



**Die DEAD-box Helikase Hera aus  
*Thermus thermophilus*: Untersuchung der  
Wechselwirkung mit Nukleinsäuren und der  
Helikaseaktivität**

**Inauguraldissertation**

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

von

Martin Hubert Linden

aus

München, Deutschland



Basel, 2009

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Auf Antrag von

Dagmar Klostermeier, Joachim Seelig  
(Mitglieder des Dissertationskomitees)

Basel, den 23.06.2009

(Datum der Fakultätssitzung)

Prof. Dr. Parlow  
(Dekanin/Dekan)



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	6
<b>2. Zielsetzung</b>	13
<b>3. Material und Methoden</b>	15
3.1 Material	15
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	15
3.1.2 Enzyme und Proteine	16
3.1.3 Bakterienstämme und Plasmide	16
3.1.4 Oligonukleotide und Nukleinsäuren	17
3.1.5 Geräte	22
3.1.6 Datenauswertung	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Agarosegelelektrophorese	23
3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.2.3 Mutagenese	24
3.2.4 Proteinreinigung	25
3.2.5 ATPase-Test im Fließgleichgewicht	28
3.2.6 ATPase-Test als Einzelumsatz	29
3.2.7 mant-Nukleotidtitrationen	30
3.2.8 Anisotropietitrationen	32
3.2.9 Analytische Grössenausschlusschromatographie	32
3.2.10 RNA-Entwindungstests	33
3.2.11 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	34
3.2.12 Einzelmolekülexperimente	35
<b>4. Ergebnisse</b>	41
4.1 Die ATPase-Eigenschaften von Hera	41
4.1.1. Die Untersuchung der ATP-Hydrolyse durch gekoppelt-enzymatische Tests	41
4.1.1.1 Die Abhängigkeit der ATP – Hydrolyse von der Hera-Konzentration	41
4.1.1.2 Die Abhängigkeit der Hydrolyserate von der ATP-Konzentration	42
4.1.1.3 Die Stimulation der ATP-Hydrolyse von Hera Wildtyp durch RNA- Substrate	43
4.1.1.4 Die ATP-Hydrolyse durch die Helikasedomäne ( <i>core</i> ) von Hera und der RNase P-Motivmutante (RPM)	44
4.1.2 Die ATP-Hydrolyse in Einzelumsatzexperimenten	46

4.1.2.1 Die ATP–Hydrolyse von Hera Wildtyp in Einzelumsatzexperimenten	46
4.1.2.2 Die ATP–Hydrolyse von Hera <i>core</i> in Einzelumsatzexperimenten	47
4.1.2.3 Die Bedeutung des <i>Walker A</i> Motivs für die ATP–Hydrolyse	47
4.1.2.4 Bildung von AMP während der ATP–Hydrolyse: Folgereaktion oder Kontamination?	48
4.1.3 mantADP Gleichgewichtstitrationen	49
4.2 Die Wechselwirkung von Hera mit Nukleinsäuren	50
4.2.1 Messung der Bindungsaffinität von Hera für RNA mittels Anisotropietitration	50
4.2.2 Die Aktivierung von Hera durch Nukleinsäuren	51
4.2.2.1 Die Aktivierung von Hera durch RNA und DNA	52
4.2.2.2 Die Aktivierung des <i>core</i> durch RNA und DNA	61
4.2.2.3 Die Aktivierung der RNase P RNA-Bindemotivmutante (RPM)	63
4.2.2.4 Konkurrenz zwischen Hera und <i>E. coli</i> RnpA	64
4.2.2.5 Die Aktivierung der SAT-Mutante	66
4.3 Die Entwindungsaktivität von Hera	67
4.3.1 Die Entwindungskinetik eines RNA-Minimalsubstrats durch Hera Wildtyp	67
4.3.2 Der Vergleich der Entwindungsaktivität von Hera Wildtyp und der SAT-Mutante	68
4.3.3 Der Vergleich der Entwindungsaktivität von Hera Wildtyp mit dem <i>core</i> und der RNase P Motiv-Mutante (RPM)	69
4.3.4 Die Entwindung mit mutierten 32mer-Strängen	70
4.3.5 Die Entwindung mit verlängerten/verkürzten <i>loop/hairpin</i> 32mer-Substraten	70
4.4 Hera: Eine dimere DEAD-box Helikase	71
4.4.1 Der Energietransfer zwischen den Fluorophoren auf identischen Positionen innerhalb der monomeren Untereinheiten	73
4.4.2 Der Energietransfer zwischen dem N-terminalen Fluorophor einer Untereinheit und dem C-terminalen Fluorophor der anderen Untereinheit	74
4.4.3 Der Energietransfer zwischen dem N-terminalen und C-terminalen Fluorophor innerhalb einer Untereinheit	74
4.4.4 Die bevorzugte Bindung der Fluorophore an E115C und R260C in Hera	76
4.4.5 Die Stabilität des Dimers	76
<b>5. Diskussion</b>	78
5.1 Hera ist eine vollständig funktionale Helikase	78
5.2 Hera wechselwirkt mit poly U RNA, RNase P RNA und ribosomaler RNA	80

Inhaltsverzeichnis	5
5.3 Hera ist ein stabiles Dimer	85
<b>6. Ausblick</b>	88
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	90
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	92
<b>9. Zusammenfassung</b>	98
<b>10. Danksagung</b>	100
<b>11. Lebenslauf (curriculum vitae)</b>	101

## 1. Einleitung

Allgemein definiert man DNA- oder RNA-Helikasen als Enzyme, welche unter Energieverbrauch doppelsträngige Nukleinsäuren entwinden. Helikasen sind essentielle Katalysatoren aller zellulären Prozesse, welche eine Doppelstrangtrennung von Nukleinsäuren erfordern, z.B. DNA-Replikation, Transkription, Translation, Reparatur und ribosomale Biogenese. Sie werden in drei Superfamilien (SF1-3) und zwei Familien (SF4, SF5) eingeteilt (Gorbalenya & Koonin, 1993; Walker et al., 1982). Das ausschlaggebende Kriterium für die jeweilige Zuordnung ist das Vorhandensein charakteristischer konservierter Motive in den Proteinsequenzen. Allen Helikasen gemein sind die Walker A und B Motive, welche in vielen ATPasen gefunden werden.

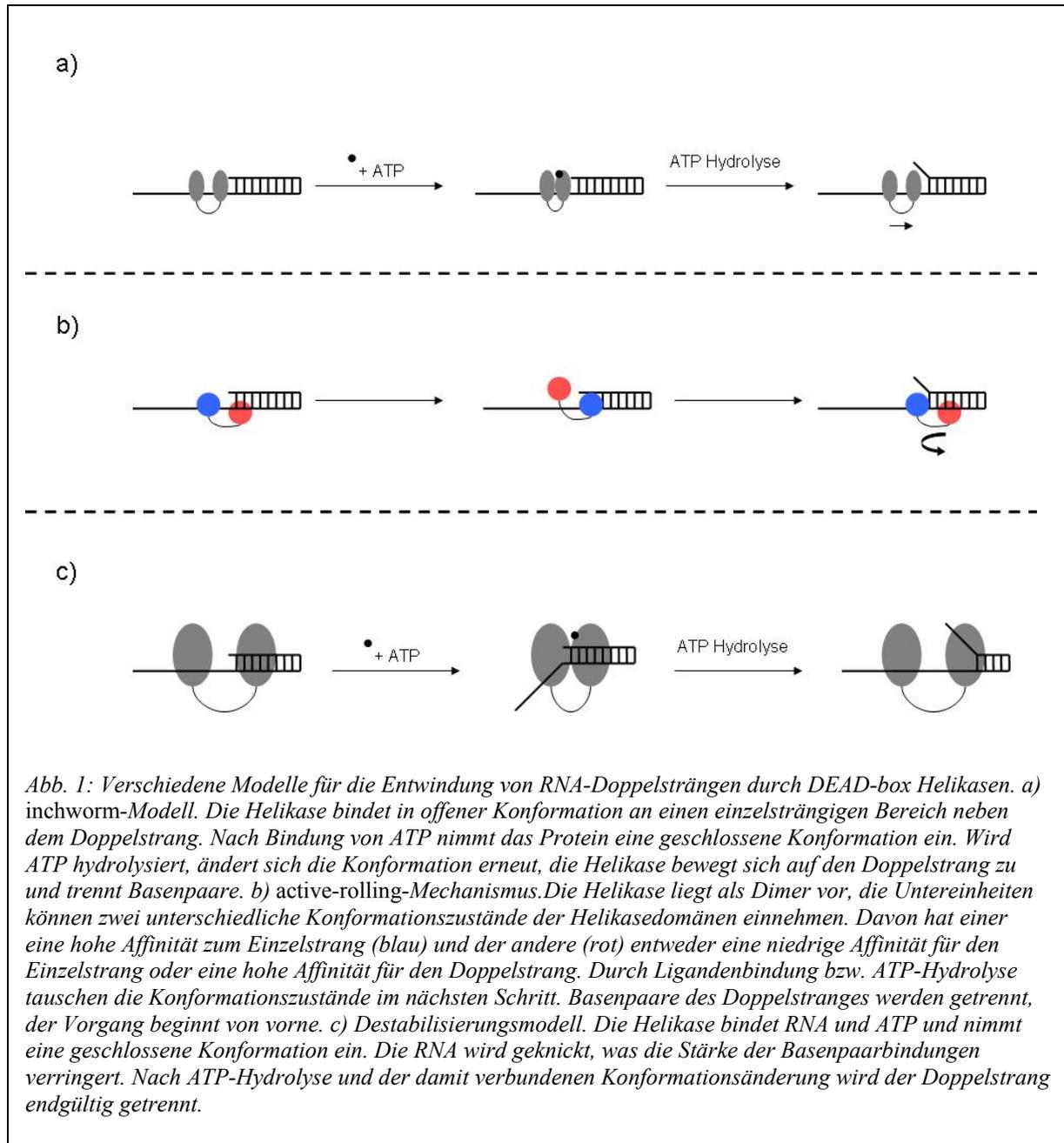
DExD/H-box Helikasen gehören der Superfamilie 2 (SF2) an. Benannt sind sie nach der Konsensussequenz des Walker B Motivs (D: Aspartat, E: Glutamat, x: beliebige Aminosäure, D/H:Aspartat oder Histidin; Gorbalenya & Koonin, 1993). Die häufigsten Vertreter unter ihnen stellen die DEAD-box Helikasen dar (DEAD: Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat). Diese Helikasen besitzen eine 350–400 Aminosäuren lange Helikasedomäne (*core*) (Tanner & Linder, 2001), welche aus zwei  $\alpha$ - $\beta$ -gefalteten, über einen flexiblen *linker* verbundenen RecA-ähnlichen Domänen besteht (Caruthers & McKay, 2002). Viele DExD/H-Helikasen sind darüber hinaus N- oder C-terminal verlängert. Diese Verlängerungen sind in Grösse und Zusammensetzung sehr variabel und können Interaktion mit Kofaktoren oder Substraten, aber auch enzymatische Eigenschaften über die Helikaseaktivität hinaus vermitteln. So besitzt die Helikase NS3 aus dem Hepatitis C Virus (HCV) einen verlängerten N-Terminus, der eine Serin-Proteaseaktivität aufweist (Tomei et al., 1993) und die Prozessivität der Helikase verringert. Dieser Effekt wird *in vivo* durch C-terminale Assoziation mit dem Protein NS4A ausgeglichen (Kuang et al., 2004). In den DEAD-box Helikasen DbpA aus *E. coli* und YxiN aus *B. subtilis* vermittelt ein Motiv im verlängerten C-Terminus die Bindungsspezifität für 23S rRNA (Kossen & Uhlenbeck, 1999, Wang et al., 2006). Von beiden Helikasen wird spezifisch *hairpin* 92 der 23S rRNA erkannt. Verändert man die Sekundärstruktur dieses *hairpins*, so entfällt auch die Stimulation der ATP-Hydrolyse (Pugh et al., 1999). Im Falle von YxiN wurden die carboxyterminalen 140 Aminosäuren auf eine DEAD-box Helikase übertragen, welche keine Stimulation der Hydrolyse durch ein spezifisches Substrat aufweist. Das chimäre Protein hingegen wurde wie YxiN durch Minimalsubstrate der Länge 32-153 Basen, welche *hairpin* 92 beinhalten, stimuliert (Kossen et al., 2002).

