. Die Anwesenheit von bestimmten Seitenketten im Protein sorgt dabei für eine geringfügige Änderung der Amplitude und des Emissionsmaximums der Fluoreszenz. So ist z. B. die Quantenausbeute von Alexa488 bei pH = 7,5 von der Kopplungsstelle an der Gyrase abhängig; die Schwankung beträgt hier bis zu 50 %. Die ermittelten Φ_D -Werte (0,33 – 0,66) stimmen sehr gut mit Vergleichsdaten aus Studien mit Oktapeptidfragmenten des Cholecystokininrezeptors¹⁰² ($\Phi_D = 0,58 – 0,60$) bzw. mit dem Kälteschockprotein CspTm⁶¹ (0,40 – 0,52) überein. Eine positionsabhängige Abweichung ergibt sich auch bei der Überlappung vom Donoremissions- und dem TMR-Absorptionsspektrum, wie eine Betrachtung der markierten GyrA-Mutanten beweist. In manchen Fällen liegen die beiden Maxima näher beisammen als in anderen Ansätzen, obwohl es sich eigentlich um die gleichen Farbstoffmoleküle handelt. Eine Untersuchung von freien Farbstoffen ohne Proteinumgebung führt zu einem Überlappungsgrad, der noch etwas geringer ist. Die genannten Effekte haben eine unmittelbare Folge für den Förster-Radius R_0 : Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Transfereffizienz halbmaximal ist, schwankt je nach der Cysteinposition um bis zu 0,6 nm. Dennoch ist der bekannte R_0 -Wert für Alexa488 und TMR (5,4 nm) im Rahmen der Messgenauigkeit eine gute Grundlage für die smFRET-Auswertung. Eine exakte Bestimmung des Förster-Abstands ist generell nicht möglich, da der Parameter κ^2 experimentell kaum greifbar ist und auf den Wert 2/3 für uneingeschränkt rotierbaren freien Farbstoff festgelegt wurde⁵⁹. Zwar lässt der mobile C₆-Linker von Alexa488 diese Annahme durchaus zu, aber dennoch kann der Orientierungsfaktor leicht von 2/3 abweichen, da die Mobilität des Fluorophors theoretisch durch Seitenketten des Proteins behindert sein könnte. Auch der Brechungsindex im Medium kann nicht automatisch auf den Wasserwert 1,33 gesetzt werden. Relevant ist vielmehr der modifizierte (kaum bestimmbare) Indexwert, der sich bei einer Betrachtung der intramolekularen Wegstrecke des Donor-

Akzeptor-Transfers ergibt¹⁰³. In der Literatur wird daher empfohlen, $n = 1,4$ zu verwenden⁷⁸, wenn der Transfer wie bei der Gyrase teilweise durch das Protein hindurch erfolgt. Der Einfluss der molekularen Umgebung auf R_0 sowie die Unsicherheiten bezüglich κ^2 und n führen dazu, dass man grundsätzlich mit einer leichten Abweichung bei FRET-Abstandsmessungen leben muss.

Die Abhängigkeit der Emissionsspektrenform von der Farbstoffkopplungsposition hat auch einen Einfluss auf die smFRET-Korrekturparameter. Während die Schwankung der Kreuzdetektionskonstanten α und β bei unterschiedlichen Mutanten vernachlässigbar ist, ergibt sich z. B. für GyrA oC N399C ein deutlich höherer γ -Wert als für T408C oder Q445C. Unterschiedliche benachbarte Seitenketten im Enzym haben zur Folge, dass die Detektionseffizienz von Donor- und Akzeptorphotonen für verschiedene GyrA-Ansätze variiert. Möglicherweise wird der Farbstoff Alexa488 leicht gequencht, wenn er kovalent am Cystein C399 gebunden ist. Auch die direkte 475-nm-Laseranregung des Akzeptors (δ) ist bei den untersuchten Mutanten nicht identisch, da das Absorptionssignal von TMR je nach der molekularen Umgebung zu niedrigeren bzw. höheren Wellenlängen wandert. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Korrekturparameter lassen sich kaum mit Literaturwerten vergleichen, da sie für das jeweilige handgefertigte Laseraufbau-Unikat charakteristisch sind. Schon eine geringe Modifikation einzelner Linsen oder Spiegel kann bei einer gleichbleibenden Funktionsfähigkeit des Systems zu einer Änderung von α , β oder γ führen. Wegen der Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Korrekturfaktoren ergeben sich weitere Unsicherheiten in der smFRET-Auswertung, die in leichten Fehlern bei der molekularen Abstandsmessung resultieren. Komplette FRET-Signale in den Histogrammen können durch etwas ungenaue Korrekturparameter jedoch nicht neu entstehen oder unterdrückt werden, wie bereits in 4.7.2 erläutert wurde. Somit ist es durchaus vertretbar, angemessene empirische Standardwerte zu verwenden.

Der Einfluss der molekularen Umgebung im Protein auf das spektrale Verhalten der Farbstoffe wurde in einer Reihe von Kontrollexperimenten direkt nachgewiesen. Die Amplitude der Fluoreszenz ändert sich um bis zu 10 %, wenn das freie Fluorophor chemisch mit GyrA oder mit Cystein reagiert; oder wenn markierte Gyrase mit Proteinase K zu einzelnen Aminosäuren gespalten wird. Leider war es nicht möglich, eine allgemein gültige Regel für die spektrale Verschiebung nach einer Markierungsreaktion aufzustellen. Es ist folglich kaum vorhersehbar, ob bzw. wie stark sich der Extinktionskoeffizient durch die kovalente Kopplung an ein bestimmtes Cystein der Gyrase ändert. Somit ist auch die anschließende Bestimmung der Protein- und Farbstoffkonzentration (und damit der Markierungseffizienz) mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Die smFRET-Messungen liefern folglich nie exakte intramolekulare Abstände, sondern immer nur Werte, die leicht von der Realität abweichen können.

5.2.3 Ensemblemessungen

Die Anisotropie- und Lebensdauermessungen mit freiem und gebundenem Alexa488 am Ensembleaufbau verliefen prinzipiell erfolgreich. Der Donorfarbstoff hat unabhängig von seiner molekularen Umgebung an der Kopplungsstelle eine Lebenszeit zwischen 3,9 und 4,1 ns, was sehr gut mit der Herstellerangabe für freies Alexa488 (4,1 ns) übereinstimmt⁷⁰. Proteinseitenketten in räumlicher Nähe des gekoppelten Fluorophors haben folglich keinen Einfluss auf die Dauer des angeregten Zustands. Die Lebenszeit des Donors wird für die qualitative Auswertung von smFRET-Messungen benötigt und muss wegen ihrer Konstanz nicht für jede markierte Gyrase mutante einzeln bestimmt werden. Stattdessen kann für die Berechnung der theoretischen Idealkurve in den Contourdiagrammen in allen Fällen der Literaturwert verwendet werden. Unklar ist, weshalb für die Anpassung der Zerfallskurve von freiem Donor zwei Exponenten benötigt werden. Vergleichbare Studien beschreiben die Lebensdauer des ungekoppelten Farbstoffs in einer wässrigen Lösung temperaturunabhängig als mono-exponentiell^{69,104}. Da teilweise auch dort Alexa488-Maleimid eingesetzt wurde, kann die zweite Phase nicht durch die Anwesenheit der reaktiven Gruppe verursacht werden. Es besteht also die Möglichkeit, dass während der Messung ein Nebeneffekt aufgetreten ist bzw. ein Fehler im Aufbau oder in der Auswertungsprozedur vorliegt. Die Anzahl der notwendigen Exponenten in der Kurvenanpassung ist abhängig von der Cysteinmutante und damit von der molekularen Umgebung der Farbstoffe: Im Fall von GyrB C414S bzw. C58L werden für eine zufriedenstellende Kurvenbeschreibung drei Exponenten benötigt, während bei den C-Tor-Mutanten (ebenso wie bei freiem Alexa488) zwei Phasen ausreichend sind. Nebenvorgänge beim Fluoreszenzzerfall mit $\tau < 2,0$ ns können somit durch die räumliche Nähe zu bestimmten Aminosäuren gefördert werden. Diese Beobachtung stimmt mit Vergleichsdaten überein, nach denen ein weiterer Exponent ($\tau = 1,0$ ns) notwendig ist, wenn Alexa488 mit dem Antikörper Immunglobulin E verknüpft ist¹⁰⁴.

Zeitaufgelöste Anisotropiemessungen wurden zur Kontrolle der Qualität der smFRET-Experimente durchgeführt. Freies Alexa488 besitzt eine sehr kurze Rotationskorrelationszeit (0,18 ns), wobei zur Beschreibung der Zerfallskurve eine einfache Exponentialfunktion ausreicht. Dieser Wert stimmt sehr gut mit Vergleichsdaten aus der Literatur (0,17 ns)^{105,106} überein. Koppelt man den Farbstoff an unterschiedliche Cysteinpositionen in der Gyrase, so erhöht sich die Korrelationszeit leicht auf 0,22 – 0,37 ns. Auch bei einer Untersuchung mit Alexa488, das kovalent an G-Aktin gebunden war, ergab sich ein vergleichbarer Anstieg von 0,17 auf 0,36 ns¹⁰⁵. Alle genannten Werte liegen in derselben Größenordnung, so dass eine nahezu freie Rotation des Fluorophors an seiner Kopplungsstelle anzunehmen ist. Der C₆-Linker zwischen der farbgebenden und der reaktiven Gruppe sorgt dafür, dass Alexa488 nicht sterisch gehindert ist, sondern alle räumlichen Konformationen einnehmen kann. Die Festsetzung des Orientierungsfaktors κ^2 auf den Wert für freien Farbstoff (2/3), die für die Bestimmung des Förster-Abstands von Bedeutung ist, ist also gerechtfertigt. Alexa488-Maleimid ist folglich als

Energiedonor für hochwertige Einzelmolekül-FRET-Messungen geeignet, was seine Lebenszeit- und Rotationseigenschaften (für Multiparameteranalysen) betrifft. Bei der Auswertung des Anisotropiezerfalls von Gyrase-Donor-Komplexen sind drei Exponenten notwendig, was darauf zurückzuführen ist, dass sich die Eigenrotation des kleinen Farbstoffmoleküls mit der deutlich langsameren Drehung des großen Proteins überlagert. Während das fast kugelförmige 42-kDa-Protein Aktin eine Rotationskorrelationszeit von 16 ns besitzt¹⁰⁵, liegt der Wert bei Alexa488-markierten Untereinheiten der Gyrase (GyrB-Monomer: 71,5 kDa; GyrA₂-Dimer: 184,2 kDa) zwischen 25 und 46 ns. Das höhere Molekulargewicht führt also wegen der Trägheit des Proteins auch zu einer Zunahme der globalen Rotationsdauer. In Experimenten mit dem kleineren Molekül Calmodulin (16 kDa) ergab sich entsprechend eine niedrigere globale Zeitkonstante von 3,4 – 3,9 ns¹⁰⁷. Daneben tritt bei Gyrasemessungen reproduzierbar eine dritte Phase mit einer mittleren Rotationskorrelationszeit (1,6 – 3,6 ns) auf, die bei den Aktin- und Calmodulinstudien nicht beobachtet wurde. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Segmentbewegung des C₆-Linkers zwischen dem Protein und dem Farbstoff zurückzuführen..

5.3 Einzelmolekül-FRET mit Gyrase

5.3.1 Optimierung der Methode

Im Laufe des Projekts wurden der Einzelmolekülaufbau, der Ablauf der Messung und die Auswertung schrittweise optimiert. In einer Reihe von Vorexperimenten wurde zunächst ermittelt, dass die fluoreszierende Probe während der Photonenaufzeichnung in einer Konzentration von 75 pM vorliegen und bei 75 µW angeregt werden sollte. Bei geringeren Proteinmengen ist die Anzahl der Signale pro Zeiteinheit zu niedrig, während bei höheren Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit steigt, dass sich zwei oder mehrere Fluorophore gleichzeitig im konfokalen Volumen (2,7 fl) aufhalten. Im Zeitdiagramm käme es dann zu einer Überlagerung der beiden Photonenergebnisse. Die gewählte Anregungsintensität sorgt dafür, dass sehr viele aussagekräftige *Bursts* detektiert werden, die weit über 100 Photonen besitzen. Gleichzeitig tritt während der Bestrahlung eines Moleküls in der Regel noch keine Farbstoffbleichung auf, die das Messergebnis verfälschen würde. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen erhält man eindeutige FRET-Histogramme, während bei einer höheren Intensität das Transfersignal gegenüber dem Maximum bei $E_{\text{FRET}} = 0$ zunehmend in den Hintergrund gerät. Dieses 0-Signal wird durch Nur-Donor-Spezies verursacht, die bei einer statistischen Doppelmarkierung eines GyrA₂-Dimers unvermeidlich sind. Es kann jedoch reduziert werden, wenn während der Reaktion ein zwei- bis dreifacher Akzeptor-Kopplungsüberschuss gegenüber Alexa488 angestrebt wird. In diesem Fall liegt der Anteil von Protein-Donor-Donor im einstelligen Prozentbereich, während gemischtmarkiertes Protein in ausreichender Menge vorhanden ist. Nur-Akzeptor-Komponenten werden unter diesen Voraussetzungen verstärkt gebildet. Sie werden allerdings vom Laserlicht bei 475 nm nur schwach angeregt und schließlich

im Histogramm durch eine geeignete Photonenschwelle wieder ausgeblendet. Störende 20-Hz-Signale, deren Herkunft nie geklärt werden konnte, sind ebenfalls nicht problematisch – sie können nach der Messung im Evaluationsprogramm sichtbar gemacht und einfach herausgeschnitten werden. Insgesamt steht mit dem vorliegenden Einzelmolekülaufbau ein System zur Verfügung, mit dem FRET-Effizienzen zwischen 0,2 und 1 reproduzierbar detektiert werden können. Bei einem Förster-Transfer unterhalb von 0,2 überlagert sich das gewünschte FRET-Maximum im Histogramm mit dem Störsignal bei $E_{\text{FRET}} = 0$. Alexa488-TMR-Abstände oberhalb von 7 nm (bzw. 9 nm mit Alexa555) lassen sich daher leider nicht so genau bestimmen wie kleinere intramolekulare Distanzen.

Die hohe Kopplungseffizienz im Bereich von 80 % ergibt hochwertige smFRET-Ergebnisse. Dies gilt sogar für die Mutante GyrA oC S117C, bei der ausnahmsweise nur etwa 35 % der Cysteine mit den beiden Farbstoffen reagieren. Es ist daher nicht notwendig, weitere Markierungsexperimente in Anwesenheit von SH-freien Anti-Oxidantien wie beispielsweise TCEP durchzuführen, um die Effizienz eventuell weiter zu erhöhen. Abgesehen davon ist auch mit dieser Methode nicht sichergestellt, dass dann alle Cysteine eine kovalente Bindung mit den Maleimidgruppen der Fluorophore eingehen¹⁰¹. Insgesamt ist die statistische Doppelmarkierung der Gyrase-Untereinheiten mit Alexa488 und TMR bzw. Alexa555 ein geeignetes Verfahren, um Proben für erfolgreiche und aussagekräftige Einzelmolekül-FRET-Experimente bereitzustellen. Eine anschließende Trennung der gemischtmarkierten Komponente von unvermeidlichen Nur-Donor- bzw. Nur-Akzeptor-Spezies mit Hilfe von chromatographischen Methoden (hydrophobe Phenyl-Sepharose) ist nicht erforderlich. Dieses Verfahren wäre einerseits sehr aufwändig und andererseits wenig erfolgversprechend – sowohl die Masse als auch die Hydrophobizität der einzelnen Komponenten liegen zu nahe beisammen, um eine sinnvolle Trennung mit einer hohen Ausbeute an Protein-Donor-Akzeptor zu erzielen. Derartige FPLC-Experimente würden selbst bei einem erfolgreichen Ausgang in keinem Verhältnis zum Nutzen für die smFRET-Messungen stehen.