Bindet die Helikase Substrate, vollzieht sich eine Konformationsänderung und die Domänen werden so zueinander orientiert, dass sie über die Motive miteinander wechselwirken können. Diese unterschiedliche Orientierung der Domänen wurde zuerst in den Kristallstrukturen von eIF4a (Caruthers et al., 2000), UAP56 (Shi et al., 2004), MjDEAD (Story et al., 2001) und HCV NS3 (Yao et al., 1997) beobachtet. Ein direkter Nachweis der Konformationsänderung in der Helikasedomäne am aktiven Enzym gelang Theissen et al. 2008 mit einem Einzelmolekülexperiment an YxiN. YxiN lag in Abwesenheit von sonstigen Substraten in einer offenen Konformation vor. Nach Bindung von RNA und ATP veränderte sich die Orientierung der N- und C-terminalen Domänen im *core*, der Spalt zwischen den Domänen schloss sich.

Über die beiden Domänen sind 9 konservierte Motive verteilt, inklusive des Walker A Motivs (Motiv I) und Walker B Motivs (Motiv II). DEAD-box Helikasen sind weit verbreitet und kommen in allen Eukaryoten und den meisten Prokaryoten vor (Rocak & Linder, 2004). Obwohl sie an zahlreichen Prozessen wie Transkription, dem Spleissen von Vorläufer-mRNAs, der ribosomalen Biogenese, dem Kernexport, der Initiation der Translation und dem Abbau von RNAs beteiligt sind, ist wenig über ihre genaue Wirkungsweise im Organismus bekannt. Aufgrund der hohen Flexibilität der *linker*-Regionen und etwaiger N- oder C-terminaler Verlängerungen stellt sich die Kristallisation bei den meisten Helikasen schwierig dar, weshalb die Menge an strukturellen Daten dieser Enzymfamilie sehr gering ist.

In den vorhandenen Strukturen findet man die eingangs erwähnten RecA-ähnlichen Domänen, jede mit jeweils fünf  $\alpha$ -Helices und fünf  $\beta$ -Faltblättern. Die N-terminale Domäne enthält das Q-Motiv, sowie die Motive I, Ia, Ib, II und III. Die C-terminale Domäne umfasst die Motive IV, V und VI. Das Q-Motiv bildet Wasserstoffbrücken mit Motiv I aus und interagiert mit dem gebundenen Nukleotid und der RNA. Es wird daher vermutet, dass es als Sensor dient und die ATPaseaktivität reguliert (Cordin et al., 2004). Motiv I mit der Konsensussequenz AxTGoGKT (o: Serin, Threonin; x: beliebige Aminosäure) ist essentiell für die ATP-Hydrolyse und die Helikaseaktivität. Mutationen des ersten Alanins, des konservierten Lysins oder des letzten Threonins reduzieren die Affinität für das Nukleotid und dessen Umsatz und hemmen somit die ATPase (Rozen et al., 1989; Blum et al., 1992). Teil des Motivs ist der sogenannte *phosphate binding loop*, kurz *P-loop*. In den Kristallstrukturen nimmt dieser in Gegenwart eines Nukleotids eine offene, in Abwesenheit eine geschlossene Konformation ein (Shi et al, 2004; Benz et al., 1999; Zhao et al., 2004; Johnson & McKay, 1999; Carmel & Matthews, 2004). Wenig ist über die biologische Rolle der Motive Ia und Ib bekannt. Ausgehend von Kristallstrukturen wird vermutet, dass sie zusammen mit den ebenfalls

weitgehend unerforschten Motiven IV und V an der RNA-Bindung beteiligt sind. Genauso wie Motif I ist Motiv II an der ATP-Hydrolyse beteiligt. Das konservierte Glutamat koordiniert ein Magnesiumion und ist für die Spaltung der  $\beta$ - $\gamma$ -Phosphatbindung des ATP



*Abb. 1: Verschiedene Modelle für die Entwindung von RNA-Doppelsträngen durch DEAD-box Helikasen. a) inchworm-Modell. Die Helikase bindet in offener Konformation an einen einzelsträngigen Bereich neben dem Doppelstrang. Nach Bindung von ATP nimmt das Protein eine geschlossene Konformation ein. Wird ATP hydrolysiert, ändert sich die Konformation erneut, die Helikase bewegt sich auf den Doppelstrang zu und trennt Basenpaare. b) active-rolling-Mechanismus. Die Helikase liegt als Dimer vor, die Untereinheiten können zwei unterschiedliche Konformationszustände der Helikasedomänen einnehmen. Davon hat einer eine hohe Affinität zum Einzelstrang (blau) und der andere (rot) entweder eine niedrige Affinität für den Einzelstrang oder eine hohe Affinität für den Doppelstrang. Durch Ligandenbindung bzw. ATP-Hydrolyse tauschen die Konformationszustände im nächsten Schritt. Basenpaare des Doppelstranges werden getrennt, der Vorgang beginnt von vorne. c) Destabilisierungsmodell. Die Helikase bindet RNA und ATP und nimmt eine geschlossene Konformation ein. Die RNA wird geknickt, was die Stärke der Basenpaarbindungen verringert. Nach ATP-Hydrolyse und der damit verbundenen Konformationsänderung wird der Doppelstrang endgültig getrennt.*

verantwortlich. Mutationen in Motiv III (SAT-Motiv) reduzieren die Helikaseaktivität, während die Bindung und Hydrolyse von ATP, sowie die RNA-Bindung nur leicht beeinträchtigt sind (Pause & Sonenberg, 1992; Gross & Shuman, 1998; Schwer & Meszaros, 2000). Motiv VI besitzt die Konsensussequenz HRIGRTGR und befindet sich an der Schnittstelle zwischen Domäne 1 und 2. Über das Histidin wechselwirkt es mit Motiv II. Möglicherweise stabilisiert es auch über die Arginine ein Wasser-Mg<sup>2+</sup>- $\beta$ - $\gamma$ -Phosphat-Intermediat während der Hydrolyse.

Alle bisher untersuchten DEAD-box Helikasen mit Entwindungsaktivität benötigen als Substrat der Entwindung eine Duplex, bei der mindestens ein Strang aus RNA besteht (Cordin et al., 2006). Wenige Helikasen wie eIF4A, Rh1E und p68 entwinden Substrate ohne Überhang (Rogers et al., 2001, Huang & Liu, 2002, Bizebard et al., 2004). Die Entwindung ist zumeist bidirektional in 5'-3' und 3'-5' Richtung. Einige, wie z.B. DbpA allerdings entwinden strikt in eine Richtung (hier: 3'-5') (Diges & Uhlenbeck, 2001) und benötigen für die Erkennung einen einzelsträngigen Bereich in 5'-Orientierung zum Doppelstrang.

DEAD-box Helikasen sind zumeist nicht prozessiv, nur wenige entwinden Doppelstränge, welche länger als 10 bis 25 Basenpaare sind. Die Entwindungsaktivität ist stark abhängig von der Stabilität der Doppelstränge. Zudem hat die Länge der flankierenden einzelsträngigen Bereiche einen Einfluss auf die Aktivität. Die Anzahl der Basenpaare pro Entwindungsschritt liegt bei ca. 5-6 Basenpaaren (Rogers et al., 1999).

Es existieren mehrere Modelle für den Entwindungsmechanismus von DEAD-box-Proteinen. Eines ist der sogenannte *inchworm*-Mechanismus (engl. *inchworm*: die Raupe). Hierbei bindet die Helikase an einen einzelsträngigen Bereich der RNA in der Nähe des Doppelstrangs. Durch ATP-Bindung und Hydrolyse und der damit verbundenen Konformationsänderung „schiebt“ sich die Helikase ähnlich wie ein Schneepflug in den Doppelstrang und löst somit Basenpaarungen (Abbildung 1a). Ein anderes Entwindungsmodell, der *active-rolling*-Mechanismus geht von einem funktionalen Helikasedimer mit zwei Konformationszuständen der Untereinheiten aus. Eine Konformation hat eine hohe Affinität für die Bindung an einen einzelsträngigen Bereich, während die andere entweder keine Affinität für den Einzelstrang besitzt oder eine hohe Affinität für den Doppelstrang. Bindet also die Untereinheit mit hoher Affinität für den Einzelstrang neben einem doppelsträngigen Bereich, so werden durch Ligandenbindung die Konformationen in den Untereinheiten getauscht und der Doppelstrang entwunden (Abbildung 1b). Ein drittes Modell ist das Destabilisierungsmodell. Durch Bindung von RNA und ATP an die Helikase, welche hierauf eine geschlossene Konformation einnimmt, wird die Struktur der RNA verändert, sie wird „geknickt“. Hierdurch wird die Stabilität der Basenpaarbindungen verringert. Findet nach der ATP-Hydrolyse eine weitere Konformationsänderung der Helikase statt, werden die Bindungen in diesem Bereich noch weiter geschwächt und die Basenpaare getrennt, wodurch der Doppelstrang entwunden wird. Dieses Modell wurde für die Helikasen Vasa aus *Drosophila* und YxiN aus *B. subtilis* postuliert (Abbildung 1c, Theissen et al., 2008). Neue Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Entwindung von der Energie der ATP-Hydrolyse unabhängig ist. Die Spaltung von ATP würde somit nur den Ausgangszustand des Proteins wiederherstellen, der eine geringere

Affinität zur RNA hat und dadurch die Helikase für eine weitere Reaktion zur Verfügung stellen (Liu et al., 2008). Ob die Hydrolyse aber vor oder nach Freisetzung der getrennten Stränge statt findet, ist noch nicht bekannt.

Hera (*heat resistant RNA dependent ATPase*) ist eine thermophile DEAD-box Helikase aus *Thermus thermophilus* (Morlang et al., 1999). Die Sequenz weist alle charakteristischen Motive auf, darüber hinaus findet sich im verlängerten C-Terminus ein Motiv mit einer schwachen Sequenzhomologie zu den Proteinkomponenten (RnpAs) bakterieller RNase P-Komplexe (Abbildung 2). RnpAs besitzen 3  $\alpha$ -Helices. Helix 2 enthält die RNA-Bindedomäne (RBD) und Helix 3 trägt vermutlich zur Stabilität des Proteins bei (Gössringer et al., 2007). In der RBD finden sich drei konservierte Arginine, welche für die Bindung der RNA essentiell sind. Bei Mutation von mindestens zwei dieser Arginine verliert RnpA die Fähigkeit RNA zu binden vollständig (Jovanovic et al., 2002). 3 Arginine im selben Abstand zueinander finden sich auch im C-Terminus von Hera (R378, R383 und R386) und waren das ausschlaggebende Argument für die Sequenzhomologie von Hera und RnpA (Morlang et al., 1999). Über die RBD bindet RnpA die RNase P RNA. RNase P RNA ist der eigentliche katalytische Bestandteil des Ribozymkomplexes und prozessiert die 5'-Enden von Vorläufer-tRNAs. RNase P RNAs weisen komplexe Sekundärstrukturen auf. Sie lassen sich anhand dieser Strukturen in zwei unterschiedliche Typen, A und B unterteilen (Brown et al., 1996; Haas et al., 1996). *In vitro* sind diese RNAs auch ohne Proteinkomponente aktiv, *in vivo* benötigen sie jedoch RnpA. Eine wichtige Aufgabe des Proteins ist hierbei Unterschiede in den Strukturen der zu prozessierenden RNAs auszugleichen, um so die Bindung zu erleichtern und die Rahmenbedingungen für die Katalyse anzugleichen (Sun et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass Hera nicht spezifisch für ein bestimmtes RNA-Substrat ist. Die ATP-Hydrolyse wird allerdings bevorzugt durch 16S und 23S rRNA, sowie RNase P RNA stimuliert (Morlang et al., 1999). Mit Hilfe von RNA-DNA-Hybriden konnte eine Entwindungsaktivität von Hera dokumentiert werden. Durch Deletion der 146 carboxyterminalen Aminosäuren wurde die Hydrolyserate deutlich verringert und eine Helikaseaktivität war nicht mehr nachzuweisen. Es wurde daher vermutet, dass Domänen und Bereiche im C-Terminus von Hera die Substratspezifität vermitteln (Linden et al., 2008) und zudem die Thermostabilität der Helikase fördern (Klostermeier & Rudolph, 2009). Aufgrund der Stimulation durch rRNA wurde vermutet, Hera könnte wie andere DEAD-box Helikasen an der ribosomalen Biogenese beteiligt sein.

### A

		<b>Q-Motiv</b>	<b>Motiv I</b>		
YxiN	MSHFKNYQISHDILRALEGLGYTEPTKV	Q	S	60	
DbpA	-----MGYLTMTFPV	Q	A	41	
Hera	-MEFKDFPLKPEILEALHGRGLTTPPI	Q	A	59	
		* * : * : . : * * * : : : * * * * * : * . : :			
		<b>Motiv Ia</b>			
YxiN	CELANWDE---NKPQALILT	P	V	116	
DbpA	LQQIDASL---FQTQALVLC	P	A	98	
Hera	AERLAPSQERGRKPRALVLT	P	A	116	
		: . . : : * * * * * * * * * * * * * * * * * : : . * : : * : . * :			
		<b>Motiv Ib</b>	<b>Motiv II</b>		
YxiN	LKQKSHIVVGT	T	D	176	
DbpA	LQHAPHIIVA	T	D	158	
Hera	LLRGADAVVA	T	D	176	
		* : . . : * * * * * * * * * * * * * * * * * : : : : * . . *			
		<b>Motiv III</b>			
YxiN	TTMLF	S	K	236	
DbpA	QTLF	S	K	217	
Hera	QTLF	S	K	234	
		* : * * * * * * . : : : * * * : . * . . . : : * : *			
		<b>Motiv IV</b>			
YxiN	TENPDSC	I	K	296	
DbpA	LHQPS	I	K	277	
Hera	VASPD	I	K	294	
		. * . . : * * * * . : : : * * * . . : * * * : * * * . : * * . * * * *			
		<b>Motiv V</b>	<b>Motiv VI</b>		
YxiN	TDVA	A	R	356	
DbpA	TDVA	A	R	337	
Hera	TDVA	A	R	354	
		* * * * * * * * * . : * * * * : * : * * * * * * * * * * * . : : . * : : . :			
		<b>α15</b>			
		<b>RNase P Motiv</b>	<b>α16</b>	<b>α17</b>	<b>α18</b>
YxiN	EYIGFEIPKIEAPSQEEVARKKPEFLAKLNDRPESK	-----	-----	-----	KDKSEELNKDI 403
DbpA	DMLQIKLNWQTPPANSSIVT	-----	-----	-----	-----LEAEM 362
Hera	RAVGRRFKRVP	T	V	L	414
		: . : . * : . . :			: : :
YxiN	MKLYFN	G	K	K	449
DbpA	ATLCID	G	K	K	408
Hera	L	L	L	L	474
		* : * . : . : . : . . : : * : : * * *			
YxiN	ILNGKGPHVLKVMKNTTVKKGQLKVNKANK	-----	-----	-----	479
DbpA	VRQAVAHKAWQLGGKIKGKTCRVRLK	-----	-----	-----	437
Hera	LRPEARPEVAGLRLEPARRVEGLELIPSRTRRPARA	-----	-----	-----	510
		: . . . : : :			

### B

IGNAVM	RNR	KRL	R	<i>B. subtilis</i>	RnpA
VRAHER	RNR	KRL	R	<i>E. coli</i>	RnpA
VGKAVV	RNV	KVR	R	<i>T. thermophilus</i>	RnpA
VLEAK	W	R	HLL	A	Hera

Abb. 2.: A) Vergleich der Sequenzen von Hera mit DbpA (E. coli) und YxiN (B. subtilis). Die konservierten Motive sind in blau, das vermutete RNase P RNA-Bindemotiv in gelb, α-Helices in der CTD grün hervorgehoben. α15 umfasst das RNase P RNA Bindemotiv. B) Vergleich der RNase P RNA-Bindemotive verschiedener RnpAs mit Hera. Die konservierten Arginine sind rot hervorgehoben. Es ist klar zu sehen, dass die Ähnlichkeit eher schwach ausgeprägt ist.

Überraschenderweise zeigte sich, dass Hera auch in Abwesenheit von Liganden ein stabiles Dimer ausbildet. In Hera bilden die Aminosäuren 1-365 die Helikase domäne (*core*) aus den RecA-ähnlichen Domänen. Strukturelle Untersuchungen (Klostermeier & Rudolph, 2009) haben gezeigt, dass die Aminosäuren 370-419 vor allem  $\alpha$ -Helices ausbilden ( $\alpha 15$ - $\alpha 18$ ).