Die Korrekturparameter α , β und γ sind plausibel und berücksichtigen störende Messeffekte wie die Kreuzdetektion oder die unterschiedliche Detektionseffizienz von Alexa488 und TMR, wie bereits in 4.7.2 erläutert wurde. Der Faktor δ , der die direkte Akzeptoranregung durch den Laser berücksichtigen soll, führt dagegen zu zweifelhaften Ergebnissen. Rechnet man unter Verwendung von $\delta = 0,15 - 0,38$ die Parameter α und γ zu α' und γ' um, so erhält man FRET-Histogramme, in denen das 0-Signal eine scheinbare Effizienz von ca. -0,3 aufweist. Da dieses Maximum von Proteinen erzeugt wird, die ausschließlich mit Donorfluorophoren gekoppelt sind, sollte das Signal jedoch im Bereich von $E_{\text{FRET}} = 0$ sein. Lässt man δ weg und wertet die Messungen mit den unmodifizierten Werten α und γ aus, so befindet sich das 0-Signal dagegen an der erwarteten Stelle. Gleichzeitig verschieben sich bei einer Berücksichtigung der direkten Akzeptoranregung alle echten FRET-Signale von C-Tor- bzw. DNA-Tor-Mutanten nach links zu niedrigeren Transfereffizienzen. Die daraus resultierenden Donor-Akzeptor-

Abstände stimmen nicht mehr mit den theoretischen Distanzen überein, die sich aus der Röntgenstruktur ergeben, wobei diese freilich nur ein Anhaltspunkt sind. Ohne δ korrelieren die experimentell bestimmten Abstände im Rahmen der Messgenauigkeit relativ gut mit den Erwartungswerten. Ein Kontrollexperiment zur Verifizierung der δ -Bestimmung deutet ebenfalls auf eine Ungenauigkeit hin: Mischt man zwei doppelmarkierte dsDNA-Fragmente mit unterschiedlichen Donor-Akzeptor-Abständen in einem 1:1-Verhältnis, so sollten im FRET-Histogramm zwei Maxima erscheinen, die von den beiden Komponenten in der Lösung erzeugt werden. Im konkreten Fall wurden Oligonukleotide verwendet, bei denen TMR im Abstand von 30 bzw. 5 Basenpaaren zu Alexa488 angebracht war. Unter Verwendung von richtigen Korrekturparametern sollten zwei FRET-Signale bei $E_{\text{FRET}} = 0$ bzw. 1 sichtbar sein, die aus einer praktisch gleichen Anzahl an *Bursts* bestehen. Ohne die Berücksichtigung der direkten Akzeptoranregung war dies auch tatsächlich der Fall. Bei einer Auswertung mit δ enthielt das Signal bei $E_{\text{FRET}} = 0$ dagegen deutlich mehr Photonenergebnisse als das Maximum bei $E_{\text{FRET}} = 1$. Dieses Histogramm wurde im Gegensatz zu den Gyrasemessungen nicht durch ein störendes 0-Signal überlagert, da die Markierungseffizienz bei 100 % lag und keine Nur-Donor-Komponenten vorhanden waren (persönliche Mitteilung von Airat Gubaev, Universität Basel). Dieses Kontrollexperiment zeigt, dass ein Fehler in der Bestimmung oder der anschließenden Anwendung von δ nicht ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise ist dieser Korrekturparameter bereits in den Faktoren α oder γ enthalten, so dass eine Umrechnung zu α' bzw. γ' die direkte Akzeptoranregung doppelt berücksichtigen würde. Da dieser Sachverhalt nicht eindeutig geklärt werden konnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung des Parameters δ verzichtet, um keine zweifelhaften Messergebnisse zu erzeugen. Dieser Schritt ist in der vergleichbaren Literatur nicht unüblich: In einer Veröffentlichung über Einzelmolekülexperimente mit dem Kälteschockprotein CspTm aus *Thermotoga maritima* wurde die direkte Anregung des Akzeptors Alexa594 ebenso vernachlässigt⁶¹, obwohl dieses Molekül bei der dort eingesetzten Laserwellenlänge ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm) eine gewisse Absorption aufweist. In zwei anderen Studien über die Faltung des Chymotrypsininhibitors¹⁰⁸ sowie über die Nuklease-DNA-Interaktion in *Staphylococcus*⁵⁷ (jeweils mit TMR als Donor und Cy5 als Akzeptor; $\lambda_{\text{ex}} = 514$ nm) wird δ ebenfalls nicht berücksichtigt. Die direkte Anregung des Akzeptors ist experimentell und rechnerisch schwer greifbar und wird daher in smFRET-Auswertungen routinemäßig weggelassen¹⁰⁹.

5.3.2 Verschiedene Bereiche der Gyrase

5.3.2.1 C-Tor

Für die Untersuchung des C-Tores der Gyrase wurden die drei Mutanten GyrA oC N399C, T408C und Q445C eingesetzt. In Messungen mit statistisch doppelmarkiertem GyrA in Abwesenheit von weiteren Liganden konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass das C-Tor im Grundzustand geschlossen ist. Alle

drei Positionen erzeugen FRET-Signale, die mit den Erwartungswerten aus der entsprechenden Röntgenstruktur übereinstimmen. Die vorliegenden PDB-Daten⁷ wurden direkt mit intramolekularen Abstandsmessungen in Einzelmolekülversuchen bestätigt. Der untersuchte Bereich wird von zwei GyrA-Domänen im symmetrischen Dimer gebildet und durch eine hohe lokale Autoaffinität der beiden Untereinheiten stabilisiert. Nach einer Zugabe von GyrB ändert sich daran nichts, d. h. auch in der tetrameren Gyrase bleibt das Tor grundsätzlich geschlossen. Diese Konformation ist offenbar erforderlich, um die vier Untereinheiten zusammenzuhalten, wenn eines der anderen beiden Tore (z. B. das N-Tor) geöffnet vorliegt. Messungen in Anwesenheit von Plasmid und Nukleotiden ergeben ähnliche Histogramme, die ausschließlich auf einen geschlossenen C-Tor-Zustand hindeuten. Diese Daten beweisen, dass die DNA-induzierte Konformationsänderung der Gyrase keinen Einfluss auf die allgemeine Orientierung dieser GyrA-Bereiche hat. Dabei ist es unerheblich, ob zirkuläres pUC18 oder lineare Kalbsthymus-DNA eingesetzt wird. Eine stabile Öffnung des Tores wird ebenso wenig durch eine nukleotidinduzierte Dimerisierung von GyrB ausgelöst, wie Messungen mit ATP sowie mit dem nicht-hydrolysierbaren Analogon AMPPNP demonstrieren. Die Interaktion mit DNA und Nukleotiden variiert zwar die Konformation von Teilen der Gyrase, aber offenbar nicht diejenige des hochaffinen C-Tor-Bereichs – ein zweites FRET-Signal, das ein offenes Tor andeuten würde, wurde in keinem Histogramm festgestellt. Multiparameteranalysen, die die Lebenszeit von Alexa488 berücksichtigen, lassen ebenfalls nur einen Zustand erkennen und stellen klar, dass es sich bei den dortigen *Bursts* um echte Förster-Transferereignisse handelt, die nicht von Farbstoffbleichungen oder sonstigen Störeffekten affiziert werden. Die smFRET-Untersuchungen mit den drei markierten C-Tor-Mutanten zeigen daher den tatsächlichen Zustand des untersuchten Enzyms an. Vergleichbare Literaturdaten existieren bislang nicht, da in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal überhaupt Einzelmolekülexperimente mit markierter Gyrase durchgeführt wurden.

Biochemische Studien konnten eindeutig nachweisen, dass das C-Tor zu bestimmten Zeitpunkten im Nukleotidzyklus der Gyrase vorübergehend geöffnet sein muss: Eine kovalente Verknüpfung der beiden GyrA-Untereinheiten am C-Tor mit einem Dimaleimidlinker verhindert den Austritt des T-Segments aus dem Enzym^{48,49}. Die topologische Plasmidmodifikation wird in diesen Versuchen erst dann vollständig ausgeführt, wenn die Kopplung durch die Zugabe eines Anti-Oxidationsmittels wieder rückgängig gemacht wird. Dieser offene C-Tor-Zustand kann in den vorliegenden smFRET-Experimenten tatsächlich sichtbar gemacht werden, wenn einzelne Photonenergebnisse betrachtet werden. Bei allen drei Mutanten treten *Bursts* auf, die im Zeitdiagramm einen Sprung zwischen zwei definierten FRET-Niveaus ausführen. Während der Zustand mit einem hohen Förster-Transfer mit den Histogrammsignalen vereinbar ist, zeigt das niedrige FRET-Niveau die geöffnete Konformation des C-Tores an – eine Akzeptorbleichung kann hierbei ausgeschlossen werden. Die Übergänge zwischen den beiden Ebenen finden äußerst schnell, d. h. in einem Zeitraum von maximal 1 ms statt. Da die meisten enzymatischen

Konformationsänderungen im μs - bis im niedrigen ms -Bereich ablaufen, erscheint diese Beobachtung aus den FRET-Zeitdiagrammen durchaus plausibel. Die Distanz zwischen den äquivalenten markierten Cysteinen liegt beim geöffneten Zustand bei allen drei Positionen um 2 – 3 nm über den jeweiligen Werten für das geschlossene C-Tor. Doppelsträngige T-DNA mit einem Durchmesser von 2,0 nm kann daher durch die kurzzeitig vorhandene Lücke aus dem tetrameren Enzym austreten.

Bursts mit interessanten Niveausprüngen sind leider relativ selten und machen nur etwa 1 % aller FRET-Ereignisse aus. Betrachtet man die Gesamtheit der Gyrasemoleküle in der Messküvette, so liegen zu einem bestimmten Zeitpunkt ca. 99 % in einer stabilen geschlossenen C-Tor-Konformation vor. Der energetisch ungünstigere offene Zustand scheint eine Ausnahme im Nukleotidzyklus zu sein. Bei insgesamt ca. 500 aussagekräftigen FRET-Ereignissen in einer halbstündigen Photonenaufzeichnung sind rechnerisch etwa fünf solche *Bursts* zu erwarten, die sich in den Histogrammen nicht nachweisen lassen und erst bei einer gründlichen Einzelmolekülbetrachtung auffallen. Ein weiteres Problem in den smFRET-Messungen liegt in der unvollständigen Sättigung des Enzyms mit seinen Bindungspartnern: Nur 46 % bzw. 74 % der Gyrasemoleküle haben unter den vorliegenden Verhältnissen ein Plasmid bzw. ATP zur Verfügung. Sehr zufriedenstellend ist die Tatsache, dass 99 % der GyrA-Untereinheiten als Bestandteil eines aktiven Tetramers vorliegen, anstatt (inaktive) Trimere zu bilden (siehe Abb. 46 in 4.3.4.2). Multipliziert man diese Wahrscheinlichkeiten, so stellt sich heraus, dass nur ein Drittel (34 %) des markierten GyrA über alle drei Bindungspartner (GyrB, DNA und ATP) gleichzeitig verfügt. Ein großer Teil der fluoreszierenden Moleküle kann daher keinen Nukleotidzyklus ausführen und wird sich im Einzelmolekülexperiment wie reine Gyrase (in Abwesenheit der Substrate) verhalten. Bei einem Einsatz von Kalbsthymus-DNA (ca. 90%ige Sättigung) steigt der Anteil der vollständigen Objekte von 34 auf 66 %. Lineare DNA ist allerdings nicht das typische Substrat der Gyrase und es ist unklar, inwieweit man diese Experimente auf die pUC18-Topoisomerisierungsaktivität übertragen kann. Außerdem stimuliert Kalbsthymus-DNA die ssATPase-Aktivität deutlich weniger stark als negativ superspiralisierte Plasmide, so dass das beschriebene Sättigungsproblem kaum gelöst wird. Die unvollständige Interaktion mit den Substraten und die Kurzlebigkeit der offenen C-Tor-Konformation sind die Gründe für die Abwesenheit eines entsprechenden Transfersignals in den Einzelmolekül-FRET-Histogrammen.

In ssATPase-Tests wurde bereits gezeigt, dass eine Runde im Nukleotidzyklus etwa 1 – 2 s in Anspruch nimmt ($k_{\text{cat}} = 0,55 \text{ s}^{-1}$). Unter der Annahme, dass in einer Gyrasepopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt nur 1 % in einer geöffneten C-Tor-Konformation vorliegen, dürfte die Lebensdauer dieses Zustands etwa 10 – 20 ms betragen. Dieses Zeitfenster ist für einen Austritt des T-DNA-Segments aus dem Enzym mit Sicherheit ausreichend. Möglicherweise wird dieser Vorgang durch eine intramolekulare Spannung im Doppelstrang beschleunigt, so dass die DNA die Gyrase schnellstmöglich verlässt, sobald das C-Tor temporär geöffnet ist. Die Lebenszeit des geöffneten Zustands entspricht etwa der Länge eines

aussagekräftigen *Bursts*, so dass mehrfache Sprünge innerhalb eines Photonensignals äußerst selten auftreten. Nur in einem einzigen Fall konnte über einen Zeitraum von 40 ms direkt beobachtet werden, wie das C-Tor zunächst öffnet und 20 ms später wieder schließt. Versuche, die Aufenthaltsdauer und damit die Beobachtungszeit der markierten Proteine durch eine Erhöhung der Viskosität zu verlängern, führten zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Eine Zugabe von Glycerin zur Messlösung verlängert zwar die Photonenergebnisse, aber auch die Dauer einer Konformationsänderung nimmt im gleichen Maßstab zu. Eine Darstellung des Zyklus aus C-Tor-Öffnung und -Schließung ist mit der konfokalen smFRET-Methode folglich nicht zufriedenstellend möglich. Die Brown'sche Molekulardiffusion sorgt dafür, dass das Enzym den Laseranregungsfokus schon relativ bald wieder verlässt, nachdem es seine Konformation einmal geändert hat. Für eine längerfristige Beobachtung einzelner fluoreszierender Gyrase-moleküle müssen daher andere Techniken angewendet werden (siehe Ausblick in 5.4).

5.3.2.2 DNA-Tor

Die Cysteinmutanten GyrA oC S117C, T140C und S153C wurden zur Untersuchung des DNA-Tores der Gyrase eingesetzt. In allen drei Fällen stellte sich heraus, dass diese Region im symmetrischen GyrA₂-Dimer in der Regel geschlossen vorliegt. Die gemessenen Donor-Akzeptor-Abstände korrelieren mit den Erwartungswerten aus der PDB-Struktur⁷, die ebenfalls eine geschlossene Konformation anzeigt. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da die Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten im Kernbereich für die Stabilität der Gesamtstruktur notwendig ist. Die Zugabe von GyrB zur Bildung des aktiven Tetramers hat keinen Einfluss auf die DNA-Tor-Orientierung. Die Mutante GyrA oC S153C wurde für diese weiteren Experimente nicht mehr berücksichtigt, da sie nur eine sehr geringe Ausbeute an *Bursts* erzeugt. Möglicherweise ist die Detektionseffizienz in diesem Fall sehr schwach; oder die Farbstoffe sind sterisch ungünstig in der Nähe von Proteinseitengruppen platziert. Aus den vorliegenden smFRET-Daten und unter Berücksichtigung von biochemischen Erkenntnissen ist davon auszugehen, dass von den drei Gyrasen nur das N-Tor im Grundzustand, d. h. in Abwesenheit von Substraten, geöffnet ist. Die Zugabe von DNA (pUC18 bzw. Kalbsthymus-DNA) und Nukleotiden (ATP bzw. AMPPNP) führt zu keiner dauerhaften Konformationsänderung des DNA-Tores. In allen FRET-Histogrammen ist lediglich der schon bekannte Zustand sichtbar, während ein zweites Maximum, das ein offenes Tor anzeigen würde, nicht erkennbar ist. Eine Plasmidbindung löst zwar eine deutliche Bewegung der CTD von GyrA aus (5.3.2.4), aber der gesamte N-terminale Teil dieser Untereinheit verbleibt aus Stabilitätsgründen in derselben Orientierung. Das DNA-Tor verhält sich in Einzelmolekülstudien, insgesamt betrachtet, sehr ähnlich wie das C-Tor. Beide Regionen sind ein Teil der gleichen überaus stabilen GyrA₂-Kernstruktur, die u. a. die Aufgabe hat, den Zusammenhalt des Tetramers sicherzustellen. Multiparameteranalysen zeigen ebenso bei den DNA-Tor-Messungen (auch in S153C), dass alle FRET-Signale den tatsächlichen Zustand des Enzyms in der Probenlösung angeben.

Während des Nukleotidzyklus tritt nachweisbar eine G-DNA-Spaltung und eine reversible Öffnung des DNA-Tores auf⁴³. Dieser zweite Konformationszustand konnte in einer Betrachtung der Zeitdiagramme von einzelnen Photonenergebnissen sichtbar gemacht werden. Bei der Position GyrA oC T140C treten (ebenso wie bei den drei C-Tor-Mutanten) seltene *Bursts* auf, die einen definierten Sprung zwischen zwei FRET-Ebenen vollziehen. Diese Übergänge finden innerhalb von 1 ms statt und konnten nur in Anwesenheit von ATP und DNA beobachtet werden. Der gemessene Distanzunterschied zwischen beiden Konformationen (etwa 2,6 nm) ist für eine Passage des T-Segments (Durchmesser 2,0 nm) durch das geöffnete DNA-Tor sicherlich ausreichend. Die Tatsache, dass die offene Konformation nur in einzelnen *Bursts*, aber nicht in FRET-Histogrammen erkennbar ist, hat zwei Gründe: Einerseits tritt auch hier das Problem der unvollständigen Sättigung des Proteins mit den Bindungspartnern auf (5.3.2.1). Nur ein bis zwei Drittel der markierten GyrA-Untereinheiten liegen unter den gegebenen Voraussetzungen als Bestandteil eines aktiven Tetramers vor und haben gleichzeitig DNA und ATP zur Verfügung. Dieser Anteil ist kaum noch zu erhöhen, da die eingesetzte DNA-Menge an der oberen sinnvollen Grenze liegt. Eine weitere Zugabe erhöht die Sättigung wegen des ungünstigen K_D (GyrA/DNA) nur um wenige Prozent, während gleichzeitig die störenden Hintergrundzählraten stark zunehmen würden. Der zweite Grund für das Fehlen der offenen Konformation in den Histogrammen ist die Tatsache, dass das DNA-Tor während des Nukleotidzyklus hauptsächlich geschlossen ist. Die smFRET-Messungen deuten unter Berücksichtigung des beschriebenen Sättigungsproblems an, dass der zeitliche Anteil des offenen Zustands unterhalb von 10 % liegt. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Bevorzugung der geschlossenen Konformation erstmals auf Einzelmolekülebene durch eine direkte intramolekulare Abstandsmessung stichhaltig nachgewiesen werden. Der energetisch ungünstige offene DNA-Tor-Zustand ist (analog zum C-Tor) sehr kurzlebig und wird schnellstmöglich rückgängig gemacht, sobald das T-Segment die G-DNA passiert hat.