Hier findet sich das Motiv, welches den hydrophoben Kern der Dimerisierungsdomäne bildet und einem *leucine zipper* ähnelt. Kristallstrukturen zeigen sowohl eine symmetrische als auch eine asymmetrische Anordnung der Untereinheiten im dimeren Hera, welche um  $34^\circ$  zueinander orientiert sind. Diese Orientierung wird zum Teil durch die Proline 366 und 369 bedingt. Das eigentliche Dimerisierungsmotiv findet sich allerdings im Bereich der  $\alpha$ -Helix 18 ( $\alpha 18$ , Abbildung 2). Van der Waals-Kräfte orientieren die Helices der beiden Untereinheiten parallel zueinander. Diese Domäne kann in Hera bis zu  $17^\circ$  rotiert werden, was die Flexibilität des Dimers noch weiter erhöht. Das Dimer ist aussergewöhnlich stabil und dissoziiert nur langsam bei Inkubation über mehrere Minuten bei  $65^\circ\text{C}$ .

Die Struktur im Bereich der Aminosäuren 419-510 ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass sich in diesem Bereich spezifische RNA-Bindemotive befinden. Obwohl die Dimension der C-terminalen Verlängerung der RBD von YxiN (Wang et al., 2008) entspricht, so zeigt ein Vergleich der Sequenzen keine nennenswerte Übereinstimmung.

Die C-terminale Verlängerung in Hera erfüllt also eine doppelte Aufgabe, indem sie für spezifische RNA-Bindung und Dimerisierung zuständig ist. Die hohe Beweglichkeit der Untereinheiten könnte hierbei die Bindung und Positionierung vor allem grosser RNAs für die Entwindung erleichtern.

## 2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die katalytischen Eigenschaften der thermophilen DEAD-box Helikase Hera aus *Thermus thermophilus* genauer zu erforschen. Diese umfassen zum einen eine ATPase-Aktivität, welche durch die Anwesenheit von Nukleinsäuren stimuliert wird, zum anderen die Entwindung doppelhelikaler Abschnitte in Nukleinsäuren (Morlang et al., 1999).

Obwohl DEAD-box-Helikasen eine Vielzahl konservierter Motive gemein haben, ist bis heute wenig über ihre Funktionsweise *in vivo* bekannt. Hera bildet hier keine Ausnahme. Bisher war lediglich bekannt, dass die ATP-Hydrolyse durch Hera durch RNA-Substrate stimuliert wird, hauptsächlich durch 16S und 23S rRNA, sowie RNase P RNA. Die C-terminale Domäne vermittelt die Bindungsspezifität. Ausserdem enthält sie ein Motiv mit schwacher Sequenzhomologie zu dem RNase P RNA-Bindemotiv bakterieller RnpAs. Aus diesem Grund werden folgende Eigenschaften von Hera detailliert untersucht:

- Der ATP-Umsatz im Fließgleichgewicht und bei Einzelumsätzen in Ab- und Anwesenheit von RNAs
- Die Bindung von Nukleotiden
- Die Bindung von RNA
- Die Konformationsänderung der Helikase, welche Wechselwirkung mit Nukleinsäuren und ADPNP verursacht wird und somit die Voraussetzungen für die Entwindungsreaktion schafft (Aktivierung)
- Die Entwindungsaktivität
- Der Einfluss von Mutationen in Motiv I, Motiv III, dem vermeintlichen RNase P RNA-Bindungsmotiv und der C-terminalen Domäne auf ATP-Umsatz, Substratbindung und Aktivität.

Durch diese Experimente verspricht man sich Hinweise auf die Frage, ob Hera ein Helikase im eigentlichen Sinne ist, also Entwindungsaktivität aufweist, mit welchen Nukleinsäuren Hera wechselwirkt und ob sich ATP-Hydrolyse oder Entwindung durch Mutationen gezielt beeinflussen lassen. Besondere Aufmerksamkeit fällt hierbei der C-terminalen Domäne von Hera zu. Die Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion *in vivo* ermöglichen. Neben biochemischen Standardmethoden werden verstärkt konfokale Einzelmolekülmessungen zur Beobachtung der Konformationsänderung eingesetzt.

Hera nimmt unter den bisher untersuchten DEAD-box Helikasen eine Sonderstellung ein, da es schon bei niedrigsten Konzentrationen im pM Bereich ein Dimer ausbildet. Die Besonderheiten, die sich dadurch für die Interpretation von Einzelmolekülmessungen ergeben, werden ebenfalls in dieser Arbeit abgehandelt.

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

**AppliChem GmbH (Darmstadt, D)** Glycerin 99.5%

**Becton Dickinson Labware Europe (Le Pont De Claix, F)** 50 ml Polypropylene Conical Tube

**Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)** Micro Bio-Spin<sup>®</sup> Columns 30

**Brand GmbH + Co KG (Wertheim, D)** UV-Küvette mikro

**Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe, D)** Roti<sup>®</sup> – Mark STANDARD

**Eppendorf AG (Hamburg, D)** Microtubes

**Fluka Chemie AG (Basel, CH)**, Aktivkohle

**Greiner Bio-One AG (Frickenhausen, D)** Tubes (15, 50 ml)

**Invitrogen (Carlsbad, USA)** Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub> Maleimid, Alexa Fluor 546 C<sub>5</sub> Maleimid, Tris-(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP)

**Jena Biosciences (Jena, D)** Adenosin-5'-( $\gamma$ -thio)-triphosphat, Lithiumsalz (ATP $\gamma$ S), Adenosin-5'-[( $\beta,\gamma$ )-methylen]triphosphat, Natriumsalz (ADPCP), Adenosin-5'-[( $\beta,\gamma$ )-imido]triphosphat, Natriumsalz (ADPNP), 2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosin-5'-diphosphat, Triethylammoniumsalz (mantADP), 2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosin-5'-triphosphat, Triethylammoniumsalz (mantATP)

**Merck KGaA (Darmstadt, D)** pH 0-14 Universalindikator

**New England Biolabs (Ipswich, USA)** DNA Standard 1kb, DNA Standard 100 bp

**Pharma Waldhof (Düsseldorf, D)**, Adenosindiphosphat (ADP), Natriumsalz, Adenosinmonophosphat (AMP), Natriumsalz

**QIAGEN GmbH (Hilden, D)** QIAprep Spin<sup>®</sup> Miniprep Kit (250)

**Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)** Protease inhibitor complete EDTA-free, Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) Natriumsalz, Phosphoenolpyruvat (PEP)

**Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, D)** Vivaspin 20, Vivaspin 500 (10000 MWCO), Vivaspin 20 (3000 MWCO) Konzentratoren

**Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, D)** sterile Pipetten, Tubes (15, 50 ml)

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)** Adenosintriphosphat (ATP), Adenosin-5'-[( $\beta,\gamma$ )-imido]triphosphat, Lithiumsalz (ADPNP)

**Spectrum Laboratories (Ranch Dominguez, USA)** Dialyseschläuche 12-14000, 3000 MWCO

**STARLAB (Ahrensburg, D)** Pipettenspitzen

**TreffLab (Degersheim, CH)** Pipettenspitzen, Microtubes

Alle anderen Chemikalien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von den Herstellern Merck KGaA oder Carl ROTH GmbH + Co, Reinheitsgrad p.a. Stamm- und Pufferlösungen wurden durch Nylonmembranen, 0.22 µm (Millipore, Molsheim, F) steril filtriert.

**3.1.2 Enzyme und Proteine**

**Finnzymes (Espoo, FIN)** Phusion High Fidelity DNA Polymerase

**Invitrogen (Carlsbad, USA)** TEV Protease

**New England Biolabs (Ipswich, USA)** *DpnI*

**Promega (Madison, USA)** *Pfu*- DNA Polymerase, *GoTaq*- DNA Polymerase

**Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)** Laktatdehydrogenase (LDH), Pyruvatkinase (PK) aus Kaninchenmuskel

**Stratagene (Cedar Creek, USA)** *Pfu*- UltraII DNA Polymerase

**3.1.3 Bakterienstämme und Plasmide**

<i>Escherichia coli</i> XL 1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 λ- lac [F'proAB lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn 10 (Tet<sup>R</sup>)] (Stratagene, Heidelberg)</i>
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) RP	B F- <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal endA Hte</i> [ <i>argU proL Cam<sup>r</sup></i> ]
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) RIL	B F- <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW Cam<sup>r</sup></i> ]
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacYl</i> (DE3) [ <i>argU argW ileX glyT leuW proL metT thrT tyrU thrU</i> ](Cam <sup>r</sup> )

Zu Beginn dieser Arbeit lag die *hera* Wildtypsequenz bereits über *NdeI* und *BamHI* Schnittstellen in einem pET 27b(+) Plasmidvektor der Firma Novagen (Darmstadt, D) kloniert vor. Der Vektor trägt eine Kanamycinresistenz. Das Gen steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors und unter der Regulation eines *lac* Operators. Die Möglichkeit der periplasmatischen Lokalisation wurde durch die Wahl der Schnittstellen eliminiert. Dieses

Konstrukt war Grundlage für alle Mutageneseexperimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Eine Ausnahme hiervon stellte das Konstrukt zur Produktion der C-terminalen Domäne (CTD) von Hera dar (Aminosäuren 370-510). Die entsprechende Sequenz wurde über *NcoI* und *BamHI* Schnittstellen in den Vektor pETM30 (Novagen, D) kloniert. Die CTD wird als Fusionsprotein mit Gluthation-S-Transferase (GST) und sechs N-terminalen Histidinen produziert, was Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose und Nickel-Sepharose ermöglicht.

Der GST/ Nickel-tag kann über Spaltung mit der TEV-Protease entfernt werden.

Ein weiteres Konstrukt, welches schon zu Beginn des Projektes vorlag, war *hera* 208-570 (Aminosäurereste 208 bis 570) in pET 27b. Dieses Konstrukt bildete die Grundlage für ein verwendetes Proteinfragment Hera 208-419. Hierzu wurde durch Mutagenese ein Stopcodon nach Aminosäure 419 eingeführt.

### 3.1.4 Oligonukleotide

#### DNA

Primer für Mutageneseexperimente wurden von den Herstellern MWG (Ebersberg, D), Purimex (Greibenstein, D) und Microsynth (Balgach, CH) bezogen. In der folgenden Auflistung sind die Sequenzen der komplementären Primerpaare wiedergegeben, wobei 5' den kodierenden, 3' den komplementären Strang kennzeichnet (mutierte Triplets farblich hervorgehoben):

Name	Sequenz
Hera E115C 5'	5'-C GGC AAG CAG AAG <b>TGC</b> GCC CTC CTC CGG GGG G-3'
Hera E115C 3'	5'-C CCC CCG GAG GAG GGC <b>GCA</b> CTT CTG CTT GCC G-3'
Hera R260C 5'	5'-CAA GGC CTT TTG <b>TGC</b> TTG GGC CAC CCG-3'
Hera R260C 3'	5'-CGG GTG GCC CAA <b>GCA</b> CAA AAG GCC TTG-3'
Hera K51Q 5'	5'-CG GGC ACC GGC <b>CAG</b> ACC CTG GCC TTC GC-3'
Hera K51Q 3'	5'-GC GAA GGC CAG GGT <b>CTG</b> GCC GGT GCC CG-3'
Hera V411K 5'	5'-CGG GTG GAG GTG <b>AAA</b> GCC GCC CTC CTC GC-3'
Hera V411K 3'	5'-GC GAG GAG GGC GGC <b>TTT</b> CAC CTC CAC CCG-3'
Hera V411E 5'	5'-CGG GTG GAG GTG <b>GAA</b> GCC GCC CTC CTC GC-3'

Hera V411E 3'	5'-GC GAG GAG GGC GGC <b>TTC</b> CAC CTC CAC CCG-3'
Hera SAT 5'	5'-C CTC TTC <b>GCC</b> GCC <b>GCC</b> CTC CCC TCC-3'
Hera SAT 3'	5'-GGA GGG GAG <b>GGC</b> GGC <b>GGC</b> GAA GAG G-3'
Hera RNaseP 5'	5'-GGC CAA GTG G <b>GCC</b> CAC CTT TTG GCC <b>GCC</b> CTC GCC <b>GCC</b> GTG CCG GAG-3'
Hera RNaseP 3'	5'-CTC CGG CAC <b>GGC</b> GGC GAG <b>GGC</b> GGC CAA AAG GTG <b>GGC</b> CCA CTT GGC C-3'
Hera 366 stop 5'	5'-GGG CGC CGC TTC AAG CGG GTG AAC <b>TAG TAA</b> ACC CCG GAG GAG GTC CTC G-3'
Hera 366 stop 3'	5'-C GAG GAC CTC CTC CGG GGT <b>TTA CTA</b> GTT CAC CCG CTT GAA GCG GCG CCC-3'
Hera 419 stop 5'	5'-C CTC GCC CTC CTC CTG <b>TGA TGA</b> GCG CCC GC-3'
Hera 419 stop 3'	5'-GC GGG CGC <b>TCA TCA</b> CAG GAG GAG GGC GAG G-3'

Zur überlappenden Sequenzierung der Mutageneseprodukte wurden firmeneigene T7-Promotor und T7-Terminator Primer (Microsynth, CH) und Hera mid\_neu1 (5'-GCG GCA GGG GGT CTT GG-3') verwendet.

Für die Einzelmolekül-FRET-Messungen wurde zusätzlich ein Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-GCC AGA CCC TCC TCT TCG CCG CCG CCC TCC CCT CCT GGG CGA AAA GG-3' als einzelsträngiges Substrat verwendet. Für das entsprechende Experiment mit doppelsträngiger DNA wurde das Substrat mit dem Komplementärstrang hybridisiert.

## RNA

Kürzere RNA-Oligonukleotide für Einzelmolekülmessungen und ATPase- und Entwindungstests wurden HPLC gereinigt und lyophilisiert von den Herstellern Purimex (Greibenstein, D) und Microsynth (Balgach, CH) bezogen:

Name	Sequenz
S1 (9mer)	5'-UUG GGA CCU-3'
S1_fl (9mer)	5'-UUG GGA CCU-3'-Fluoreszein
Tth_S1 (32mer)	5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG GCU GUU CGC CCA UU-3'

Tth_S1_muthp (32mer)	5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG GAU GUU CUC CCA UU-3'
Tth_S1_mutloop (32mer)	5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG GCU UUA CGC CCA UU-3'
32mer_Loop4	5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG GCU GUU GCC CAU U- 3'
32mer_Loop6	5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG GCU GUU UCG CCC AUU-3'
32mer_Hp4	5'-CGA GGU CCC AAG GGU UGG CUG UUC CCC AUU-3'
32mer_Hp6	5'-CGA GGU CCC AAG GGU UAG GGC UGU UCG CCC UAU U-3'
tRNA hairpin	5'-GGA UUU UCC CUU UCG CGG GAG GAA ACU CCC CGU CC-3'

Die 32mer Oligonukleotide beinhalten hairpin 92 (unverändert und mutiert, muthp, mutloop, 32mer\_Loop4, 32mer\_Loop6, 32mer\_Hp4, 32mer\_Hp6) der 23S rRNA von *B. subtilis* und bilden ein kurzes doppelsträngiges Segment, wenn sie an die komplementären 9mer Oligonukleotide gebunden sind.

Poly U RNA wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH) erworben.

Ein 153 bp RNA Fragment aus der 23S rRNA von *B. subtilis*, ebenfalls mit hairpin 92, wurde mittels T7- *in vitro*- Transkription synthetisiert (Karow et al., 2007):

153mer rRNA	5'-GGC UUA UCU CCC CCA AGA GUC CAC AUC GAC GGG GAG GUU UGG CAC CUC GAU GUC GGC UCA UCG CAU CCU GGG GCU GUA GUC GGU CCC AAG GGU UGG GCU GUU CGC CCA UUA AAG CGG UAC GCG AGC UGG GUU CAG AAC GUC GUG AGA CAG UUC-3'
-------------	---

Aus der Arbeitsgruppe von Roland Hartmann, Universität Marburg wurden uns folgende RNAs freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie wurden ebenfalls mittels T7- *in vitro*- Transkription hergestellt (Busch et al., 2000; Heide et al., 1999):

*T. thermophilus*

RNase P RNA

5'-GGG AAU UCC GGG ACG AGG GCG CGG UCG CGC  
CCG AGG GCC GAA CCC CUC GGG UGA GGA AAG UCC  
GGG CAC CAU AGG GCA GGG UGC CAG GUA ACG CCU  
GGG CGG GGU AAC CCG ACG GAA AGU GCC ACA GAG  
AAG AGA CCG CCA GCG GCC GGG GCU UCC CCC GGU  
GCG GGC AAG GGU GAA ACG GCG GGG UAA GAG CCC  
ACC GCC UGG CCU GGC AAC AGG CCG GGG CAC GGC  
AAA CCC CAC CCG GUG CAA GGC CCG GUA GGC AGG  
GAG GGC UUG CCC GGC CCG AGA GAA CCU GCG GGA  
UGG GCC GCU UGA GGC CGG UGG CGA CAC CGG UCC  
CAG AGA GAU GAC CGC GGA AAA CAG AAC CCG GCU  
UAC GCC UCG UCC CGG AGG C-3'

*T. thermophilus*

RNase P RNA, S-Domäne

5'-GGG UGC CAG GUA ACG CCU GGG CGG GGU AAC  
CCG ACG GAA AGU GCC ACA GAG AAG AGA CCG CCA  
GCG GCC GGG GCU UCC CCC GGU GCG GGC AAG GGU  
GAA ACG GCG GGG UAA GAG CCC ACC GCC UGG CCU  
GGC AAC AGG CCGG GGC ACG GCA AAC CCC ACC C-  
3'

*T. thermophilus*

RNase P RNA, C-Domäne

5'-GGG AAU UCC GGG ACG AGG GCG CGG UCG CGC  
CCG AGG GCC GAA CCC CUC GGG UGA GGA AAG UCC  
GGG CAC CAU AGG GCA GUG CAA GGC CCG GUA GGC  
AGG GAG GGC UUG CCC GGC CCG AGA GAA CCU GCG  
GGA UGG GCC GCU UGA GGC CGG UGG CGA CAC CGG  
UCC CAG AGA GAU GAC CGC GGA AAA CAG AAC CCG  
GCU UAC GCC UCG UCC CGG AGG C-3'

*B. stearothermophilus*

RNase P RNA

5'-GUU AAU CAU GCU CGG GUA AUC GCU GCG GCC  
GGU UUC GGC CGU AGA GGA AAG UCC AUG CUC GCA  
CGG UGC UGA GAU GCC CGU AGU GUU CGU GCC UAG  
CGA AUC CAU AAG CUA GGG CAG CCU GGC UUC GGC  
UGG GCU GAC GGC GGG GAA AGA ACC UAC GUC CGG  
CUG GGA UAUGG UUC GAU UAC CCU GAA AGU GCC

ACA GUG ACG GAG CUC UAA GGG AAA CCU UAG AGG  
 UGG AAC GCG GUA AAC CCC ACG AGC GAG AAA CCC  
 AAA UGA UGG UAG GGG CAC CUU CCC GAA GGA AAU  
 GAA CGG AGG GAA GGA CAG GCG GCG CAU GCA GCC  
 UGU AGA UAG AUG AUU ACC GCC GGA GUA CGA GGC  
 GCA AAG CCG CUU GCA GUA CGA AGG UAC AGA ACA  
 UGG CUU AUA GAG CAU GAU UAA CGU G-3'