Messungen mit Gyrasehemmern, die das offene DNA-Tor stabilisieren sollen, führten nicht zu einem entsprechenden Ergebnis. Chinolone binden hochaffin an die freien DNA-Enden, die nach der Spaltung der G-DNA entstehen, und sorgen so für eine Arretierung der geöffneten Konformation. Die Inhibitoren hemmen aber nicht alle Gyrasevertreter gleichartig, sondern zeigen jeweils eine spezifische Wirkung gegen einzelne Topo-II-Unterklassen bzw. nur in bestimmten Bakterien, während homologe Enzyme aus anderen Organismen davon unberührt bleiben. Die negativen smFRET-Ergebnisse mit Oxolinsäure sind leicht erklärbar, da diese Substanz nur die Gyrase in gram-negativen Organismen wie *E. coli*, aber nicht in gram-positiven Formen wie *Bacillus subtilis* hemmt^{35,110}. Ciprofloxacin wirkt gegen die Gyrase aus *E. coli*¹¹¹ bzw. aus *Mycobacterium*^{86,112}, während in Kokken nicht das entsprechende Enzym, sondern die Topo IV das primäre Angriffsziel darstellt³⁷. Auch dieser Inhibitor zeigt in den Einzelmolekülstudien keinen Einfluss auf die Konformation des DNA-Tores. Für Sparfloxacin wird dagegen ein deutlicher Effekt auf die Gyrase aus *Streptococcus pneumoniae* (gram-positiv) beschrieben³⁷. Die vorliegenden

smFRET-Ergebnisse lassen vermuten, dass beide Gyrasehemmer sehr spezifisch und daher nicht in der Lage sind, das nah verwandte *Bacillus*-Enzym zu blockieren. Auch innerhalb der gram-positiven Untergruppe bestehen also deutliche strukturelle oder mechanistische Unterschiede bei den einzelnen homologen Gyrasevertretern, die sich in einer Wirkungsspezifität der verschiedenen Chinolone bemerkbar machen. Für weitere FRET-Messungen wäre der Inhibitor Clinafloxacin interessant, dem eine deutlich erhöhte Wirksamkeit gegen die Gyrase aus verschiedenen gram-positiven Organismen nachgesagt wird¹¹³. Eine Stabilisierung der offenen DNA-Tor-Konformation (in *E. coli*) wurde auch Calciumionen in Abwesenheit von Mg^{2+} zugeschrieben^{25,49}. Da die entsprechenden smFRET-Histogramme ebenfalls kein geöffnetes DNA-Tor in *Bacillus* anzeigen, besteht die Möglichkeit, dass auch Ca^{2+} spezifisch gegen das *Escherichia*-Enzym, aber nicht gegen die homologe Gyrase aus dem gram-positiven Bakterium *B. subtilis* wirkt.

Die Literatur zu Einzelmoleküluntersuchungen mit Gyrase ist bislang sehr überschaubar. Experimente mit einer magnetischen Pinzette^{44-46,114,115} untersuchten die Topoisomerisierung des Plasmids und brachten neue Einsichten in den proximalen und distalen T-DNA-Transfer, aber nicht in die Orientierung des DNA-Tores. Die einzige vergleichbare Veröffentlichung beschreibt FRET-Messungen mit einem doppelmarkierten 28-bp-dsDNA-Fragment und der Topoisomerase II aus *Drosophila*^{116,117}. In diesen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wird konstatiert, dass das DNA-Tor in ATP-Anwesenheit bei etwa 50 % der Enzym-Oligofragment-Komplexe in der Probe geöffnet ist; und dass während des Nukleotidzyklus gespaltene und religierte DNA nahezu in einem 1:1-Verhältnis vorliegen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu biochemischen Messungen, denen zufolge der geschlossene Grundzustand klar dominiert. Spaltungstests mit prokaryotischen Gyrasevertretern^{31,112} bzw. mit der eukaryotischen Topo II aus Hefe⁴² zeigen, dass das Gleichgewicht stark auf der Seite des ringförmigen Plasmids und damit des geschlossenen DNA-Tores liegt. Bei Experimenten mit *Bacillus*-Gyrase und kurzkettiger 60-bp-dsDNA liegt der Anteil der Spaltfragmente (nach einer EtBr-Färbung) sogar unter der Nachweisgrenze, d. h. maximal 1 % der Enzymmoleküle lagen bei Reaktionsabbruch in einer geöffneten Konformation vor. Ein Spaltungstest in der 28-bp-dsDNA-Studie¹¹⁶ ergab einen ähnlichen Prozentsatz. *Steady-state*-FRET-Messungen mit *Bacillus*-Gyrase geben ebenfalls keine Hinweise auf eine Spaltung des markierten 60-bp-Fragments und bestätigen daher die Ergebnisse aus den Oligonukleotid-Spaltungstests. Die beiden Farbstoffe befinden sich zwar außerhalb der vorgesehenen enzymatischen Bindestelle – allerdings wurde bereits beschrieben, dass die besagte Sequenz⁴⁷ vermutlich nicht spezifischer ist als eine zufällige Basenanordnung (5.1.3.1). Die Gyrase hätte das Substrat folglich theoretisch auch zwischen den beiden Fluorophoren spalten können, was in den ssFRET-Experimenten nicht detektiert wurde. Die konfokalen Einzelmolekülmessungen in der vorliegenden Arbeit bestätigen die bekannten biochemischen Ergebnisse, wonach ein offenes DNA-Tor der Ausnahmezustand im Nukleotidzyklus ist.

5.3.2.3 N-Tor

Einzelmolekülstudien über die Konformationsdynamik am N-Tor der Gyrase waren nicht erfolgreich. Für smFRET-Messungen ist eine weitreichende Verdünnung der markierten Probe in den picomolaren Bereich erforderlich, da sich bei deutlich höheren Konzentrationen mehrere fluoreszierende Moleküle im konfokalen Volumen aufhalten würden. Dies hätte schließlich zur Folge, dass jeglicher Förster-Transfer vom Hintergrundsignal vollständig überlagert wäre. In Vorexperimenten wurde bereits nachgewiesen, dass man eine 75-pM-Lösung von doppelmarkiertem Protein herstellen sollte, um möglichst aussagekräftige FRET-Histogramme zu erhalten. GyrB liegt unter diesen Voraussetzungen, wie auch bei jeder anderen Konzentration, als Monomer mit einem gekoppelten Farbstoff vor. Mischt man nun 75 pM einzelmarkiertes GyrB mit einem hohen Überschuss an GyrA (2 μM ; d. h. 1 μM GyrA₂), so liegen im Gleichgewichtszustand in der Lösung nur 37 fM A₂B₂ vor, das mit zwei Fluorophoren verbunden ist und daher einen Energietransfer ausführen kann (Abb. 46 links in 4.3.4.2). Dieser Wert stammt aus einer Simulation der Gyraseoligomerisierung unter Verwendung der beiden Dissoziationskonstanten, die über eine Serie von Fluoreszenzanisotropietitrationen ermittelt wurden. Nur etwa 0,1 % der GyrB-Untereinheiten bilden also in Anwesenheit von GyrA das erwünschte enzymatisch aktive Tetramer. Gleichzeitig entstehen 46 pM inaktive A₂B-Trimere, die zudem nur einen Farbstoff besitzen und daher keinen Förster-Transfer ausführen können. Etwa 29 pM der eingesetzten GyrB-Monomere gehen im Gleichgewicht überhaupt keine Bindung mit anderen Untereinheiten ein. Bei einer GyrA₂-Konzentration, die höher bzw. deutlich niedriger als 1 μM liegt, ist sogar mit noch weniger A₂B₂ zu rechnen. Der Versuch, durch das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon AMPPNP eine stabile GyrB-Dimerisierung einzuleiten und anschließend unter Zugabe von GyrA₂ das aktive Tetramer herzustellen, war ebenfalls nicht erfolgreich: Die Bindungskonstante für die nukleotidinduzierte Assoziation von zwei GyrB-Untereinheiten liegt im μM -Bereich und damit deutlich über den 75 pM, die für smFRET-Experimente notwendig sind. Die beschriebenen Interaktionsverhältnisse sorgen für unlösbare Probleme bei Einzelmolekülmessungen am N-Tor der Gyrase: GyrB im picomolaren Bereich bildet unabhängig von der GyrA-Konzentration nur femtomolare A₂B₂-Mengen, die weit unter der Nachweisgrenze des Systems liegen. Aus diesem Grund sind leider alle konfokalen smFRET-Messungen mit markiertem GyrB grundsätzlich zum Scheitern verurteilt.

Die Oligomerisierungssimulation zeigt aber auch, dass smFRET-Messungen mit doppelmarkiertem GyrA prinzipiell erfolgversprechend sind. Eine Mischung aus 75 pM GyrA (d. h. 37,5 pM GyrA-Dimer) und 2 μM GyrB bildet im Gleichgewichtszustand etwa 37 pM A₂B₂ aus, so dass ungefähr 99 % aller markierten Untereinheiten als Bestandteil eines aktiven Gyraasettramers vorliegen (Abb. 46 rechts in 4.3.4.2). Unerwünschte Trimere werden unter diesen Voraussetzungen so gut wie überhaupt nicht gebildet. Die Eigenschaften der Oligomerisierung von GyrA und GyrB haben also eine sehr günstige Auswirkung auf

Messungen am C-Tor, am DNA-Tor sowie an der C-terminalen Domäne von GyrA, während N-Tor-Studien mit dem vorliegenden konfokalen Laseraufbau nicht möglich sind.

5.3.2.4 C-terminale Domäne von GyrA

In den Einzelmolekülexperimenten an der C-terminalen Domäne von GyrA⁸ konnte eine Änderung der Konformation beobachtet werden. Eine statistische Doppelmarkierung an der Position K594C mit Alexa488 und Alexa555 ($R_0 = 7,0$ nm) führt zunächst zu einem Transfersignal, das einen Donor-Akzeptor-Abstand von 8 nm andeutet. Koppelt man dieselben Fluorophore an die Mutante E726C, so ergibt eine smFRET-Messung eine Farbstoffdistanz von 10 – 11,5 nm. Die CTD von GyrA liegt somit in Abwesenheit von DNA im Grundzustand vor. Eine entsprechende Studie mit dem homologen Enzym aus *E. coli* postuliert, dass die CTD unmittelbar am C-Tor-Bereich anliegt, solange sie keine Interaktion mit einem Substrat eingeht¹⁶ (siehe auch Schema in Abb. 2). Dieses computergestützte Modell sagt voraus, dass im GyrA₂-Dimer die äquivalenten Aminosäuren K594 bzw. E726 7,4 bzw. 12,9 nm voneinander entfernt sind. Diese theoretischen Abstände stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit gut mit den K594C-Werten überein, d. h. die Röntgenstreuexperimente korrelieren mit den smFRET-Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit. Der Vorteil der Einzelmolekülmethode besteht in der Möglichkeit, an beliebigen Positionen exakte intramolekulare Abstände direkt zu bestimmen. Nach einer Zugabe von Plasmid-DNA verschwindet das K594C-Transfersignal bei $E_{\text{FRET}} = 0,30$, während gleichzeitig ein neues Maximum bei 0,10 entsteht. Durch die Wechselwirkung mit dem Liganden findet also eine Änderung der Konformation statt, woraufhin die äquivalenten Cysteine im GyrA₂-Dimer ungefähr 10 nm voneinander entfernt sind. Eine Multiparameteranalyse unter Einbeziehung der Alexa488-Lebensdauer stützt diese Beobachtung: In den entsprechenden 3D-Contourdiagrammen ist klar erkennbar, dass sämtliche Energietransfersignale in den CTD-Messungen auf reale Förster-Übergänge zurückzuführen sind.

Einzelmolekülexperimente mit der zweiten Position E726C lassen keine eindeutige DNA-induzierte Änderung erkennen. Bei diesen Messungen muss berücksichtigt werden, dass eine FRET-Detektion nur bis etwa 9 nm sinnvolle intramolekulare Abstandsbestimmungen zulässt, da der Förster-Transfer oberhalb dieser Grenze zunehmend vom 0-Signal im Histogramm überlagert wird. Transfereffizienzen im Bereich von 0,05 – 0,1 sind für eindeutige Aussagen über eine Konformationsdynamik des Enzyms ungeeignet. Es besteht also sehr wohl die Möglichkeit, dass sich der Donor in GyrA oC E726C nach einer DNA-Einwirkung ebenfalls vom Akzeptor entfernt, nur kann dieser Vorgang mit der vorliegenden Methode nicht mehr nachgewiesen werden. Grundsätzlich ist die CTD von GyrA nur eingeschränkt für smFRET-Untersuchungen geeignet, da sich die Dynamik weitgehend oberhalb des sinnvollen Abstandsbereichs von 3 – 9 nm abspielt (siehe auch Abb. 5). Mit dem Donor-Akzeptor-Paar Alexa488/Alexa555 wurde bereits ein Farbstoffsystem eingesetzt, das einen relativ hohen Förster-Abstand von 7,0 nm besitzt. Der

R_0 -Wert für vergleichbare Fluorophore aus der Alexa-Reihe wie auch für TMR liegt in der Regel zwischen 5 – 6,5 nm. Ideal wäre eine statistische Doppelmarkierung der CTD mit dem Donor Europiumkryptat und dem Akzeptor XL665¹¹⁸, die beide auch mit reaktiven Maleimidgruppen für eine Kopplung an SH-Gruppen erhältlich sind. Dieses Farbstoffpaar weist neben einer bemerkenswerten 313-nm-Stokes-Verschiebung des Lanthanoidchelatkompleses⁶⁰ ($\lambda_{ex} = 307$ nm) einen außerordentlich hohen Förster-Radius von 9,0 nm auf. Die Abstandsdynamik der C-terminalen Domäne sollte damit (zumindest im Fall von K594C) quantitativ eindeutig bestimmbar sein. Allerdings sind auch die smFRET-Messungen mit Alexa555 gut geeignet, um das postulierte CTD-Modell aus den Röntgenstreudaten¹⁶ auch in Anwesenheit von DNA zu stützen: Die intramolekulare Abstandszunahme in K594C korreliert mit der Vorstellung, dass die C-terminale Domäne nach einer Ligandenbindung vom C-Tor wegklappt und daraufhin den GyrA-Kernbereich bei der Superspiralisierung des Plasmids unterstützt. Das C-Tor bleibt dagegen weiterhin geschlossen, wie die smFRET-Messungen in dieser Region demonstrieren. Nach einer Zugabe von ATP zur CTD-Probe kann keine weitere Veränderung der Donor-Akzeptor-Distanz festgestellt werden. Die nukleotidinduzierte GyrB-Dimerisierung führt zu einer Konformationsdynamik im Gyrase tetramer, die auch eine Auswirkung auf den gegenseitigen Abstand der beiden C-terminalen GyrA-Domänen haben könnte. Wie bereits erwähnt, sind FRET-Effizienzen unterhalb von 0,1 für exakte Distanzmessungen jedoch ungeeignet. Daher kann anhand der vorliegenden smFRET-Daten mit Alexa555 nicht beurteilt werden, ob eine ATP-Zugabe eine Bewegung der CTD auslöst oder nicht.

Die Ergebnisse der Einzelmolekülstudien mit Alexa488 und TMR sind widersprüchlich. Die Messungen an der Position K594C stimmen mit dem bereits beschriebenen CTD-Modell¹⁶ sehr gut überein: Der ermittelte Donor-Akzeptor-Abstand von 7 – 8 nm korreliert mit dem Erwartungswert von 7,4 nm und bestätigt, dass die Domäne in Abwesenheit von DNA am C-Tor anliegt. Wegen des vergleichsweise niedrigen Förster-Radius von 5,4 nm kann jedoch nicht beurteilt werden, ob in Anwesenheit von Plasmid bzw. von ATP eine CTD-Konformationsdynamik einsetzt. Koppelt man Alexa488 und TMR an E726C, so ergibt sich im Histogramm zunächst erwartungsgemäß ein FRET-Maximum im Bereich des 0-Signals. Die plötzliche Verschiebung dieses Zustands nach der Zugabe von DNA auf $E_{FRET} = 0,87$ ist eigenartig und konnte nicht aufgeklärt werden. Der entsprechende Farbstoffabstand (nur 3,9 nm) ist sowohl mit allen übrigen smFRET-Daten als auch mit dem CTD-Modell aus der Röntgenstreuanalyse nicht vereinbar. Eine Multiparameteranalyse schließt eine irreversible Bleichung des Donors während der Messung aus, so dass es sich vermutlich um ein reales FRET-Signal handelt. Möglicherweise befindet sich TMR in GyrA oC E726C nach der plasmidinduzierten Gyrase-Konformationsänderung an einer besonders exponierten Stelle im Enzymkomplex. Der relativ hydrophobe Farbstoff könnte daraufhin eine unspezifische Wechselwirkung mit einer ähnlich unpolaren Region von GyrA bzw. GyrB eingehen, woraufhin im weiteren Verlauf eine unerwünschte gegenseitige Annäherung von Donor und Akzeptor denkbar wäre. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass GyrA oC E726C auch nach einer statistischen

Doppelmarkierung mit Alexa488 und TMR eine WT-artige DNA-Modifikationsaktivität aufweist. Eine alternative Erklärung für das Signal bei $E_{\text{FRET}} = 0,87$ wäre eine ungünstige Donor-Detektionseffizienz an dieser Position – der hohe γ -Wert (4.7.2) spricht ebenfalls dafür. Weitere Einzelmolekülexperimente mit einzel- und doppelmarkierten Proben wären erforderlich, um diesen Sachverhalt eindeutig aufzuklären.