*E. coli*

RNase P RNA

5'-GGG AUC CUG ACC AGA CAG UCG CCG CUU CGU  
 CGU CGU CCU CUU CGG GGG AGA CGG GCG GAG GGG  
 AGG AAA GUC CGG GCU CCA UAG GGC AGG GUG CCA  
 GGU AAC GCC UGG GGG GGA AAC CCA CGA CCA GUG  
 CAACAG AGA GCA AAC CGC CGA UGG CCC GCG CAA  
 GCG GGA UCA GGU AAG GGU GAA AGG GUG CGG  
 UAA GAG CGC ACC GCG CGG CUG GUA ACA GUC CGU  
 GGC ACG GUA AAC UCC ACC CGG AGC AAG GCC AAA  
 UAG GGG UUC AUA AGG UAC GGC CCG UAC UGA ACC  
 CGG GUA GGC UGC UUG AGC CAG UGA GCG AUU GCU  
 GGC CUA GAU GAA UGA CUG UCC ACG ACA GAA CCC  
 GGC UUA UCG GUC AGU UUC ACC UGA UUU AC-3'

*E.coli*

RNase P RNA, C-Domäne

5'-GGA AGC UGA CCA GAC AGU CGC CGC UUC GUC  
 GUC GUC CUC UUC GGG GGA GAC GGG CGG AGG GGA  
 GGA AAG UCC GGG CUC CAU AGG GCA GGG UGG  
 AAA CAC CCG GAG CAA GGC CAA AUA GGG GUU CAU  
 AAG GUA CGG CCC GUA CUG AAC CCG GGU AGG CUG  
 CUU GAG CCA GUG AGC GAU UGC UGG CCU AGA UGA  
 AUG ACU GUC CAC GAC AGA ACC CGG CUU AUC GGU  
 CAG UUU CAC CUG AAU UC-3'

tRNA, Vorläufer-

5'- GGA UUU UCC CUU UCG CGG GAG UGA CUC AGU  
 CGG UAG AGC ACG ACC UUG CCA AGG UCG GGG UCG  
 CGG GUU CAA GUC CCG UCU CCC CGU CCA GUC-3'

tRNA, 5'-prozessiert      5'- G CGG GAG UGA CUC AGU CGG UAG AGC ACG ACC  
UUG CCA AGG UCG GGG UCG CGG GUU CAA GUC CCG  
UCU CCC CGU CCA GUC-3'

### 3.1.5 Geräte

**Beckman Coulter (Fullerton, USA)** Allegra 21R Zentrifuge

**Bischoff Chromatography (Leonberg, D)** Prontosil 120-5-C18 Umkehrphasen-HPLC-Säule

**Eastman Kodak EDAS 290** Geldokumentation

**Eppendorf (Hamburg, D)** ThermoStat plus Heizblock, Mastercycler gradient Thermocycler, Biophotometer, Zentrifuge 5402

**GE Healthcare (Oetelfingen, CH)** Ultrospec 2100p UV/Vis Spektrometer, ÄKTA prime, ÄKTA Purifier mit Säulen Superdex 200 Hiloal 16/60, Superdex 75 Hiloal 16/60, Superdex 200 10/300 GL, Superdex 75 10/300 GL, SP-Sepharose Fast Flow 10 ml (selbstgepackt), Heparin-Sepharose Fast Flow 10 ml (selbstgepackt), Q-Sepharose 10 ml (selbstgepackt), HiTrap Blue HP 5 ml, Heparin HiTrap 5 ml, SP-Sepharose HiTrap 1 ml, SP-Sepharose Fast Flow 1 ml, SP-Sepharose XL 1 ml, Mono-S 5/50 GL, Electrophoresis Power Supply EPS 300 und 301

**Hellma (Müllheim, D)** Quarzküvetten

**Heraeus (Hanau, D)** Biofuge pico Zentrifuge

**Horiba (Dalston Gardens, UK)** Fluoro Max-3 Fluorimeter

**Huber (Offenburg, D)** polystat cc1 Badthermostat

**IKA (Staufen, D)** RCT basic Waage

**Infors (Bottmingen, CH)** Minitron Inkubator

**Mettler (Giessen, D)** Analysewaage AE240

**Microfluidics (Lampertheim, D)** Mikrofluidizer Modell 110L

**Sorvall (Zürich, CH)** RC 5C Plus Zentrifuge

### 3.1.6 Datenauswertung

Zur Auswertung der Experimente wurde das Programm OriginPro 7.5 der Firma OriginLab Corporation (Northhampton, USA) verwendet. Die Rücktitrationen bei mant-Nukleotid-Fluoreszenz-Titrationen wurden mit der Software Scientist 3.0 der Firma Micromath Research

(Saint Louis, USA) ausgewertet. FPLC- und HPLC- Anwendungen wurden mit den Programmen Unicorn, Version 5.10 (ÄKTA Purifier) oder PrimeView, Version 5.0 (ÄKTA Prime, basierend auf Unicorn, Version 5.01) von Amersham Biosciences (mittlerweile GE Healthcare, Otelfingen, CH) durchgeführt. Das UV/Vis- Spektrometer (Eppendorf, Hamburg, D) wurde durch die Software Swift II Instrument Control, Version 2.04 von Biochrom Ltd. gesteuert. Für Messungen am Horiba Fluoro Max-3 Fluorimeter (Dalston Gardens, UK) stand das Origin- basierende Programm FluorEssence, Version 2.1.0.0 zur Verfügung. Agarose- und Polyacrylamidgelbilder wurden mit der Software Kodak 1D, Version 3.6.1 der Eastman Kodak Company erstellt und ausgewertet.

DNA-Sequenzen wurden mit der Online Software ClustalW2 verglichen (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Das Molekulargewicht und der molare Extinktionskoeffizient von Proteinen wurden mit dem *Peptide Property Calculator* der Northwestern University (Evanston, USA) ermittelt (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>).

Für die die Auswertung der Einzelmolekülmessungen wurde ein auf LabView (LabView v.8.2, National Instruments, Austin, USA) basierendes Programm verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Agarosegelelektrophorese

**1 x TBE Puffer:** 89 mM Tris, 89 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 8.3

**Probenpuffer:** 10 mM EDTA, pH 8.0, 50 % (v/v) Glycerin, 0.02 % (w/v) Bromphenolblau, 0.02 % Xylencyanol

Zur analytischen Identifizierung wurden DNA-Fragmente mittels horizontaler Gelelektrophorese auf 0.8 % (w/v) oder 2 % (w/v) Agarosegelen getrennt. Die DNA- Proben wurden mit 1/5 Volumen 6 x Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der zu untersuchenden Banden wurden jeweils 5 µl einer 1 kb oder 100 bp DNA- Leiter verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 0.5 x TBE als Laufpuffer, 20 min bei 16 V/cm. Das Gel wurde anschliessend 20-30 min in einer 0.05 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und unter UV-Licht dokumentiert.

### 3.2.2 SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese

**Sammelgel:** 4.5 % Acrylamid, 0.1 % Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6.8, 0.06 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 0.1 % TEMED, 0.1 % Ammoniumperoxiddisulfat

**Trenngel:** 15 % Acrylamid, 0.4 % Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.06 % TEMED, 0.086 % Ammoniumperoxidsulfat

**Laufpuffer:** 24 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1 % SDS

**4 x Probenpuffer:** 130 mM Tris/HCl, pH 6.8, 200 mM DTT, 4 % SDS, 0.01 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin

**Färbelösung:** 50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0.1 % Brilliant Blau R250

**Entfärbelösung:** 20 % Ethanol, 10 % Essigsäure

Mit Hilfe der SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteingemische denaturierend ihrer Grösse nach getrennt. Die zu untersuchenden Lösungen wurden mit 1/3 Volumen 4 x Probenpuffer versetzt (im Falle von Bakterienpellets mit 1 x Probenpuffer) und 5 min bei 95°C erhitzt. Neben diesen Ansätzen wurde eine Proteinleiter der Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe, D) auf das Gel aufgetragen, mit den Grössenmarkern 200, 119, 66, 43, 29, 20 und 14.5 kDa. Die Trennung erfolgte zwischen 30 und 40 min bei einer Stromstärke von 30 mA und 37.5 V/cm pro Gel.

Das Sammelgel wurde hierauf entfernt und das Trenngel mindestens 30 min in Färbelösung geschwenkt. Anschliessend wurde das Gel ca. 20 min mit Entfärbelösung behandelt und über Nacht in Wasser vollständig entfärbt. Die Dokumentation erfolgte unter Weisslicht, bei fluoreszenzmarkierten Proteinen unter UV-Licht mit anschliessender Coomassie-Färbung.

### 3.2.3 Mutagenese

Ausgehend von der *hera* Wildtyp Sequenz, kloniert in den Vektor pET 27b(+) wurden per *site directed mutagenesis* nach einem Protokoll der Firma Stratagene (*QuickChange*<sup>TM</sup>-PCR) komplementäre Primerpaare entworfen, deren Schmelzpunkt in etwa 78°C betragen sollte und welche die gewünschte Mutation enthalten. 50 ng der zu verändernden Plasmid-DNA wurden mit je 200 nM der Primer, 200 µM dNTP-mix und 1 µl *Pfu*-Polymerase versetzt (2-3 u). Der Ansatz wurde im Thermocycler zuerst 5 min bei 95°C inkubiert und durchlief danach 25 Zyklen der folgenden Einzelschritte: 30 s 95°C, 30 s 50-65°C (Gradient), 13 min 30 s 68°C. Abschliessend wurde der Ansatz 5 min bei 68°C inkubiert und auf 4°C gekühlt. Da der hohe

GC-Gehalt von *hera* die Mutagenese erschwerte, wurden neben der *Pfu*-Polymerase von Promega auch noch die *Pfu* UltraII Polymerase von Stratagene und die Phusion High Fidelity Polymerase von Finnzymes verwendet. Die Parameter für die PCR wurden in diesen Fällen nach den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller verändert. Eine erfolgreiche Amplifikation der Mutageneseansätze wurde mittels Agarosegelelektrophorese auf 0.8 % Agarosegelen überprüft. Positive Ansätze wurden mit ca. 10 u *DpnI* 1.5 h bei 37°C inkubiert. *DpnI* spaltet hierbei die aus *E. coli* präparierte und deswegen methylierte Plasmid-DNA, aber nicht das PCR-Produkt. Die DNA wurde zu *E. coli* XL1 blue hitzekompetenten Zellen pipettiert, 10 min auf Eis inkubiert, 1 min 30 s auf 42°C erhitzt, 1-2 min auf Eis gekühlt, mit 800 µl LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 400 x g 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand grösstenteils verworfen, das Pellet im Restüberstand resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit 20 µg/ml Kanamycin als Selektionskriterium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Von gewachsenen Kolonien wurden Einzelausstriche plattiert und mittels Kolonie-PCR die Mutagenese auf eventuelle Insertionen oder Deletionen hin überprüft. Hierzu wurde ein Prämix aus 0.5 u *GoTaq* Polymerase (Promega), 500 µM dNTP-mix und je 500 nM eines Primerpaares hergestellt, welche möglichst nah in der Sequenz am Mutageneseort binden. Zu den Ansätzen wurde jeweils ein wenig Bakterienmasse von den Einzelausstrichen gegeben. Die Ansätze wurden im Thermocycler 5 min bei 95°C erhitzt und durchliefen anschliessend 25mal einen Zyklus bestehend aus den Schritten: 30 s 95°C, 30 s 52°C, 2 min 72°C. Abschliessend wurde noch 5 min bei 72°C inkubiert und auf 4°C gekühlt. Als Kontrolle dienten Ansätze, welche statt Bakterienzellen 25 ng *hera* Wildtyp-Plasmid enthielten.