5.4 Ausblick

Die biophysikalische Charakterisierung der Gyrase aus *Bacillus subtilis* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitgehend abgeschlossen. Der Schwerpunkt des Projekts sollte in der Zukunft in der Planung, Durchführung und Optimierung weiterer Einzelmolekül-FRET-Methoden liegen, um das Wissen über die Funktionsweise des Enzyms zu vertiefen.

Das Hauptproblem in den bisherigen smFRET-Messungen war die Tatsache, dass die Beobachtungszeit einzelner Moleküle wegen der freien Diffusion im konfokalen Volumen relativ gering ist. Da der Nukleotidzyklus eine Länge von ungefähr einer Sekunde hat, reicht eine Aufenthaltsdauer von maximal 20 ms für eine vollständige Untersuchung der Konformationsdynamik nicht aus. Es existieren verschiedene Techniken, um diese Beobachtungszeit signifikant zu verlängern: ABEL („Anti-Brown’sche Elektrokinetikfalle“) ist ein System, bei dem ein einzelnes fluoreszierendes Molekül in einer speziellen Reaktionskammer künstlich festgehalten wird, um eine längere Betrachtungsdauer zu ermöglichen¹¹⁹. Die Brown’sche Bewegung wird dabei durch vier Elektroden unterdrückt, die dem Zielobjekt entgegengesetzte elektrokinetische Kräfte zufügen. Durch eine Verfolgung der molekularen Trajektorie mittels Fluoreszenzmikroskopie kann in Echtzeit ermittelt werden, welche Elektrode zu welchem Zeitpunkt für die Rückführung des markierten Proteins in den Fokus eingesetzt werden muss. Nach Angabe der Autoren kann das Objekt mehrere Sekunden lang konstant am selben Ort festgehalten werden. In dieser Zeit durchläuft das Enzym mehrere Runden des Reaktionszyklus, so dass eine repetitive Abfolge der Konformationsdynamik aufgezeichnet werden könnte. Ein alternativer Ansatz sieht die Herstellung von „Femtoliter-Containern“ in einer hydrophoben Fluorocarbonmatrix vor¹²⁰. Durch eine kurze Ultraschallbehandlung können winzige Puffertröpfchen erzeugt werden, die bei einer geeigneten Verdünnung einzelne markierte Proteine enthalten. Diese μm -Behälter sollten rein rechnerisch eine Diffusionszeit aufweisen, die etwa eine Größenordnung über derjenigen des freien Proteins liegt. Die Beobachtungsdauer eines fluoreszierenden Moleküls im Laserfokus wäre damit bereits verzehnfacht. Der Unterschied im Brechungsindex zwischen der Matrix (FC-77) und den wässrigen Tröpfchen ermöglicht darüber hinaus eine Fixierung durch eine optische Pinzette, die die Aufenthaltsdauer im konfokalen Volumen in den Sekundenbereich anheben würde. Bei beiden genannten Verfahren wird die Beobachtungszeit also lediglich von der Photobleichung der eingesetzten Farbstoffe limitiert. Sie haben darüber hinaus den großen Vorteil, dass sich das Protein im typischen Reaktionspuffer aufhält und seinen

Nukleotidzyklus wie gewohnt durchlaufen kann. Diese Methoden sind daher erfolversprechender als eine schlichte Erhöhung der Viskosität durch Glycerin, die sich negativ auf die Beweglichkeit der Enzymdomänen auswirkt und zu keinen brauchbaren Ergebnissen geführt hat.

Neben der konfokalen Untersuchung sollte die Gyrase auch mit einem TIR-FRET-System erforscht werden⁶³. Der entsprechende Aufbau mit einem Totalreflexionsmikroskop und einer CCD-Kamera ist weitgehend fertiggestellt und muss nur noch kalibriert werden. Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Moleküle zunächst an Bindestellen auf einer Glasplatte fixiert und anschließend mit einem Laserstrahl angeregt. Das Phänomen der Totalreflexion an der Grenze zwischen Glas und Wasser ermöglicht dabei eine vollständige Rückkehr des Anregungslichts in dasselbe Objektiv. Hinter der Phasengrenze entsteht ein sogenanntes evaneszentes Feld, d. h. eine elektromagnetische Welle, die im Bereich von 200 nm exponentiell abnimmt und selektiv die fluoreszierende Probe in Glasnähe anregt. Durch die räumliche Einschränkung des Anregungsfeldes kann die störende Hintergrundzählrate deutlich reduziert werden. Die Fluoreszenz wird durch dasselbe Objektiv wieder eingefangen, in einen Donor- und einen Akzeptorkanal getrennt und an zwei verschiedene Bereiche eines CCD-Sensors projiziert. Dadurch können einzelne markierte Proteine wiederum bis zu mehreren Sekunden lang direkt betrachtet werden, bis einer der beiden Farbstoffe wegen Bleichung ausfällt. In dieser Zeit kann das Enzym mehrere vollständige Nukleotidzyklen nacheinander durchlaufen. Koppelt man z. B. die beiden Farbstoffe an die Gyrasemutanten GyrA oC N399C, T408C oder Q445C, so kann mit dem TIR-FRET-Aufbau die komplette Konformationsdynamik des C-Tores verfolgt werden. Die äußerst lange Beobachtungszeit würde die Abfolge sowie die Kinetik der Toröffnung und -schließung während des gesamten Reaktionszyklus in einem einzigen Zeitdiagramm darlegen. Auch die Bewegung des DNA-Tores kann auf diese Art und Weise untersucht werden, was aussagekräftiger ist als die Betrachtung von kurzen 20-ms-Bursts in konfokalen Messungen. Bei der direkten Kopplung der Gyrase auf eine Oberfläche ist zu berücksichtigen, dass das Enzym danach unter Umständen in seiner Funktion sterisch gehindert sein könnte. Sinnvoller ist es daher, das DNA-Substrat an die Glasplatte zu binden, damit sich das markierte Protein anlagern und betrachtet werden kann. Die Kopplung kann beispielsweise mit Hilfe eines Oligofragments erfolgen, welches das Plasmid über zwei Biotin-Streptavidin-Interaktionen¹²¹ stabil mit der Oberfläche verbindet. Dazu wäre es erforderlich, in das langkettige Substrat eine kurze Basensequenz zu klonieren, die intern mit einem Biotinmolekül bestückt ist. Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines doppelsträngigen Plasmids mit einem bestimmten Sequenzabschnitt, der zur Bildung einer regionalen Tripelhelix neigt¹²². Auf diese Art könnte die Verbindung zu einem kurzen Oligofragment hergestellt werden, das sich am anderen Ende wiederum mit Biotin und Streptavidin an der Glasplatte befestigen lässt. Die vorgestellten TIR-Experimente ermöglichen eine effektive und langfristige Beobachtung des C- und des DNA-Tores der Gyrase und tragen dazu bei, den katalytischen Zyklus des Proteins weiter aufzuklären. Auch der Zusammenhang zwischen der energieliefernden ATP-

Hydrolyse und der anschließenden DNA-Topoisomerisierung durch das Enzym kann in solchen Studien sicherlich nachhaltiger geklärt werden als in zeitlich eingeschränkten konfokalen Messungen.

Mit dem vorliegenden Einzelmolekülaufbau kann die C-terminale Domäne von GyrA noch eingängiger betrachtet werden. Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass nach einer Zugabe von DNA eine deutliche Konformationsänderung einsetzt. Allerdings ist die exakte intramolekulare Abstandsmessung durch die FRET-Reichweite von Alexa488 und Alexa555 ($R_0 = 7,0$ nm) eingeschränkt. Die schon im Grundzustand weit voneinander entfernten Domänen könnten daher mit weiteren Farbstoffpaaren statistisch doppelmarkiert und untersucht werden. Am geeignetsten erscheint eine Kopplung mit dem Donor Europiumkryptat ($\lambda_{\text{ex}} = 307$ nm) und dem Allophycocyanin XL665 als Akzeptor ($R_0 = 9,0$ nm)¹¹⁸. Die technischen Voraussetzungen für diese Messungen sind bereits vorhanden; es müssten lediglich der Frequenzverdrehfacher in den Strahlengang eingeführt und passende Wellenlängenfilter im Detektionsbereich installiert werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen CTD-Ergebnisse könnten auf diese Art und Weise bestätigt und ausgebaut werden. Daneben sollte zur Sicherheit noch eine weitere (voll aktive und zugängliche) GyrA-Mutante hergestellt werden, bei der die Farbstoffe im DNA-freien Zustand einen vergleichbaren Abstand wie in K594C (7,4 nm) aufweisen. Die vorliegende Position E726C mit einer Donor-Akzeptor-Distanz von 12,9 nm lässt sich sicherlich auch mit einem höheren R_0 -Wert nur eingeschränkt untersuchen. Die vollständige CTD-Konformationsabfolge eines einzelnen fluoreszierenden Moleküls während eines Reaktionszyklus lässt sich wiederum in ABEL- oder in TIR-FRET-Messungen darstellen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, statt der Gyrase das DNA-Substrat mit Farbstoffen zu markieren¹¹⁶. Damit umgeht man proteinspezifische Probleme wie die unvollständige Kopplungseffizienz, das Vorhandensein von Nur-Donor-Spezies, die positionsabhängige spektrale Verschiebung sowie den hohen zeitlichen und arbeitstechnischen Aufwand von der PCR-Mutagenese und Reinigung bis hin zur Optimierung der Markierungsreaktion. Für Einzelmolekülmessungen könnte ein doppelmarkiertes dsDNA-Substrat angefertigt werden, in dem die beiden Farbstoffe links und rechts von einer mutmaßlichen Enzymbindestelle angebracht sind. Diese Daten könnten die bereits vorhandenen DNA-Tor-Ergebnisse verifizieren und abrunden: Im Grundzustand sollte sich eine hohe FRET-Effizienz ergeben, während nach der G-Segment-Spaltung und anschließenden Toröffnung auch *Bursts* mit einem geringeren Transfer erscheinen sollten. Die Interaktion zwischen dem Protein und der markierten 60-bp-dsDNA könnte möglicherweise besser beschrieben werden als in Versuchen, bei denen beide Farbstoffe mit dem Enzym verknüpft sind. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch der Einsatz von weiteren Gyrasehemmern (z. B. Clinafloxacin), die eine potenzielle Spezifität für das Enzym aus *B. subtilis* aufweisen¹¹³. Die Wirkung dieser Inhibitoren auf das Protein sollte außerdem in rein biochemischen Tests geklärt und quantifiziert werden. Für eine statistische Aussage zur DNA-Tor-

Öffnung in Ab- bzw. Anwesenheit von Substraten oder Hemmstoffen sollte die Anzahl aller durchgeführten konfokalen smFRET-Messungen verzehnfacht werden. Erst bei einer Vorlage eines genügend umfangreichen Datenmaterials kann die Frage nach dem Einfluss dieser Komponenten auf die Orientierung des DNA-Tores eindeutig beantwortet werden. Gleiches gilt auch für das C-Tor, bei dem ebenfalls nur sehr selten *Bursts* sichtbar sind, die eine offene Konformation andeuten.

Die Untersuchung des N-Tores ist sehr problematisch, da bei GyrB-Konzentrationen im pM-Bereich fast ausschließlich unbrauchbare einzelmarkierte Trimere gebildet werden. Bei einer Erhöhung der GyrB-Menge würde der fluoreszierende Hintergrund die Transfersignale vollständig überlagern. Eine Abhilfe kann die Herstellung eines künstlichen GyrBA-Fusionsproteins schaffen: Die Gene für die beiden Untereinheiten werden mit einer kurzen Verknüpfungssequenz in dasselbe Plasmid kloniert und gemeinsam überexprimiert. Das Ergebnis ist eine Untereinheit mit knapp 1500 Aminosäuren, die ein gyraseähnliches Homodimer bilden könnte. Als Vorlage für diese Idee dient die eukaryotische Topoisomerase II aus der Hefe. Dieses Enzym besteht aus zwei identischen Untereinheiten, wobei die N-terminalen Monomerenden dem bakteriellen GyrB und die C-Seiten GyrA entsprechen. Würde es gelingen, ein solches *Bacillus*-GyrBA-Fusionsprotein herzustellen, das eine biochemische Aktivität zeigt, so könnten mit diesem System Aussagen über das N-Tor der nativen Gyrase getroffen werden. Aufgrund der hohen Autoaffinität von GyrA ist davon auszugehen, dass auch GyrBA schon bei pM-Konzentrationen stabile Homodimere bilden würde, die doppelmarkiert und somit FRET-tauglich wären. In der Literatur wird ein erfolgreicher Versuch beschrieben, GyrB und GyrA aus *Escherichia* zu einem Enzym zu fusionieren, das Plasmid-DNA zumindest relaxieren kann¹²³. Bisherige Versuche, ein homologes GyrBA-Objekt mit den *Bacillus*-Untereinheiten herzustellen, führten zwar zu einer Überexpression des Homodimers – das Produkt ist jedoch nicht in der Lage, pUC18 zu relaxieren (persönliche Mitteilung von Andreas Schmidt, Universität Basel). Weitere Klonierungsversuche mit GyrB-GyrA-Verknüpfungssequenzen unterschiedlicher Länge könnten möglicherweise zu einem halbwegs aktiven N-Tor-Studienobjekt führen. Nach einer erfolgreichen GyrBA-Bildung wäre es notwendig, mehrere Cysteinmutanten in dieser Region ausfindig zu machen, die ebenso stabil und aktiv sowie für Farbstoffe zugänglich sind. GyrB C414S mit der Aminosäure C58 in N-Tor-Nähe kann sicherlich als Markierungsposition verwendet werden, aber zur Bestätigung dieser Messungen sollten unbedingt ein bis zwei weitere Cysteinmutanten in Einzelmolekülexperimente eingesetzt werden.

Elegantere und aussagekräftigere smFRET-Studien können mit ALEX (Alternierende Laserexzitation) durchgeführt werden¹⁰⁹. Bei dieser Methode wird parallel zum Hauptlaser ein zweiter unabhängiger Strahlgeber verwendet, der zeitversetzt bei einer höheren Wellenlänge den Akzeptor anregt. Das Detektionssystem erfasst somit nicht nur die direkte Donor- und die FRET-abhängige Fluoreszenz des Akzeptors, sondern auch die direkte FRET-unabhängige Emission des Akzeptormoleküls. Findet während

der Messung eine unerwünschte Farbstoffbleichung statt¹²⁴, so kann dieser Vorgang durch einen Vergleich aller drei Zeitdiagramme eindeutig ermittelt und in der Auswertung eliminiert werden. Störende Nebenprozesse können somit einfacher von interessanten FRET-Signalen unterschieden werden. Die große Stärke von ALEX ist jedoch die Fähigkeit, Nur-Donor-, Nur-Akzeptor- und gemischtmarkierte Komponenten voneinander zu trennen. So werden beispielsweise Proteine, die zwei Alexa488-Farbstoffe gebunden haben, vom akzeptoranregenden Laser nicht erfasst und infolgedessen bei der Evaluation nicht berücksichtigt. Mit ALEX können ferner alle relevanten FRET-Korrekturparameter – insbesondere die direkte Akzeptoranregung δ – exakt bestimmt werden. Die alternierende Lasermethode ermöglicht somit akkurate Einzelmolekülergebnisse, die nicht durch die beschriebenen Problemfaktoren beeinträchtigt sind. Eine leistungsfähige Weiterentwicklung dieser Technologie ist die ALEX-basierte Tripel-FRET-Analyse¹²⁵⁻¹²⁷, bei der die Probe mit einem Donor und zwei verschiedenen Akzeptoren markiert ist und abwechselnd von drei Lasern bestrahlt wird. Drei Detektionskanäle erfassen die Fluoreszenzemission der einzelnen Komponenten und ermöglichen nach einer Donoranregung zwei (unter Umständen sogar drei) gleichzeitige intramolekulare Abstandsmessungen. Die zusätzlichen Daten liefern wertvolle Informationen über die dreidimensionale enzymatische Konformationsbewegung, die bei zweifarbigen smFRET-Experimenten verborgen bleiben. Denkbar wäre z. B. eine statistische Doppelmarkierung des DNA-Tores in GyrA mit zwei verschiedenen Akzeptorfarbstoffen bei gleichzeitiger Verwendung eines einfach donormarkierten Oligonukleotids. Die Messung aller drei Abstandsänderungen nach einer Zugabe von ATP oder Inhibitor würde einen räumlichen Eindruck von der umfassenden molekularen Konformationsdynamik vermitteln, die der Gyrase-DNA-Komplex während des Reaktionszyklus durchläuft.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die katalytische Funktion der Gyrase aus *Bacillus subtilis* untersucht. Dieses bakterielle Topoisomerase-IIa-Enzym ist in der Lage, superspiralisierte Plasmid-DNA ATP-unabhängig zu relaxieren und umgekehrt unter ATP-Verbrauch negative Superhelices einzuführen. Die beiden Untereinheiten GyrA und GyrB wurden zunächst nach einer Etablierung und Optimierung des Reinigungsprotokolls hergestellt und anschließend zu einer funktionalen tetrameren Gyrase rekonstituiert. In biochemischen Tests wurde geklärt, dass sich das *Bacillus*-Enzym bezüglich Topoisomerbildung und Oligomerisierung genauso verhält wie das bereits gut erforschte Homolog aus *E. coli*. In der Folgezeit wurde der Nukleotidzyklus der Gyrase aus *B. subtilis* eingehend untersucht und quantifiziert. Dissoziationskonstanten für die Affinität zwischen den einzelnen Untereinheiten sowie zwischen dem Enzym und den Substraten wurden durch unterschiedliche Methoden ermittelt. Alle relevanten Michaelis-Menten-Parameter wurden schrittweise durch eine Reihe von optischen ATPase-Tests mit GyrB und seinen Liganden bestimmt. Die Untereinheit dimerisiert nach einer Nukleotidbindung und ist eine DNA-abhängige ATPase, wobei GyrB₂ die aktive Form des Enzyms darstellt. Durch kinetische Messungen konnten darüber hinaus Ratenkonstanten im katalytischen Zyklus des Enzyms erfasst werden. Bei diesen Experimenten stellte sich heraus, dass trotz der homologen Architektur einige mechanistische Unterschiede zwischen den einzelnen Gyrasevertretern aus verschiedenen Organismen existieren. Das *Bacillus*-Enzym zeigt beispielsweise eine deutlich geringere Affinität zu Plasmid-DNA als das Protein aus *Escherichia*, jedoch induziert der Ligand im ersten Fall wesentlich stärker die ATPase-Rate, so dass der Effekt unter dem Strich gleich ist. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Nukleotidzyklus ist bei *B. subtilis* die ATP-Hydrolyse, wogegen in *E. coli* die anschließende Dissoziation der Spaltprodukte ratenlimitierend ist. Der größte Unterschied ist die Kooperativität der ATPase-Untereinheiten: Während in *Escherichia* die Bindung von ATP an die erste Bindestelle die Anlagerung des zweiten Nukleotids vereinfacht, konnte in *Bacillus* in einer weitreichenden Untersuchung kein kooperatives Verhalten detektiert werden. Verschiedene mechanistische Wege führen also vergleichbar effektiv zum selben funktionellen Ziel. In Anisotropiemessungen wurde die Trimer- und Tetramerbildung der Gyrase-Untereinheiten zum ersten Mal überhaupt exakt quantifiziert. Damit ist es nun möglich, bei beliebigen Ausgangsmengen aller Komponenten den Tetrameranteil sowie die Substratsättigung vorherzusagen. Zur späteren Untersuchung des Reaktionszyklus wurden außerdem defiziente Mutanten hergestellt und ihre Unfähigkeit, ATP bzw. DNA zu spalten, in entsprechenden Tests bestätigt.

Neben diesen rein biophysikalischen Untersuchungen wurde die Gyrase für Einzelmolekül-FRET-Messungen an verschiedenen Stellen des Enzyms vorbereitet. Zunächst wurden native Cysteine unter Beibehaltung der vollen Aktivität entfernt. Eine Vielzahl von Mutanten mit neuen Cysteinen am C-, am N-, am DNA-Tor sowie an der C-terminalen GyrA-Domäne wurde hergestellt, gereinigt und auf ihre

Funktion überprüft. Ausgewählte Positionen wurden anschließend mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen statistisch doppelmarkiert. Diese Kopplung konnte für jede Mutante optimiert werden und führte stets zu sehr guten Ergebnissen. In einem konfokalen Einzelmolekül-FRET-Aufbau mit Einzelphotonendetektion wurde nach einer Etablierung der Messmethode der Förster-Transfer in den markierten Proteinen bestimmt. Bei dieser Technik wird der Donorfarbstoff durch Laserpulse angeregt, woraufhin das Molekül die Energie unter bestimmten Umständen strahlungsfrei an den Akzeptor übertragen kann, so dass dieser Fluoreszenz emittiert. Dieser Transfer ist stark abstandsabhängig und ermöglicht intramolekulare Distanzmessungen im Bereich von 2 – 9 nm. In den smFRET-Experimenten konnte zum ersten Mal direkt gezeigt werden, dass sowohl das C-Tor als auch das DNA-Tor der Gyrase im Grundzustand geschlossen sind. Eine hohe GyrA-Autoaffinität in diesen Bereichen führt dazu, dass auch nach einer Substratzugabe hauptsächlich die geschlossene Konformation vorliegt. Der offene Zustand des C- bzw. des DNA-Tores, der während des Nukleotidzyklus für einen Durchtritt der T-DNA benötigt wird, ist sehr kurzlebig und tritt auch nach einer Inhibitorzugabe nur bei wenigen Prozent einer Gyrasepopulation auf. Diese Konformation konnte folglich nicht in globalen Histogrammen, sondern lediglich bei einer Betrachtung einzelner Photonereignisse nachgewiesen werden. Dagegen führt die C-terminale Domäne von GyrA eine weitreichende Bewegung aus, sobald das markierte Enzym an dsDNA bindet. In Einzelmoleküluntersuchungen ist die ligandeninduzierte CTD-Abstandszunahme im symmetrischen GyrA₂-Dimer und der darauf folgende Rückgang des Förster-Transfers deutlich zu erkennen. Die smFRET-Studien am N-Tor der Gyrase waren dagegen nicht erfolgreich, da bei der notwendigen GyrB-Konzentration im pM-Bereich nur unbrauchbare einzelmarkierte A₂B-Trimere gebildet werden. Alle durchgeführten Experimente wurden durch eine Multiparameteranalyse unter Berücksichtigung der Donor-Lebenszeit verifiziert. Die Methoden zur Bestimmung des Förster-Radius sowie der relevanten smFRET-Korrekturfaktoren wurden etabliert und für mehrere Mutanten ausgeführt, um aussagekräftige Einzelmolekülergebnisse zu erzielen. Dabei stellte sich heraus, dass die spektralen Eigenschaften der gekoppelten Farbstoffe zu einem bestimmten Grad von der Position am Protein abhängen können. Schließlich wurden in FCS-Experimenten die Diffusion der Gyrase beleuchtet sowie in zeitaufgelösten Ensemblemessungen die Lebenszeit sowie die Anisotropie des Donorfluorophors untersucht.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit leisten einen Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise von bakteriellen Typ-II-Topoisomerasen. Neue Einblicke in den Mechanismus des *Bacillus*-Enzyms zeigen die Komplexität der ATP-abhängigen DNA-Topoisomerisierung sowie die Unterschiede zwischen den homologen Vertretern in verschiedenen Organismen. Zum ersten Mal überhaupt wurde die Konformationsdynamik der Gyrase in leistungsfähigen Einzelmoleküluntersuchungen direkt beschrieben und analysiert. Man darf gespannt sein, wie sich dieser Forschungsbereich in der Zukunft entwickelt.

7 Anhang

7.1 Auswertung der ssATPase-Tests

7.1.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Auswertung der ssATPase-Tests werden für jeden Reaktionsansatz die negativen Steigungen der A_{340} in Abhängigkeit von der Messdauer abgelesen. Die zeitlichen Absorptionsänderungen werden zunächst korrigiert, d. h. man zieht die ATP-Spontanhydrolyse ab, die in einem separaten Reaktionsansatz ohne Enzym bestimmt wird. Die Geschwindigkeit v der enzymatischen ATP-Hydrolyse berechnet sich durch die Gleichung (1)

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{340}}{\Delta t \cdot \varepsilon_{340} \cdot d}$$

bei einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ und einem NADH-Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{340} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Trägt man nun die ermittelten Geschwindigkeiten in Abhängigkeit von der variierten Substratkonzentration in einem Diagramm auf, so erhält man eine hyperbolische Sättigungskurve, aus der man durch eine Kurvenanpassung die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion v_{\max} bestimmen kann. Unter der Annahme des Reaktionsgleichgewichts (2)



mit den Komponenten $E = \text{Enzym}$, $S = \text{Substrat}$, $ES = \text{Enzym-Substrat-Komplex}$ und $EP = \text{Enzym-Produkt-Komplex}$ sowie den Ratenkonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 lässt sich daraus die Michaelis-Menten-Gleichung (3)

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

ableiten¹²⁸. v_{\max} ist die Geschwindigkeit der Hydrolyse bei Substratsättigung, während K_M die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit bezeichnet. Die Michaelis-Menten-Konstante entspricht nur dann der Dissoziationskonstante K_D (Enzym/Substrat), wenn die Dissoziation des Substrats deutlich schneller verläuft als die Produktbildung ($k_{-1} \gg k_2$). Weiterhin wird die Umsatzzahl k_{cat} definiert, d. h. die Anzahl der Substratmoleküle, die von einem Enzymmolekül in einer

Sekunde umgesetzt werden. Sie entspricht der Ratenkonstante k_2 in (2) und berechnet sich durch die Gleichung (4):

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]}$$

In weiteren ATPase-Testreihen wurde eine konstante sättigende ATP-Konzentration eingesetzt, während die Ligandenmenge (GyrA bzw. DNA) variiert wurde. Diese Versuche liefern K_M -Werte für die Systeme GyrB/GyrA sowie Gyrase/DNA. Sie werden als „apparent“ bezeichnet, weil GyrA bzw. DNA nicht die eigentlichen Substrate, sondern aktivitätsfördernde Bindungspartner von GyrB sind. Da diese Untereinheit auch in Abwesenheit von beiden Liganden eine intrinsische ATPase-Aktivität aufweist, muss in die Michaelis-Menten-Gleichung (3) ein Summand v_0 für die Anfangsgeschwindigkeit eingeführt werden (5):

$$v = v_0 + v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

7.1.2 Hill-Gleichung

Gyrase ist ein Tetramer der Form A_2B_2 und kann daher zwei Nukleotide gleichzeitig binden. Liegen zwei oder auch mehrere Bindungsstellen für ATP in einem Enzym vor, so besteht die Möglichkeit, dass sie sich kooperativ verhalten. In diesem Fall erleichtert (oder erschwert) die Bindung des ersten Substrats und die nachfolgende Konformationsänderung des Enzyms die Anlagerung des zweiten ATP-Moleküls. Bei starker Kooperativität liegen deshalb praktisch nur ATP-freie Enzyme E_2 und solche mit zwei Substraten E_2S_2 vor, während die Zwischenstufe E_2S selten vorkommt. Ein Enzymdimer mit nur einem Substrat würde entweder schnell von diesem dissoziieren oder direkt ein zweites binden. Die Michaelis-Menten-Gleichung (3) bzw. (5) aus 7.1.1 wird für die Kurvenanpassung um den Hill-Koeffizienten n zur Hill-Gleichung (1)

$$v = (v_0 +) v_{max} \frac{[S]^n}{[S]^n + K_M}$$

erweitert, die statt einer hyperbolischen Kurve einen S-förmigen Kurvenverlauf beschreibt. Dieser entsteht dadurch, dass bei niedriger Substratmenge die Zwischenstufe E_2S nicht auf ein zweites ATP trifft, um den Komplex E_2S_2 zu bilden. Die ATP-Hydrolyse findet in der Regel in E_2S langsamer statt als in E_2S_2 , so dass die ATPase-Kurve bei geringer Substratkonzentration mit einer leichten Verzögerung

ansteigt. Der Parameter n kann Werte zwischen 1,0 (nicht kooperativ) und der Anzahl der ATP-Bindestellen (stark kooperativ) annehmen, d. h. im Fall der Gyrase liegt der Maximalwert bei 2,0.

7.1.3 Kooperativitätsparameter

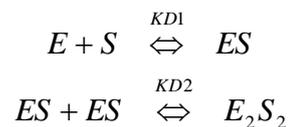
Eine alternative Möglichkeit zur Beschreibung der Kooperativität zweier Bindungsstellen verwendet den Kooperativitätsparameter r . Dieser besagt, dass das zweite Substrat r^{-1} mal besser vom Enzym gebunden wird als das erste. Die Gleichung¹²⁹, die ebenso wie die Hill-Gleichung eine S-Kurve beschreibt, verwendet die Dissoziationskonstante K_D (Enzym/Substrat) (1):

$$v = v_{\max} \frac{\frac{[S]}{K_D} + \frac{[S]^2}{r \cdot K_D^2}}{1 + \frac{2 \cdot [S]}{K_D} + \frac{[S]^2}{r \cdot K_D^2}}$$

K_D ist die Dissoziationskonstante für das erste Substrat, während $r \cdot K_D$ diejenige für das zweite ATP bezeichnet. Der Parameter r kann Werte zwischen 0 (stark kooperativ) und 1 (nicht kooperativ) annehmen.

7.1.4 Einfaches Bindungsschema

Die Bildung des aktiven Enzym-Substrat-Komplexes E_2S_2 aus den Komponenten E (Enzym) und S (Substrat) wird mit einem einfachen Bindungsmodell beschrieben, das einen Zwei-Schritt-Mechanismus vorsieht (1):



Die Dissoziationskonstanten sind dann folgendermaßen definiert (2):

$$K_{D1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad \text{bzw.} \quad K_{D2} = \frac{[ES]^2}{[E_2S_2]}$$

Für die Massenerhaltung mit den gesamten Enzym- bzw. Substratkonzentrationen $[E]_0$ bzw. $[S]_0$ gilt (3):

$$[E]_0 = [ES] + [E] \quad \text{bzw.} \quad [S]_0 \approx [S]$$

Da ein deutlicher Substratüberschuss gegenüber dem Enzym vorliegt, kann die Konzentration der Gyrase in der $[S]_0$ -Gleichung vernachlässigt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wird definiert als das Produkt aus der Umsatzzahl k_{cat} und der Konzentration des aktiven Enzym-Substrat-Komplexes E_2S_2 unter der Annahme, dass E_2S inaktiv ist (4):

$$v = 2 \cdot k_{cat} \cdot [E_2S_2]$$

Der Faktor 2 berücksichtigt die Tatsache, dass der Komplex E_2S_2 zwei ATP-Moleküle spalten kann und damit doppelt zur Reaktionsgeschwindigkeit beiträgt. Setzt man nun (2) und (3) in (4) ein, so erhält man (5):

$$v = 2 \cdot k_{cat} \cdot \frac{[E]_0^2 \cdot [S]_0^2}{K_{D2} \cdot (K_{D1} + [S]_0)^2}$$

Diese Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und den beiden Gleichgewichtskonstanten. Sie kann verwendet werden, um mehrere ATPase-Reihen bei konstanter Enzym- und variabler Substratkonzentration (sowie andersherum) in einer globalen Fitprozedur anzupassen. K_{D1} ist die exakte Bindungskonstante des Systems GyrB/ATP. Während bei einer mantADP-Verdrängungstitration mit ATP die Hydrolyse des Nukleotids während der Messung die K_D -Bestimmung verfälscht, kann mit Gleichung (5) der tatsächliche Wert dieser Konstante ermittelt werden. K_{D2} lässt sich leider nicht exakt bestimmen, da es in der Formel mit dem Faktor k_{cat} gekoppelt ist. Somit kann durch die Kurvenanpassung nur der Wert für den Quotienten K ermittelt werden (6):

$$K = \frac{k_{cat}}{K_{D2}}$$

Falls die Umsatzzahl k_{cat} aus einer anderen Messung bekannt ist, kann daraus ein ungefährender Wert für die Dimerisierungskonstante K_{D2} abgeschätzt werden. Ein komplexeres Bindungsschema, das neben der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes E_2S_2 auch noch die Ratenkonstanten für die *single-turnover*-Hydrolyse und für die ADP-Dissoziation berücksichtigt, führt nicht zu einer Konvergenz der Kurvenanpassung, da vermutlich zu viele Freiheitsgrade vorliegen.

7.2 Auswertung der Fluoreszenzmessungen

7.2.1 1:1-Bindungsmodell

Das 1:1-Bindungsmodell geht davon aus, dass zwei Moleküle A und B eine 1:1-Bindung AB eingehen. Für ein Enzym, das genau ein Substrat bindet, gilt folgende Reaktionsgleichung (1):



Die Gleichgewichtskonstante K_D berechnet sich dann aus den Konzentrationen der Bindungspartner [E] und [S] sowie des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] im Gleichgewicht (2):

$$K_D = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

Für beide Bindungspartner gilt außerdem die Massenerhaltung (3):

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad \text{bzw.} \quad [S] = [S]_0 - [ES]$$

$[E]_0$ und $[S]_0$ stehen für die Gesamtkonzentrationen von Enzym und Substrat im Ansatz. Setzt man nun (3) in (2) ein und löst nach [ES] auf, so erhält man eine quadratische Gleichung mit zwei Lösungen, von denen nur diejenige mit dem Minus vor der Wurzel biochemisch sinnvoll ist (4):

$$[ES] = \frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2}\right)^2 - [E]_0 \cdot [S]_0}$$

Der Quotient aus [ES] und $[E]_0$ gibt an, wie hoch unter den gegebenen Bedingungen der Anteil des Enzyms ist, das an ein Substrat bindet (Prozentsatz der Sättigung).