Die PCR-Produkte wurden mittels 2% Agarosegelelektrophorese analysiert. War die Laufweite der Produkte mit der Kontrolle identisch, konnte die entsprechende Plasmid-DNA aus den Zellen für eine Sequenzierung präpariert werden. Die Plasmidpräparation erfolgte mit Hilfe eines QIAprep Spin<sup>®</sup> Miniprep Kit der Firma QIAGEN. Die Sequenzierungen wurden bei den Firmen Agowa (Berlin, D) und Microsynth (Balgach, CH) in Auftrag gegeben.

### 3.2.4 Proteinreinigung

Die Plasmide mit den eingeführten Mutationen wurden per Hitzetransformation (siehe 3.2.3) in *E. coli* BL21 (DE3) RP, BL21 (DE3) RIL oder Rosetta (DE3) Produktionsstämme transformiert. Die Produktion wurde in einer 10 ml 24 h-Kultur in Autoinduktionsmedium bei

37°C überprüft (Studier et al, 2005). Das Kulturmedium setzte sich wie folgt zusammen: 10 g/l Pepton, tryptisch verdaut, 5 g/l Hefeextrakt, 25 mM  $K_2HPO_4$ , 25 mM  $NaH_2PO_4$ , 50 mM  $NH_4Cl$ , 5 mM  $NaSO_4$ , 0.5 % (v/v) Glycerin, 0.5 g/l Glukose, 2 g/l  $\alpha$ -Laktose, 2 mM  $MgCl_2$ , 10  $\mu$ M  $FeCl_3$ , 4  $\mu$ M  $CaCl_2$ , 2  $\mu$ M  $MnCl_2$ , 2  $\mu$ M  $ZnSO_4$ , 0.4  $\mu$ M  $CoCl_2$ , 0.4  $\mu$ M  $CuCl_2$ , 0.4  $\mu$ M  $NiSO_4$ , 0.4  $\mu$ M  $Na_2MoO_4$ , 0.4  $\mu$ M  $Na_2SeO_3$  und 0.4  $\mu$ M  $H_3BO_3$ . Als Selektionskriterium enthielt das Medium 20  $\mu$ g/l Kanamycin und 10  $\mu$ g/l Chloramphenicol. Die Produktion des Proteins setzte ein, wenn die Glukose im Medium aufgebraucht war. In zeitlichen Abständen wurde 1 ml der Bakterienkultur entnommen, die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und 5 min bei 2500 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 x SDS Probenpuffer resuspendiert, 10 min bei 95°C inkubiert und identische Mengen Zellen auf ein 15 % Polyacrylamidgel aufgetragen.

Für die Reinigung im präparativen Massstab wurden 2 l des Autoinduktionsmediums mit 20 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und 24 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 4200 g und 4°C zentrifugiert und die Pellets in 40 ml Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 und 500 mM NaCl in Anwesenheit eines Proteaseinhibitors resuspendiert. Die Zellen wurden im Mikrofluidizer aufgeschlossen und der Rohextrakt 30 min bei 9559 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und vorerst bei 4°C gelagert. Die Pellets wurden in 10–15 ml des obigen Puffers resuspendiert und 2 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (9559 x g, 4°C, 30 min) wurden die Überstände vereinigt und 10 min bei 65°C inkubiert. Der Extrakt wurde 30 min bei 9559 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand unter Rühren auf Eis mit 40 % (w/v) Ammoniumsulfat versetzt. Der Fällungsansatz wurde zentrifugiert (9559 x g, 4°C, 30 min) und die Pellets in 6 ml Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl resuspendiert. Die Lösung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine S200 16/60 Grössenausschlusschromatographiesäule aufgetragen (Laufpuffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5) und die gewünschten Fraktionen vereinigt und gegen 2 x 1 l Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl für jeweils mindestens 2 h dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine Heparin-Sepharosesäule (Fast Flow, 10 ml, Flussrate 1 ml/min) aufgetragen und das Protein mit einem linearen Gradienten von 200 mM auf 2 M NaCl über 40 ml eluiert. Das Eluat wurde nochmals wie oben beschrieben dialysiert und auf eine SP-Sepharosesäule (Fast Flow, 10 ml, Flussrate 1 ml/min) aufgetragen und ebenfalls mit einem linearen Gradienten 200 mM auf 2 M NaCl über 40 ml eluiert. Abschliessend wurde das Eluat gegen 2 x 1 l Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl dialysiert und konzentriert. Reinheit und Konzentration wurden über Polyacrylamidgelelektrophorese und UV-Absorption bestimmt. In einigen Fällen, wenn das Protein noch mit Nukleinsäuren

verunreinigt vorlag, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mit einer Q-Sepharosesäule durchgeführt. Puffer für Cysteinmutanten enthielten zusätzlich noch 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern.

Ein unterschiedliches Reinigungsprotokoll wurde für die Produktion der C-terminalen Domäne (CTD) angewandt. Die entsprechende Sequenz lag in einen pETM30 Vektor kloniert vor, welcher dem exprimierten Peptid N-terminal einen Gluthation-S-Transferase- (GST) und einen Histidin-Tag ( $\text{His}_6$ ) anfügt. Nach Inkubation der Zellen über 24 h bei 37°C in 2 l Autoinduktionsmedium, Zellernte und Aufschluss im Microfluidizer wurde der Rohextrakt über eine GSH-Säule gereinigt (Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, Elution mit zusätzlich 20 mM Glutathion, Flussrate 1 ml/min). Das Eluat wurde über Nacht bei 4°C mit TEV-Protease inkubiert, wodurch GST- und  $\text{His}_6$ -Tag möglichst vollständig abgetrennt werden sollten. Der Verdauansatz wurde mit 20 mM Imidazol versetzt und auf eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose-Säule (Flussrate 1 ml/min) aufgetragen. Geschnittene CTD befand sich im Durchlauf, Tag und ungeschnittenes Protein wurden mit 500 mM Imidazol eluiert. Im nächsten Reinigungsschritt wurde der Durchlauf mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine S75 16/60 Grössenausschlusschromatographiesäule aufgetragen, die entsprechenden Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl dialysiert. Durch Auftragen des Dialysats auf eine Q-Sepharosesäule wurden an die CTD gebundene Nukleinsäuren entfernt (Elution mit linearem Gradient auf 1 M NaCl), Protein im Durchlauf). Nach einer abschliessenden Dialyse über Nacht gegen Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 und 500 mM NaCl wurde das Protein konzentriert und die Reinheit und Konzentration mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und UV-Absorption dokumentiert.

Alle gereinigten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beer-Gesetz:

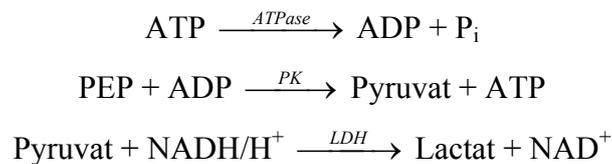
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

errechnet. Hierzu wurde die Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des Peptide Property Calculators der Northwestern University (Evanston, USA) anhand der Aminosäuresequenz bestimmt. Sie betragen  $33710 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für Hera Wildtyp und Mutanten,  $17210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für das die Helikasedomäne (*core*) und Mutanten und  $16500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für die CTD. Es wurden gleichzeitig auch die Absorptionswerte bei 260 nm und 320 nm gemessen. Das Verhältnis

$A_{260}/A_{280}$  betrug idealerweise nahezu 1:2. Ein höherer Anteil der  $A_{260}$  deutet auf das Vorhandensein einer Verunreinigung mit Nukleinsäuren hin. Eine erhöhte Absorption bei 320 nm wäre ein Indiz für aggregiertes Protein.

### 3.2.5 ATPase-Test im Fließgleichgewicht

DEAD-box Helikasen entwinden doppelsträngige RNA unter ATP-Verbrauch. Zur Messung der ATP-Hydrolyse wurde der folgende gekoppelt enzymatische Test verwendet:



Da  $\text{NADH}/\text{H}^+$  bei einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert,  $\text{NAD}^+$  jedoch nicht, kann diese Reaktion über eine Absorptionsabnahme verfolgt werden. Stöchiometrisch gesehen entspricht jeder Oxidationsschritt von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  einem ATP-Hydrolyseschritt.

Die Absorptionsabnahme über die Zeit führt rechnerisch durch Einsetzen in das Lambert-Beer-Gesetz (siehe 3.2.4, Gleichung 1) zu einer Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  in  $\text{M s}^{-1}$ :

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{340}}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d} \quad (2)$$

wobei hier der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  für  $\text{NADH}/\text{H}^+$  von  $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  verwendet wurde.