7.2.2 mantADP-Titration

Für die Fluoreszenz F einer mantADP-Lösung im Verlauf einer Titration mit ATPase gilt (1):

$$F = F_0 + \Delta F \cdot \frac{[ES]}{[S]_0}$$

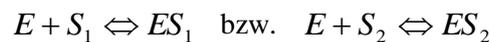
F_0 ist die Fluoreszenz von freiem mantADP und ΔF die maximale Intensitätsänderung am Ende der Titration, wenn 100 % der eingesetzten Nukleotide an Enzyme gebunden sind. Setzt man Gleichung (4) aus 7.2.1 in (1) ein, so erhält man (2):

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

Gleichung (2) kann verwendet werden, um aus einer mantADP-Titrationskurve den gesuchten K_D -Wert (Enzym/mantADP) zu erhalten.

7.2.3 Verdrängungstitration

Bei einer Verdrängungstitration wird das Fluorophor mantADP (Substrat S_1) durch einen Überschuss an ADP (S_2) wieder aus der Bindungstasche der ATPase verdrängt. Es liegt daher ein System aus dem Enzym E und den zwei Liganden S_1 und S_2 vor (1):



Somit existieren zwei verschiedene Gleichgewichtskonstanten K_{D1} und K_{D2} (2):

$$K_{D1} = \frac{[E] \cdot [S_1]}{[ES_1]} \quad \text{bzw.} \quad K_{D2} = \frac{[E] \cdot [S_2]}{[ES_2]}$$

Wie bei der mantADP-Hintitration gilt auch hier die Massenerhaltung für das Enzym und für beide Substrate (3):

$$[E] = [E]_0 - [ES_1] - [ES_2] \quad \text{bzw.} \quad [S_1] = [S_1]_0 - [ES_1] \quad \text{bzw.} \quad [S_2] = [S_2]_0 - [ES_2]$$

Die gemessene Gesamtfluoreszenz F setzt sich während der Titration aus den Einzelintensitäten des freien (S_1) und des gebundenen mantADP (ES_1) zusammen (4):

$$F = a \cdot [S_1] + b \cdot [ES_1]$$

a und b sind hier die Fluoreszenzkoeffizienten für mantADP im freien bzw. ans Enzym gebundenen Zustand. Durch Einsetzen von (2) und (3) in (4) und Auflösen nach $[ES_1]$ erhält man eine kubische

Gleichung, die analytisch leider nicht lösbar ist. Stattdessen wird das Gesamtsystem numerisch mit Hilfe des Programms *Scientist* gelöst. Die gesuchte Bindungskonstante K_{D2} für das Enzym und ADP sowie a und b lassen sich unter Verwendung der bekannten Parameter K_{D1} , $[S_1]_0$, $[S_2]_0$ und $[E]_0$ nicht-linear aus der gemessenen Verdrängungskurve bestimmen. Das *Scientist*-Modell sieht folgendermaßen aus:

```

IndVars: S20
DepVars: E, S1, S2, ES1, ES2, F
Params: Kd1, Kd2, E0, S10, a, b
ES1=E*S1/Kd1
ES2=E*S2/Kd2
E0=E+ES1+ES2
S10=S1+ES1
S20=S2+ES2
0<E<E0
0<S1<S10
0<S2<S20
F=S1*a+ES1*b
***

```

7.3 Auswertung der Anisotropiemessungen

7.3.1 Einfache Anisotropietitration

Die Auswertung einer Anisotropietitration von fluoreszierender DNA mit GyrA erfolgt auf der Grundlage des 1:1-Bindungsmodells, das in 7.2.1 hergeleitet wurde. Dabei wird angenommen, dass die verwendete 94-bp-dsDNA genau ein Gyrasemolekül an der spezifischen Bindestelle binden kann. Die gemessene Anisotropie r setzt sich zusammen aus der Anisotropie des freien Substrats S und derjenigen des Enzym-Substrat-Komplexes ES (1):

$$r = \frac{r_S \cdot [S] + r_{ES} \cdot [ES]}{[S]_0}$$

r_S und r_{ES} sind die Anisotropiekoeffizienten der freien bzw. gebundenen DNA. Weiterhin gilt der Massenerhaltungssatz mit der gesamten Substratkonzentration $[S]_0$ (2):

$$[S]_0 = [S] + [ES]$$

Durch Einsetzen von (2) in (1) und Umformen erhält man (3):

$$r = r_S + \frac{[ES]}{[S]_0} (r_{ES} - r_S) = r_S + \frac{[ES]}{[S]_0} \cdot \Delta r$$

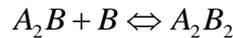
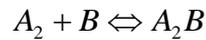
Dabei ist Δr die Änderung der Anisotropie, wenn die dsDNA an das Enzym bindet. Nach dem Einsetzen der Gleichung (4) aus 7.2.1 folgt (4):

$$r = r_s + \frac{\Delta r}{[S]_0} \cdot \left(\frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [S]_0 + K_D}{2} \right)^2 - [E]_0 \cdot [S]_0} \right)$$

Mit dieser Gleichung können der gesuchte K_D -Wert (GyrA/94-bp-dsDNA) sowie r_s und Δr aus der gemessenen Anisotropietitrationskurve gefittet werden.

7.3.2 Globales Modell

Die Bildung des aktiven Gyrase-Tetramers (A_2B_2) aus dem GyrA-Dimer (A_2) und dem GyrB-Monomer (B) findet über eine trimere Zwischenstufe (A_2B) statt (1):



Daraus ergeben sich zwei Gleichgewichtskonstanten K_{D1} und K_{D2} (2):

$$K_{D1} = \frac{[A_2] \cdot [B]}{[A_2B]} \quad \text{bzw.} \quad K_{D2} = \frac{[A_2B] \cdot [B]}{[A_2B_2]}$$

Für beide Ausgangsstoffe A_2 und B gilt die Massenerhaltung mit den gesamten eingesetzten Konzentrationen $[A_2]_0$ und $[B]_0$ (3):

$$[A_2]_0 = [A_2] + [A_2B] + [A_2B_2] \quad \text{bzw.} \quad [B]_0 = [B] + [A_2B] + 2 \cdot [A_2B_2]$$

Die gemessene Anisotropie r während der Titration von markiertem GyrB mit GyrA setzt sich zusammen aus den Anteilen des GyrB-Monomers, von A_2B und von A_2B_2 mit den Anisotropiekoeffizienten r_B , r_{AAB} und r_{AABB} (4):

$$r = \frac{r_B \cdot [B] + r_{AAB} \cdot [A_2B] + 2 \cdot r_{AABB} \cdot [A_2B_2]}{[B]_0}$$

Es ist zu beachten, dass $[A_2B_2]$ doppelt gewertet wird, da das Tetramer zwei Fluorophore besitzt, die zur gemessenen Intensität beitragen. Da es nicht möglich ist, die beiden gesuchten K_D -Werte sowie drei Anisotropiekoeffizienten aus nur einer einzigen Titrationskurve zu fitten, werden vier Messreihen mit unterschiedlicher Konzentration an vorgelegtem GyrB ($[B]_0$) durchgeführt. Die vier Titrationskurven werden anschließend numerisch mit einem globalen Bindungsmodell im Programm *Scientist* analysiert. Das Modell, das im Folgenden abgedruckt ist, unterscheidet je nach Position des ersten angelagerten GyrB-Monomers zwischen den Trimerformen A_2B und BA_2 , wobei diese jedoch biochemisch gleichwertig sind. Für alle vier Titrationsen müssen jeweils eigene Variablen, Anisotropiegleichungen, Koeffizienten und Massenerhaltungssätze mit den Indizes 1 – 4 definiert werden. Eine Ausnahme bilden nur die abhängige Variable $[A_2]_0$ und die fünf gesuchten globalen Parameter K_{D1} , K_{D2} , r_B , r_{AAB} und r_{AABB} .

```

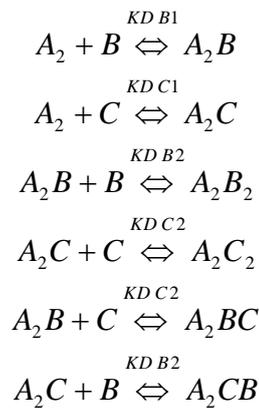
IndVars: AA0
DepVars: r1, r2, r3, r4, AA1, AA2, AA3, AA4, B1, B2, B3, B4, AAB1, AAB2, AAB3, AAB4,
BAA1, BAA2, BAA3, BAA4, AABB1, AABB2, AABB3, AABB4
Params: Kd1, Kd2, rB, rAAB, rAABB, B01, B02, B03, B04
BAA1=AA1*B1/Kd1
AAB1=AA1*B1/Kd1
AABB1=AAB1*B1/Kd2
AA0=AA1+AAB1+BAA1+AABB1
B01=B1+BAA1+AAB1+2*AABB1
r1=rB*B1/B01+rAAB*(AAB1+BAA1)/B01+rAABB*AABB1*2/B01
0<AA1<AA0
0<B1<B01
BAA2=AA2*B2/Kd1
AAB2=AA2*B2/Kd1
AABB2=AAB2*B2/Kd2
AA0=AA2+AAB2+BAA2+AABB2
B02=B2+BAA2+AAB2+2*AABB2
r2=rB*B2/B02+rAAB*(AAB2+BAA2)/B02+rAABB*AABB2*2/B02
0<AA2<AA0
0<B2<B02
BAA3=AA3*B3/Kd1
AAB3=AA3*B3/Kd1
AABB3=AAB3*B3/Kd2
AA0=AA3+AAB3+BAA3+AABB3
B03=B3+BAA3+AAB3+2*AABB3
r3=rB*B3/B03+rAAB*(AAB3+BAA3)/B03+rAABB*AABB3*2/B03
0<AA3<AA0
0<B3<B03
BAA4=AA4*B4/Kd1
AAB4=AA4*B4/Kd1
AABB4=AAB4*B4/Kd2
AA0=AA4+AAB4+BAA4+AABB4
B04=B4+BAA4+AAB4+2*AABB4
r4=rB*B4/B04+rAAB*(AAB4+BAA4)/B04+rAABB*AABB4*2/B04
0<AA4<AA0
0<B4<B04
***

```

Nachdem die fünf Parameter durch die globale Fitprozedur ermittelt wurden, kann *Scientist* für jede beliebige Ausgangskonzentration von GyrA-Dimer und GyrB-Monomer berechnen, wie hoch im Gleichgewicht die Mengen aller auftretenden Spezies sind. Für diese Simulation werden die fünf oben genannten Parameter konstant gesetzt.

7.3.3 Verdrängungstitration

Durch eine Verdrängungsanisotropietitration soll herausgefunden werden, ob die teilweise markierte GyrB-Mutante sich genauso verhält wie der unmarkierte Wildtyp. Der Ansatz besteht aus den zwei Komponenten GyrB C414S-Alexa488 (Substanz C) und GyrA WT (A), zu denen ein Überschuss an GyrB WT (B) titriert wird. Man hat es mit einem (vereinfachten) System aus sechs Reaktionsgleichungen und vier Bindungskonstanten zu tun (1):



Die Konstanten K_{DC1} und K_{DC2} sowie die Anisotropiekoeffizienten für das markierte Monomer, das Trimer und das Tetramer (r_C , r_{AAC} und r_{AACC}) sind bereits aus dem globalen Fit bekannt. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass der Gewichts- bzw. Formunterschied zwischen der teilweise markierten GyrB-Mutante und dem unmarkierten Wildtyp zu vernachlässigen ist und die Anisotropie des Moleküls nicht nennenswert beeinflusst. Die Gesamtkonzentrationen für das GyrA-Dimer $[A_2]_0$, die markierte GyrB-Mutante $[C]_0$ und den unmarkierten GyrB WT $[B]_0$ werden durch die folgenden Massenerhaltungssätze berechnet (2):

$$\begin{aligned}
 [A_2]_0 &= [A_2] + [A_2B] + [A_2C] + [A_2B_2] + [A_2C_2] + [A_2BC] + [A_2CB] \\
 [B]_0 &= [B] + [A_2B] + [A_2BC] + [A_2CB] + 2 \cdot [A_2B_2] \\
 [C]_0 &= [C] + [A_2C] + [A_2BC] + [A_2CB] + 2 \cdot [A_2C_2]
 \end{aligned}$$

Die Anisotropie r setzt sich aus den Anteilen aller markierten Komponenten zusammen (3):

$$r = \frac{r_C \cdot [C] + r_{AAC} \cdot [A_2C] + r_{AACC} \cdot ([A_2BC] + [A_2CB] + 2 \cdot [A_2C_2])}{[C]_0}$$

Für die numerische Anpassung der gemessenen Verdrängungskurve zur Ermittlung der gesuchten Bindungskonstanten K_{DB1} und K_{DB2} wird folgendes *Scientist*-Modell verwendet:

```

IndVars: B0
DepVars: AA, B, AAB, AAC, AABB, AACC, AABC, AACB, C, r
Params: KdC1, KdC2, KdB1, KdB2, AA0, C0, rC, rAAC, rAACC
AAB=AA*B/KdB1
AABB=AAB*B/KdB2
AAC=AA*C/KdC1
AACC=AAC*C/KdC2
AABC=AAB*C/KdC2
AACB=AAC*B/KdB2
AA0=AA+AAB+AAC+AABB+AACC+AABC+AACB
B0=B+AAB+AABC+AACB+2*AABB
C0=C+AAC+AABC+AACB+2*AACC
0<AA<AA0
0<B<B0
0<C<C0
r=rC*C/C0+rAAC*AAC/C0+rAACC*(AABC+AACB+2*AACC)/C0
***

```

7.4 DNA- und Proteinsequenzen

7.4.1 GyrA

Im Folgenden ist die WT-DNA-Sequenz der Gyrase-Untereinheit GyrA aus *Bacillus subtilis* (2466 bp) abgedruckt^{53,130}. Die Positionen der verwendeten Primer sind in drei verschiedenen Farben eingezeichnet: Klonierprimer in grün, *Screen*primer in gelb und Sequenzierprimer in blau.

```

1   atgagtgaac aaaacacacc acaagttcgt gaaataaata tcagtcagga aatgcgtacg GyrA 5'
61  tccttcttgg attatgcaat gagcgttatac gtgtcccgtg ctcttccgga tgttcgtgac
121 ggttttaaacc cggttcatag acggatthttg tatgcaatga atgatttagg catgacaagt
181 gacaagcctt ataaaaaatc cgcgcgatc gttggagaag ttatcgggaa ataccacccg
241 cacggtgatt cagcggata tgaatccatg gtcagaatgg ctcaggattt caactaccgt
301 tatatgctcg ttgacggta cggaaacttc ggttctgttg acggagactc agcggcggcc
361 atgcgttata cagaagcacg aatgtctaaa atctcaatgg agattcttcg cgacatcaca
421 aaagacacaa tcgattacca ggataactat gacgggtcag aaagagaacc tgtcgttatg
481 ccttcaaggt tcccgaatct gctcgtgaac ggtgctgccc gcattgcggt aggtatggca
541 acaaacattc ctccgcacca gctgggagaa atcattgacg gtgtacttgc tgttagtgag GyrA MidA 5'
601 aatccgggaca ttacaattcc agagcttatg gaagtcattc cagggcctga tttcccgacc
661 gcgggtcaaa tcttgggacg cagcggatac cggaaagcat acgaaatcagg cagaggctct GyrA 710 3'
721 atcacgatcc gggcaaaagc tgagatcgaa caaacatctt cgggtaaaga aagaattatc
781 gttacagagt taccttacca agtaaataag gcgaaattaa ttgagaaaat tgctgatctc
841 gtaagggaca aaaagataga gggatcacaca gatctgctg atgagtcaga tcgtacaggt
901 atgagaattg tcattgaaat cagacgcgat gccaatgcga atgttatctt aaacaatctg
961 tacaacaaa ctgctctaca aacatctttt ggcatcaacc tgcttgcgct tgttgatggc
1021 cagccgaaag ttttaactct taagcaatgc ctggagcatt accttgacca tcaaaaagtt
1081 gtcattagac gccgtactgc ttatgaattg cgtaaagcag aagcgagagc tcatatcttg
1141 gaaggattga gagttgcact ggatcatctc gatgcagtta tctcccttat ccgtaattct
1201 caaacggctg aaattgcbag aacaggthta attgaacaat tctcactgac agagaagcaa GyrA MidB 5'
1261 gcacaagcga tccttgacat gaggctccag cgtttaacgg gactggaacg tgaaaagatc
1321 gaagaagaat accagtctct tgthaaatta attgcagagc taaaagacat cttggcaaat
1381 gaatataaag tgcttgagat cattcgtgaa gaactcacgg aaatcaaaga gcgthtttaac
1441 gatgaaagac gatgagagat cgtcacttct ggactgagaa caattgaaga tgaagatctc
1501 atcgagagag aaaaatctct agttactctg acgcacaacg gatacgtcaa acgtcttctc
1561 gcatcaactt accgcagtca aaaacggggc ggaaaagggtg tacaagggtat gggaacaaac
1621 gaagatgatt tcggtgaaca tttgatctct acgtcaactc atgacacgat tctcttctc
1681 tcgaacaagg ggaaagtgtc tcgtgcaaaa gggatgaaa tccctgaata cggcagaacg
1741 gcaaaaggaa tcccgattat taacctgctg gaggtagaaa agggtagtgat gatcaacgcg
1801 attattccag tcacggaatt caatgcbag ctttacctct tcttactac aaagcatggg
1861 gtttcaaaac gaacatcgct atctcaattc gctaataatcc gcaacaatgg tctaattgct
1921 ctgagtcttc gtgaagatga tgaactgatg ggtgtacgtc tgactgacg cacaacaaa
1981 atcatcattg gaacgaaaaa cggthttactg attcgtthtc ctgaaacaga tgtccgagag

```

```

2041 atgggaagaa ctgctggcggg cgtaaaagcc atcacctga cggatgacga cgttgttgc
2101 ggcattggaga ttttagagga agaatacacac gtccttatcg taactgaaaa agggtagcga
2161 aaacgaactc ctgctgaaga gtacagaacc caaagccggg gcggaaaagg actcaaaaca
2221 gcgaaaatca ccgagaacaa cggccaacta gtagcagtga aagctactaa aggtgaagag
2281 gatctaataa ttattacagc tagcggcgta ctcacagaa tggacatcaa tgatatctcc
2341 atcacccggc gtgtcactca aggtgtgctg ctcacagaa tggcagaaga agagcatgtt
2401 gctacagtag ctttagttga gaaaaacgaa gaagatgaga atgaagaaga acaagaagaa GyrA 3'
2461 gtgtga

```

Die Untereinheit GyrA hat folgende WT-Sequenz (821 Aminosäuren):

```

1 MSEQNTQPVR EINISQEMRT SFLDYAMSVI VSRALPDVDR GLKPVHRRIL YAMNDLGMTS
61 DKPYKKSARI VGEVIGKYHP HGDSAVYESM VRMAQDFNYR YMLVDGHNFG GSVDDGDSAAA
121 MRYTEARMSK ISMEILRDIT KDTIDYQDNY DGSEREPPVVM PSRFPNLLVN GAAGIAVGMA
181 TNIPPHQLGE IIDGVLAUSE NPDITPELME EVIPGPDFPT AGQILGRSGI RKAYESGRGS
241 ITIRAKAEIE QTSSGKERII VTELPYQVNK AKLIEKIADL VRDKKIEGIT DLRDESDRTG
301 MRIVIEIRRD ANANVILNLL YKQALQTSF GINLLALVDG QPKVLTLLKQC LEHYLDHQKV
361 VIRRRAYEL RKAEARAHIL EGLRVALDHL DAVISLIRNS QTAEIARTGL IEQFSLTEKQ
421 AQAILDMRLQ RLTLGLEREKI EEEYQSLVKL IAEKLDILAN EYKVLIEIIE ELTEIKERFN
481 DERRTEIVTS GLETIEDEDL IERENIVVTL THNGYVKRLP ASTYRSQKRG GKGVQGMGTN
541 EDDFVEHLIS TSTHDTILFF SNKGKVVYRAK GYEIPEYGRM AKGIPIINLL EVEKGEWINA
601 IIPVTEFNAE LYLFFTTKHG VSKRTSLSQF ANIRNNGLIA LSLREDDELM GVRLLTDGTRQ
661 IIGTKNGLL IRFPETDVRE MGRTAAGVKG ITLTDVVVVV GMEILEEESH VLIVTEKGYG
721 KRTPAEEYRT QSRGGKGLKT AKITENNGQL VAVKATKGEI DLMIITASGV LIRMDINDIS
781 ITGRVTQGVV LIRMAEEHV ATVALVEKNE EDENEEQEE V

```

7.4.2 GyrB

Im Folgenden ist die WT-DNA-Sequenz der Gyrase-Untereinheit GyrB aus *Bacillus subtilis* (1917 bp) abgedruckt^{53,130}. Die Farbgebung für die eingezeichneten Primer ist in 7.4.1 erklärt.

```

1 atggaacagc agcaaacagc ttatgatgaa aatcagatac aggtactaga aggattggaa GyrB 5'
61 gctgttcgta aaagaccggg gatgtatatac ggttcgacaa acagcaaagg ccttcaccac
121 ttggatggg aaattgtcga caatagtatt gacgaagccc tcgccgggta ttgtacggat
181 atcaatatcc aaatcgaaaa agacaacagt atcacggttg tagataatgg cgcgggtatt GyrB 246 3'
241 ccagtcggta ttcattgaaaa aatgggcccgt cctgcggtag aagtcattat gacgggtgctt
301 catgccggag gaaaaattga cggaaagcgc tataaagtat ccggaggatt acacgggtga
361 ggtgcctcgg tcgtaaacgc actatcaaca gagcttgatg tgacggttca ccgtgacggg
421 aaaattcacc gccaaaccta taaacgcgga gttccgggta cagacctga aatcattggc
481 gaaacggatc atacaggaac gacgacacat tttgtcccgg accctgaaat tttctcagaa
541 acaaccgagt atgattacga tctgcttgcc aaccgcgtgc gtgaattagc ctttttaaca
601 aaggcgtaa acatcacgat tgaagataaa cgtgaaggac aagagcgcaa aatgaatac GyrB MidA 5'
661 cattacgaag gcggaattaa aagttatgta gagtatttaa accgctctaa agaggttgtc
721 catgaagagc cgatttacct tgaaggcgaa aaggacggca ttacggttga agtggctttg
781 caatacaatg acagctacac aagcaacatt tactcgttta caaacaacat taacacgtac
841 gaaggcggta cccatgaagc tggcttcaaa acgggcctga ctctgtttat caacgattac
901 gccagaaaaa aagggtctat taaagaaaaat gatccaaacc taagcggaga tgacgtaagg
961 gaagggtctg cagcgattat ttcaatcaaa caccctgatc cgcagtttga gggccaaaca
1021 aaaacaaagc tgggcaactc agaagcacgg acgatcaccg atacgttatt ttctacggcg
1081 atggaacatc ttatgctgga aaatccagat gcagccaaaa aaattgtcga taaaggttta
1141 atggcggcaa gagcaagaat ggctgcgaaa aaagcgcgtg aactaacagc ccgtaagat GyrB 1174 5'
1201 gctttggaaa tttcaaacct gcccggttaag ttagcggact gctcttcaaa agatccgagc
1261 atctccgagt tatatatcgt agagggtgac tctgccggag gatctgctaa acaaggacgc
1321 gacagacatt tccaagccat tttgccgctt agaggtaaaa tcctaaacgt tgaaaaggcc GyrB 1396 3'
1381 agactggata aaatccctttc taacaacgaa gttcgcctca tgatcacagc gctcggcaca
1441 ggtatcggag aagacttcaa ccttgagaaa gccggttacc acaaagttgt cattatgaca
1501 gatgccgagc ttgacggcgc gcacatcaga acactgctgt taacgttctt ttacagatat
1561 atgcgcaaaa ttatcgaaaa ttgctacgtc tacattgcgc agccgcgctc ctacaaggtt
1621 caacagggga aacgcgttga atatgcatac aatgacaagg agcttgaaga gctgttaaaa
1681 actcttcttc aaacgcctaa gcctggactg cagcgttaca aaggctcttg tgaaatgaat

```

```
1741 gccaccagc tatgggagac aaccatgat cctagctcca gaacacttct tcaggtaact
1801 cttgaagatg caatggatgc ggatgagact tttgaaatgc ttatgggcca caaggtagaa
1861 ccgcgccgaa acttcataga agcgaatgag agatacgtta aaaatcttga catctaa GyrB 3'
```

Die Untereinheit GyrB hat folgende WT-Sequenz (638 Aminosäuren):

```
1  MEQQQNSYDE NQIQVLEGLE AVRKRPGMYI GSTNSKGLHH LVWEIVDNSI DEALAGYCTD
61  INIQIEKDNS ITVVDNNGRI PVGIHEKMGR PAVEVIMTVL HAGGKFDGSG YKVSGLHGV
121 GASVVNALST ELDVTVHRDG KIHRTYKRG VPVTDLEIIG ETDHTGTTTH FVPDPEIFSE
181 TTEYDYDLLA NRVRELAFLT KGVNITIEDK REGQERKNEY HYEGGIKSYV EYLNRSKEVV
241 HEEPIYIEGE KDGITVEVAL QYNDSYTSNI YSFTNNINTY EGGTHEAGFK TGLTRVINDY
301 ARKKGLIKEN DPNLSGDDVR EGLTAIISIK HPDPQFEGQT KTKLGNSEAR TITDTLFSTA
361 METFMLENPD AAKKIVDKGL MAARARMAAK KARELTRRKS ALEISNLPK LADCSSKDPS
421 ISELYIVEGD SAGGSAKQGR DRHFQAILPL RGKILNVEKA RLDKILSNNE VRSMITALGT
481 GIGEDFNLEK ARYHKVVIMT DADVDAHIR TLLLTFFYRY MRQIIENGYV YIAQPPLYKV
541 QQGKRVEYAY NDKELEELLK TLPQTPKPGL QRYKGLGEMN ATQLWETTMD PSSRTLLQVT
601 LEDAMDADET FEMLMGDKVE PRRNFIEANA RYVKNLDI
```

8 Literaturverzeichnis

1. Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**, 369-413.
2. Corbett, K. D. & Berger, J. M. (2004). Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 95-118.
3. Guipaud, O., Marguet, E., Noll, K. M., de la Tour, C. B. & Forterre, P. (1997). Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10606-10611.
4. Kikuchi, A. & Asai, K. (1984). Reverse gyrase: a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* **309**, 677-681.
5. Rodriguez, A. C. (2002). Studies of a positive supercoiling machine. Nucleotide hydrolysis and a multifunctional "latch" in the mechanism of reverse gyrase. *J Biol Chem* **277**, 29865-29873.
6. Wigley, D. B., Davies, G. J., Dodson, E. J., Maxwell, A. & Dodson, G. (1991). Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351**, 624-629.
7. Morais Cabral, J. H., Jackson, A. P., Smith, C. V., Shikotra, N., Maxwell, A. & Liddington, R. C. (1997). Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **388**, 903-906.
8. Ruthenburg, A. J., Graybosch, D. M., Huetsch, J. C. & Verdine, G. L. (2005). A superhelical spiral in the *Escherichia coli* DNA gyrase A C-terminal domain imparts unidirectional supercoiling bias. *J Biol Chem* **280**, 26177-26184.
9. Corbett, K. D., Schoeffler, A. J., Thomsen, N. D. & Berger, J. M. (2005). The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol* **351**, 545-561.
10. Laponogov, I., Veselkov, D. A., Sohi, M. K., Pan, X. S., Achari, A., Yang, C., Ferrara, J. D., Fisher, L. M. & Sanderson, M. R. (2007). Breakage-reunion domain of *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV: crystal structure of a gram-positive quinolone target. *PLoS ONE* **2**, e301.
11. Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C. & Wang, J. C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* **379**, 225-232.
12. Fass, D., Bogden, C. E. & Berger, J. M. (1999). Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nat Struct Biol* **6**, 322-326.
13. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3872-3876.
14. Sugino, A. & Bott, K. F. (1980). *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid gyrase. *J Bacteriol* **141**, 1331-1339.
15. Sugino, A., Higgins, N. P. & Cozzarelli, N. R. (1980). DNA gyrase subunit stoichiometry and the covalent attachment of subunit A to DNA during DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* **8**, 3865-3874.
16. Costenaro, L., Grossmann, J. G., Ebel, C. & Maxwell, A. (2005). Small-angle X-ray scattering

- reveals the solution structure of the full-length DNA gyrase a subunit. *Structure* **13**, 287-296.
17. Costenaro, L., Grossmann, J. G., Ebel, C. & Maxwell, A. (2007). Modular structure of the full-length DNA gyrase B subunit revealed by small-angle X-ray scattering. *Structure* **15**, 329-339.
 18. Ali, J. A., Jackson, A. P., Howells, A. J. & Maxwell, A. (1993). The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry* **32**, 2717-2724.
 19. Dutta, R. & Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* **25**, 24-28.
 20. Maxwell, A. & Gellert, M. (1984). The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J Biol Chem* **259**, 14472-14480.
 21. Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Gellert, M. (1978). DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5960-5963.
 22. Sugino, A. & Cozzarelli, N. R. (1980). The intrinsic ATPase of DNA gyrase. *J Biol Chem* **255**, 6299-6306.
 23. Brino, L., Urzhumtsev, A., Mousli, M., Bronner, C., Mitschler, A., Oudet, P. & Moras, D. (2000). Dimerization of Escherichia coli DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *J Biol Chem* **275**, 9468-9475.
 24. Ali, J. A., Orphanides, G. & Maxwell, A. (1995). Nucleotide binding to the 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Biochemistry* **34**, 9801-9808.
 25. Reece, R. J. & Maxwell, A. (1989). Tryptic fragments of the Escherichia coli DNA gyrase A protein. *J Biol Chem* **264**, 19648-19653.
 26. Corbett, K. D., Shultzaberger, R. K. & Berger, J. M. (2004). The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7293-7298.
 27. Kampranis, S. C. & Maxwell, A. (1996). Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14416-14421.
 28. Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
 29. Klevan, L. & Wang, J. C. (1980). Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an alpha 2 beta 2 protein core. *Biochemistry* **19**, 5229-5234.
 30. Huang, Y. Y., Deng, J. Y., Gu, J., Zhang, Z. P., Maxwell, A., Bi, L. J., Chen, Y. Y., Zhou, Y. F., Yu, Z. N. & Zhang, X. E. (2006). The key DNA-binding residues in the C-terminal domain of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase A subunit (GyrA). *Nucleic Acids Res* **34**, 5650-5659.
 31. Higgins, N. P., Peebles, C. L., Sugino, A. & Cozzarelli, N. R. (1978). Purification of subunits of Escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1773-1777.
 32. Drlica, K. & Franco, R. J. (1988). Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry* **27**, 2253-2259.

33. Kampranis, S. C., Gormley, N. A., Tranter, R., Orphanides, G. & Maxwell, A. (1999). Probing the binding of coumarins and cyclothialidines to DNA gyrase. *Biochemistry* **38**, 1967-1976.
34. Sugino, A., Higgins, N. P., Brown, P. O., Peebles, C. L. & Cozzarelli, N. R. (1978). Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4838-4842.
35. Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* **51**, 1109-1117.
36. Sugino, A., Peebles, C. L., Kreuzer, K. N. & Cozzarelli, N. R. (1977). Mechanism of action of nalidixic acid: purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 4767-4771.
37. Pan, X. S. & Fisher, L. M. (1997). Targeting of DNA gyrase in Streptococcus pneumoniae by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 471-474.
38. Göttler, T. & Klostermeier, D. (2007). Dissection of the nucleotide cycle of *B. subtilis* DNA gyrase and its modulation by DNA. *J Mol Biol* **367**, 1392-1404.
39. Kampranis, S. C., Bates, A. D. & Maxwell, A. (1999). A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8414-8419.
40. Nöllmann, M., Crisona, N. J. & Arimondo, P. B. (2007). Thirty years of Escherichia coli DNA gyrase: from in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie* **89**, 490-499.
41. Schoeffler, A. J. & Berger, J. M. (2005). Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem Soc Trans* **33**, 1465-1470.
42. Lindsley, J. E. & Wang, J. C. (1993). On the coupling between ATP usage and DNA transport by yeast DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* **268**, 8096-8104.
43. Williams, N. L. & Maxwell, A. (1999). Locking the DNA gate of DNA gyrase: investigating the effects on DNA cleavage and ATP hydrolysis. *Biochemistry* **38**, 14157-14164.
44. Charvin, G., Strick, T. R., Bensimon, D. & Croquette, V. (2005). Tracking topoisomerase activity at the single-molecule level. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**, 201-219.
45. Nöllmann, M., Stone, M. D., Bryant, Z., Gore, J., Crisona, N. J., Hong, S. C., Mittelheiser, S., Maxwell, A., Bustamante, C. & Cozzarelli, N. R. (2007). Multiple modes of Escherichia coli DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 264-271.
46. Gore, J., Bryant, Z., Stone, M. D., Nöllmann, M., Cozzarelli, N. R. & Bustamante, C. (2006). Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking. *Nature* **439**, 100-104.
47. Bashkirov, V. I. & Zvingila, D. J. (1991). Sequence specificity of Bacillus subtilis DNA gyrase in vivo. *Genetica* **85**, 3-12.
48. Roca, J., Berger, J. M., Harrison, S. C. & Wang, J. C. (1996). DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4057-4062.

49. Williams, N. L. & Maxwell, A. (1999). Probing the two-gate mechanism of DNA gyrase using cysteine cross-linking. *Biochemistry* **38**, 13502-13511.
50. Roca, J. & Wang, J. C. (1994). DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* **77**, 609-616.
51. Kramlinger, V. M. & Hiasa, H. (2006). The "GyrA-box" is required for the ability of DNA gyrase to wrap DNA and catalyze the supercoiling reaction. *J Biol Chem* **281**, 3738-3742.
52. Harkins, T. T., Lewis, T. J. & Lindsley, J. E. (1998). Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 2. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry* **37**, 7299-7312.
53. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. & et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
54. Förster, T. (1959). Transfer mechanisms of electronic excitation. *Discussions of the Faraday society* **27**, 7-17.
55. Klostermeier, D. & Millar, D. P. (2001). Time-resolved fluorescence resonance energy transfer: a versatile tool for the analysis of nucleic acids. *Biopolymers* **61**, 159-179.
56. Deniz, A. A., Dahan, M., Grunwell, J. R., Ha, T., Faulhaber, A. E., Chemla, D. S., Weiss, S. & Schultz, P. G. (1999). Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Forster distance dependence and subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3670-3675.
57. Ha, T., Ting, A. Y., Liang, J., Caldwell, W. B., Deniz, A. A., Chemla, D. S., Schultz, P. G. & Weiss, S. (1999). Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 893-898.
58. Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Selvin, P. R. & Weiss, S. (1996). Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6264-6268.
59. Ha, T. (2001). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **25**, 78-86.
60. Selvin, P. R. (2000). The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol* **7**, 730-734.
61. Schuler, B., Lipman, E. A. & Eaton, W. A. (2002). Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* **419**, 743-747.
62. Antikainen, N. M., Smiley, R. D., Benkovic, S. J. & Hammes, G. G. (2005). Conformation coupled enzyme catalysis: single-molecule and transient kinetics investigation of dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **44**, 16835-16843.

63. Wazawa, T. & Ueda, M. (2005). Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **95**, 77-106.
64. Eggeling, C., Berger, S., Brand, L., Fries, J. R., Schaffer, J., Volkmer, A. & Seidel, C. A. (2001). Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *J Biotechnol* **86**, 163-180.
65. Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schroder, G. F., Felekyan, S., Haustein, E., Konig, M., Fasshauer, D., Grubmuller, H., Jahn, R. & Seidel, C. A. (2003). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15516-15521.
66. Eggeling, C., Widengren, J., Brand, L., Schaffer, J., Felekyan, S. & Seidel, C. A. (2006). Analysis of photobleaching in single-molecule multicolor excitation and Forster resonance energy transfer measurements. *J Phys Chem A* **110**, 2979-2995.
67. Kapanidis, A. N. & Weiss, S. (2002). Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single-molecule fluorescence analysis of biomolecules. *J Chem Phys* **117**, 10953-10964.
68. Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-234.
69. Rusinova, E., Tretyachenko-Ladokhina, V., Vele, O. E., Senear, D. F. & Alexander Ross, J. B. (2002). Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions. *Anal Biochem* **308**, 18-25.
70. Molecular Probes, The Handbook, <http://www.probes.com/handbook>.
71. Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhargat, M. K., Millard, P. J., Mao, F. & Leung, W. Y. (1999). Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* **47**, 1179-1188.
72. Gill, S. C. & Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319-326.
73. Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
74. Adam, H. (1962). Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, pp. 573-577. Verlag Chemie, Weinheim.
75. Hiratsuka, T. (1983). New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim Biophys Acta* **742**, 496-508.
76. Huang, S., Wang, H., Carroll, C. A., Hayes, S. J., Weintraub, S. T. & Serwer, P. (2004). Analysis of proteins stained by Alexa dyes. *Electrophoresis* **25**, 779-784.
77. Parker, C. A. & Rees, W. T. (1960). Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst* **85**, 587-600.
78. Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic, New York.
79. Spreitler, F. (2006). Einzelmolekül-FRET an Biomolekülen. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

80. Gösch, M. & Rigler, R. (2005). Fluorescence correlation spectroscopy of molecular motions and kinetics. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 169-190.
81. Waldeck, A. R., Kuchel, P. W., Lennon, A. J. & Chapman, B. E. (1997). NMR diffusion measurements to characterise membrane transport and solute binding. *Prog NMR Spec* **30**, 39-68.
82. Mueller-Planitz, F. & Herschlag, D. (2006). Interdomain communication in DNA topoisomerase II. DNA binding and enzyme activation. *J Biol Chem* **281**, 23395-23404.
83. Orr, E. & Staudenbauer, W. L. (1982). Bacillus subtilis DNA gyrase: purification of subunits and reconstitution of supercoiling activity. *J Bacteriol* **151**, 524-527.
84. Barnes, M. H., LaMarr, W. A. & Foster, K. A. (2003). DNA gyrase and DNA topoisomerase of Bacillus subtilis: expression and characterization of recombinant enzymes encoded by the gyrA, gyrB and parC, parE genes. *Protein Expr Purif* **29**, 259-264.
85. Staudenbauer, W. L. & Orr, E. (1981). DNA gyrase: affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties. *Nucleic Acids Res* **9**, 3589-3603.
86. Manjunatha, U. H., Dalal, M., Chatterji, M., Radha, D. R., Visweswariah, S. S. & Nagaraja, V. (2002). Functional characterisation of mycobacterial DNA gyrase: an efficient decatenase. *Nucleic Acids Res* **30**, 2144-2153.
87. Osheroff, N., Shelton, E. R. & Brutlag, D. L. (1983). DNA topoisomerase II from Drosophila melanogaster. Relaxation of supercoiled DNA. *J Biol Chem* **258**, 9536-9543.
88. Tamura, J. K., Bates, A. D. & Gellert, M. (1992). Slow interaction of 5'-adenylyl-beta,gamma-imidodiphosphate with Escherichia coli DNA gyrase. Evidence for cooperativity in nucleotide binding. *J Biol Chem* **267**, 9214-9222.
89. McLaughlin, S. H., Ventouras, L. A., Lobbezoo, B. & Jackson, S. E. (2004). Independent ATPase activity of Hsp90 subunits creates a flexible assembly platform. *J Mol Biol* **344**, 813-826.
90. Baird, C. L., Gordon, M. S., Andrenyak, D. M., Marecek, J. F. & Lindsley, J. E. (2001). The ATPase reaction cycle of yeast DNA topoisomerase II. Slow rates of ATP resynthesis and P(i) release. *J Biol Chem* **276**, 27893-27898.
91. Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J. & Buchner, J. (2000). C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J Mol Biol* **303**, 583-592.
92. Ban, C., Junop, M. & Yang, W. (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* **97**, 85-97.
93. Hu, T., Sage, H. & Hsieh, T. S. (2002). ATPase domain of eukaryotic DNA topoisomerase II. Inhibition of ATPase activity by the anti-cancer drug bisdioxopiperazine and ATP/ADP-induced dimerization. *J Biol Chem* **277**, 5944-5951.
94. Lasko, D. R. & Wang, D. I. C. (2000). On-line monitoring of intracellular ATP concentration in Escherichia coli fermentations. *Biotechnol Bioeng* **52**, 364-372.

95. Higgins, N. P. & Cozzarelli, N. R. (1982). The binding of gyrase to DNA: analysis by retention by nitrocellulose filters. *Nucleic Acids Res* **10**, 6833-6847.
96. Morant-Lhomel, A., Rene, B., Zargarian, L., Troalen, F., Mauffret, O. & Fermandjian, S. (2006). Self-association and DNA binding properties of the human topoisomerase IIA alpha2HTH module. *Biochimie* **88**, 253-263.
97. Kampranis, S. C. & Maxwell, A. (1998). Hydrolysis of ATP at only one GyrB subunit is sufficient to promote supercoiling by DNA gyrase. *J Biol Chem* **273**, 26305-26309.
98. Yang, Y. & Ames, G. F. (1988). DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8850-8854.
99. Gross, C. H., Parsons, J. D., Grossman, T. H., Charifson, P. S., Bellon, S., Jernee, J., Dwyer, M., Chambers, S. P., Markland, W., Botfield, M. & Raybuck, S. A. (2003). Active-site residues of *Escherichia coli* DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1037-1046.
100. Hiasa, H. & Shea, M. E. (2000). DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem* **275**, 34780-34786.
101. Allen, M. W., Urbauer, R. J., Zaidi, A., Williams, T. D., Urbauer, J. L. & Johnson, C. K. (2004). Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments. *Anal Biochem* **325**, 273-284.
102. Harikumar, K. G. & Miller, L. J. (2005). Fluorescence resonance energy transfer analysis of the antagonist- and partial agonist-occupied states of the cholecystokinin receptor. *J Biol Chem* **280**, 18631-18635.
103. Knox, R. S. & van Amerongen, H. (2002). Refractive Index Dependence of the Förster Resonance Excitation Transfer Rate. *J Phys Chem* **106**, 5289-5293.
104. Davey, A. M., Walvick, R. P., Liu, Y., Heikal, A. A. & Sheets, E. D. (2007). Membrane order and molecular dynamics associated with IgE receptor cross-linking in mast cells. *Biophys J* **92**, 343-355.
105. Spitz, J. A., Polard, V., Maksimenko, A., Subra, F., Baratti-Elbaz, C., Meallet-Renault, R., Pansu, R. B., Tauc, P. & Auclair, C. (2007). Assessment of cellular actin dynamics by measurement of fluorescence anisotropy. *Anal Biochem* **367**, 95-103.
106. Schröder, G. F., Alexiev, U. & Grubmüller, H. (2005). Simulation of fluorescence anisotropy experiments: probing protein dynamics. *Biophys J* **89**, 3757-3770.
107. Bayley, P., Martin, S., Browne, P. & Royer, C. (2003). Time-resolved fluorescence anisotropy studies show domain-specific interactions of calmodulin with IQ target sequences of myosin V. *Eur Biophys J* **32**, 122-127.
108. Deniz, A. A., Laurence, T. A., Beligere, G. S., Dahan, M., Martin, A. B., Chemla, D. S., Dawson, P. E., Schultz, P. G. & Weiss, S. (2000). Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence

- resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5179-5184.
109. Lee, N. K., Kapanidis, A. N., Wang, Y., Michalet, X., Mukhopadhyay, J., Ebright, R. H. & Weiss, S. (2005). Accurate FRET Measurements within Single Diffusing Biomolecules Using Alternating-Laser Excitation. *Biophys J* **88**, 2939–2953.
110. Kershaw, M. J. & Leigh, D. A. (1975). The antibacterial and pharmacological activity of oxolinic acid (Prodoxol). *J Antimicrob Chemother* **1**, 311-315.
111. Sissi, C., Perdonà, E., Domenici, E., Feriani, A., Howells, A. J., Maxwell, A. & Palumbo, M. (2001). Ciprofloxacin affects conformational equilibria of DNA gyrase A in the presence of magnesium ions. *J Mol Biol* **311**, 195-203.
112. Wu, L. C. & Shahied, S. I. (1995). Mycobacterial DNA gyrase: enzyme purification and characterization of supercoiling activity. *Arch Biochem Biophys* **324**, 123-129.
113. Pan, X. S. & Fisher, L. M. (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2810-2816.
114. Higgins, N. P. (2007). Under DNA stress, gyrase makes the sign of the cross. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 256-258.
115. Bates, A. D. (2006). DNA topoisomerases: single gyrase caught in the act. *Curr Biol* **16**, R204-206.
116. Smiley, R. D., Collins, T. R., Hammes, G. G. & Hsieh, T. S. (2007). Single-molecule measurements of the opening and closing of the DNA gate by eukaryotic topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4840-4845.
117. Wang, J. C. (2007). Unlocking and opening a DNA gate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4773-4774.
118. Alpha-Bazin, B., Bazin, H., Boissy, L. & Mathis, G. (2000). Europium cryptate-tethered ribonucleotide for the labeling of RNA and its detection by time-resolved amplification of cryptate emission. *Anal Biochem* **286**, 17-25.
119. Cohen, A. E. & Moerner, W. E. (2006). Suppressing Brownian motion of individual biomolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4362-4365.
120. Reiner, J. E., Crawford, A. M., Kishore, R. B., Goldner, L. S., Gilson, M. K. & Helmerson, K. (2006). Optically trapped aqueous droplets for single molecule studies. *Appl Phys Lett* **89**, 013904.
121. Wennmalm, S., Edman, L. & Rigler, R. (1997). Conformational fluctuations in single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10641-10646.
122. Maxwell, A., Burton, N. P. & O'Hagan, N. (2006). High-throughput assays for DNA gyrase and other topoisomerases. *Nucleic Acids Res* **34**, e104.
123. Trigueros, S. & Roca, J. (2002). A GyrB-GyrA fusion protein expressed in yeast cells is able to remove DNA supercoils but cannot substitute eukaryotic topoisomerase II. *Genes Cells* **7**, 249-257.
124. Kong, X., Nir, E., Hamadani, K. & Weiss, S. (2007). Photobleaching pathways in single-molecule FRET experiments. *J Am Chem Soc* **129**, 4643-4654.

125. Clamme, J. P. & Deniz, A. A. (2005). Three-color single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *ChemPhysChem* **6**, 74-77.
126. Hohng, S., Joo, C. & Ha, T. (2004). Single-molecule three-color FRET. *Biophys J* **87**, 1328-1337.
127. Lee, N. K., Kapanidis, A. N., Koh, H. R., Korlann, Y., Ho, S. O., Kim, Y., Gassman, N., Kim, S. K. & Weiss, S. (2007). Three-color alternating-laser excitation of single molecules: monitoring multiple interactions and distances. *Biophys J* **92**, 303-312.
128. Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* **49**, 333-369.
129. Segel, I. H. (1993). In: Enzyme kinetics - behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley Classics Library Edition, New York.
130. Moriya, S., Ogasawara, N. & Yoshikawa, H. (1985). Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucleic Acids Res* **13**, 2251-2265.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| 0-Signal | Donorsignal bei $E_{\text{FRET}} = 0$ (siehe 3.9.3.2) |
| Å | Ångstrom |
| A_{280} | Absorption (bei 280 nm) |
| A_2B (bzw. BA_2) | Trimer aus zwei GyrA und einem GyrB |
| A_2B_2 | Tetramer aus jeweils zwei GyrA und GyrB |
| ABEL | „Anti-Brown’sche Elektrokinetikfalle“ (siehe 5.4) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AIM | Autoinduktionsmedium |
| ALEX | Alternierende Laserexzitation (siehe 5.4) |
| AMPPNP | ATP-Analogon (siehe 4.2.1.2) |
| APD | <i>Avalanche</i> -Photodiode |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| $ATP_{\gamma}S$ | ATP-Analogon (siehe 4.2.1.2) |
| AUZ | Analytische Ultrazentrifugation |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CCD | <i>charge coupled device</i> |
| Cm | Chloramphenicol |
| CTD | C-terminale Domäne (von GyrA) |
| C-Tor | unteres Tor der Gyrase (siehe 1.1.2) |
| Da | Dalton |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNA-Tor | mittleres Tor der Gyrase (siehe 1.1.2) |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| E_{FRET} | FRET-Effizienz |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FAM | Carboxyfluorescein |
| FCS | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie |

| | |
|--|---|
| FPLC | <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer |
| GdmCl | Guanidinhydrochlorid |
| G-DNA | an das DNA-Tor der Gyrase gebundene DNA (siehe 1.1.4) |
| GEMSA | <i>Gel electrophoretic mobility shift assay</i> |
| GyrA bzw. GyrB | Untereinheiten A bzw. B der Gyrase |
| GyrA ₂ bzw. GyrB ₂ | GyrA-Dimer bzw. (nukleotidinduziertes) GyrB-Dimer |
| GyrBA | Fusionsprodukt aus GyrB und GyrA (siehe 5.4) |
| HPLC | Hochdruckflüssigchromatographie |
| IC ₅₀ | Inhibitorkonzentration für halbmaximale Enzymhemmung |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| IRF | <i>Instrument response function</i> |
| kbp | Kilobasenpaare |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| K _m | Kanamycin |
| K _M | Michaelis-Menten-Konstante |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| mantADP | 2'/3'-O-(N-Methyl-Anthraniloyl)-ADP |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotid |
| N-Tor | oberes Tor der Gyrase (siehe 1.1.2) |
| oC | ohne natives Cystein |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte (bei 600 nm) |
| p. A. | pro analysi |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDB | Protein-Datenbank |
| PEI | Polyethylenimin |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| pET27b, pET28a | Klonierplasmide (siehe 2.3) |
| PK | Pyruvatkinase |
| pUC18 | Substratplasmid (siehe 2.3) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| S200 | Superdex-200-Gelfiltrationssäule |

| | |
|--|--|
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| smFRET | Einzelmolekül-FRET |
| ssATPase-Test | <i>Steady-state</i> -ATPase-Test |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| ssFRET | <i>Steady-state</i> -FRET |
| stATPase-Test | <i>Single-turnover</i> -ATPase-Test |
| TCEP | Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin |
| T-DNA | durch die G-DNA wandernde Transfer-DNA (siehe 1.1.4) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TIR | Totalreflexion (<i>total internal reflection</i> ; siehe 5.4) |
| TMR | Tetramethylrhodamin |
| Topo | Topoisomerase |
| trFRET | Zeitaufgelöster FRET |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| ÜN | über Nacht |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |
| WT | Wildtyp |
| λ_{ex} bzw. λ_{em} | Wellenlänge der Anregung bzw. der Emission |

Danksagung

(nur in der Druckversion enthalten)

Lebenslauf

(nur in der Druckversion enthalten)