Die Reaktionsgeschwindigkeit unter sättigenden Substratbedingungen wird im Fließgleichgewicht durch die Michaelis-Menten Gleichung beschrieben:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$v_{\max}$  kann auch durch die Ratenkonstante  $k_{\text{cat}}$  beschrieben werden:

$$v_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E_{\text{total}}] \quad (4)$$

$K_m$  und  $k_{cat}$  als Konstanten der Hydrolyseaktivität können also ermittelt werden, in dem man die gemessenen Umsatzgeschwindigkeiten  $v$  gegen die Substratkonzentrationen aufträgt und mit der Michaelis-Menten Gleichung beschreibt.

Die Bedingungen für die Messungen im Fließgleichgewicht waren 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM NADH, 400 μM PEP, 23 μg/ml Lactatdehydrogenase, 36 μg/ml Pyruvatkinase, 5 mM ATP (in [RNA]-abhängigen Messungen) und 100 nM oder 1 μM Hera in An-, bzw. Abwesenheit von RNA. Die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt.

### 3.2.6 ATPase-Test als Einzelumsatz

Obwohl enzymatisch-gekoppelte Tests eine elegante Möglichkeit darstellen, die Hydrolyseaktivität einer ATPase zu untersuchen, hat diese Methode bei der Untersuchung thermophiler Proteine auch Nachteile. Die Reaktionstemperatur kann aufgrund der Hilfsenzyme nicht beliebig erhöht werden, da diese dann denaturieren würden. Zudem setzt sich die bestimmte Ratenkonstante  $k_{cat}$  aus der Geschwindigkeit von ATP-Hydrolyse und ADP-Freisetzung zusammen, da die Folgereaktionen erst einsetzen können, wenn ADP zur Verfügung steht (siehe 3.2.5).

Eine Möglichkeit, sowohl bei höheren Temperaturen ATP zu hydrolysieren und dabei die Ratenkonstante für die Spaltung selbst zu bestimmen, stellen ATPase Messungen dar, bei denen pro Helikasemolekül nur ein Einzelumsatz von ATP stattfindet. Dies bedeutet, dass bei gleichen Konzentrationen jedes Proteinmolekül theoretisch nur die Möglichkeit für einen Umsatz hat und die ATP-Abnahme im Medium direkt von der Ratenkonstante abhängt. Hierzu wurden bei Pufferbedingungen von 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> zwischen 100 und 200 μM Hera mit einer identischen Menge an ATP bei der gewünschten Temperatur versetzt. Im Falle RNA-stimulierter Ansätze lag noch 1 mM (Basen) poly U RNA vor. Zu bestimmten Zeitabständen wurde dann je 1 μl des Ansatzes abgenommen, die Reaktion mit 1 μl 1 M HClO<sub>4</sub> gestoppt, 1 min auf Eis inkubiert, mit 13.5 μl 3 M KOAc neutralisiert und 2 min bei 16060 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Anteile der Nukleotidspezies zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden durch Umkehrphasen-HPLC (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5., Prontosil 120-5-C18)

ermittelt. Die Abnahme des ATP-Anteiles kann mit einem exponentiellen Zerfall beschrieben werden:

$$[ATP] = [ATP]_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad (5)$$

Wobei  $k_1$  die Ratenkonstante in  $s^{-1}$  ist. Bei einigen Messungen wurde allerdings beobachtet, dass ADP weiter zu AMP umgesetzt wurde. Es wurde versucht, diese Reaktionen mit folgenden Modellen zu beschreiben:

$$[ADP] = \frac{[ATP]_0 \cdot k_1}{k_1 - k_2} \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (6)$$

und

$$[AMP] = [ATP]_0 \cdot \left[ 1 + \frac{1}{k_1 - k_2} \cdot (k_2 \cdot e^{-k_1 t} - k_1 \cdot e^{-k_2 t}) \right] \quad (7)$$

### 3.2.7 mant-Nukleotidtitrationen

Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Nukleotidsubstraten an Hera kann über Gleichgewichts- und Verdrängungstitrationen bestimmt werden. Hierbei macht man sich den Effekt zu Nutze, dass sich die Fluoreszenz von fluoreszierenden Nukleotidsubstraten (z.B. mantADP) unterscheidet, je nachdem, ob sie frei in Lösung vorliegen, oder an Protein gebunden sind. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_d$  ist durch das Massenwirkungsgesetz definiert als:

$$K_d = \frac{[A]_{eq} \cdot [B]_{eq}}{[AB]_{eq}} \quad (8)$$

wobei  $[A]_{eq}$  die Konzentration des freien Proteins,  $[B]_{eq}$  die Konzentration des freien Nukleotids und  $[AB]_{eq}$  die Konzentration des Protein-Nukleotidkomplexes im Gleichgewicht

darstellt.  $[A]_{eq}$  und  $[B]_{eq}$  können auch in folgender Weise abhängig von der Gesamtkonzentration von  $A$  und  $B$  ( $[A]_{tot}$  und  $[B]_{tot}$ ) definiert werden:

$$[A]_{eq} = [A]_{tot} - [AB]_{eq} \quad (9)$$

$$[B]_{eq} = [B]_{tot} - [AB]_{eq} \quad (10)$$

wodurch sich die Dissoziationskonstante auch als:

$$K_d = \frac{([A]_{tot} - [AB]_{eq}) \cdot ([B]_{tot} - [AB]_{eq})}{[AB]_{eq}} \quad (11)$$

ausdrücken lässt. Hieraus ergibt sich für die Konzentration des Komplexes  $[AB]_{eq}$ :

$$[AB]_{eq} = \frac{[A]_{tot} + [B]_{tot} + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A]_{tot} + [B]_{tot} + K_d}{2}\right)^2 - [A]_{tot} \cdot [B]_{tot}} \quad (12)$$

Für die Änderung des Fluoreszenzsignals  $F$  gilt:

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

wobei  $F_0$  den Startfluoreszenzwert und  $\Delta F_{max}$  die maximale Fluoreszenzänderung repräsentieren. Als Modell zur Bestimmung der Dissoziationskonstante erhält man durch Einsetzen:

$$F = F_0 + \Delta F_{max} \cdot \frac{\frac{[A]_{tot} + [B]_{tot} + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A]_{tot} + [B]_{tot} + K_d}{2}\right)^2 - [A]_{tot} \cdot [B]_{tot}}}{[B]_{tot}} \quad (14)$$

Die Gleichgewichtstitrationen wurden bei 25°C durchgeführt, bei Pufferbedingungen von 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub>. In der Startlösung wurden 5 µM mantADP vorgelegt, welches bei 360 nm angeregt wurde und die Emission bei 440 nm detektiert wurde. Die Bandbreite für Anregung und Emission betrug jeweils 2 nm. Nach jeder

Proteinzugabe wurde die Lösung 2 min inkubiert, um eine gleichbleibende Temperatur zu gewährleisten und eine Minute mit einer Zeitkonstante von 0.1 s lang gemessen.

Das Bindungsverhalten nicht-fluoreszenzmarkierter Nukleotide unterscheidet sich oft deutlich von dem fluoreszenzmarkierter. Um die Bindungskonstanten für diese Substrate zu bestimmen, bedient man sich der Rücktitration. Hierzu wird das mant-Nukleotid an das Protein gebunden und dann mit einem anderen, nichtfluoreszierendem verdrängt. Mit Hilfe der in der Hintitration bestimmten Dissoziationskonstante  $K_{d1}$  und den Gesamtkonzentrationen für Protein  $[A]_{tot}$ , mant-Nukleotid  $[B]_{tot}$  und unmodifizierten Nukleotid  $[C]_{tot}$  kann mit Hilfe einer kubischen Gleichung die Dissoziationskonstante  $K_{d2}$  für das unmodifizierte Nukleotid ermittelt werden (Thrall et al., 1996).

### 3.2.8 Anisotropietitrationen

Die Bindung zweier Moleküle kann über die Anisotropieänderung erfasst werden. Ein linear polarisierter Lichtstrahl regt das betreffende Molekül zur Fluoreszenz an. Das Emissionslicht ist gleichermassen polarisiert und wird über einen zweiten Polarisator zum Photodetektor geleitet. Die Polarisationsachse des zweiten Polarisators wird hierbei parallel und im 90°-Winkel zur der des ersten Polarisators ausgerichtet. Man erhält so zwei verschiedene detektierte Intensitäten,  $I_p$  (parallel) und  $I_s$  (90°, senkrecht). Die Anisotropie  $r$  ist definiert als:

$$r = \frac{I_p - I_s}{I_p + 2I_s} \quad (15)$$

Ist das fluoreszierende Molekül unbeweglich, wird ausschliesslich Licht der einen oder anderen Polarisationsebene detektiert, die Anisotropie ist hoch. Kleine, frei bewegliche Moleküle hingegen verändern ihre Orientierung während der Messung schneller, es werden beide Intensitäten detektiert und  $r$  ist kleiner. In der Messlösung lag eine kleine, fluoreszenzmarkierte RNA vor, die einen niedrigen Anisotropiewert aufwies. Durch schrittweise Zugabe von Protein und Bindung an die RNA erhöhte sich die Anisotropie bis sich eine Sättigung eingestellt hatte. Aus dem Kurvenverlauf lässt sich anhand folgender Gleichung die Dissoziationskonstante  $K_d$  ableiten:

$$r = r_0 + \left( \frac{\Delta r}{[ds]} \cdot \frac{[Hera] + [ds] + K_d}{2} - \sqrt{\left( \frac{[Hera] + [ds] + K_d}{2} \right)^2 - [Hera] \cdot [ds]} \right) \quad (16)$$

wobei  $r_0$  der Anfangswert der Anisotropie,  $\Delta r$  deren Änderung,  $[ds]$  die Konzentration der doppelsträngigen RNA und  $[Hera]$  die eingesetzte Proteinmenge darstellt.

Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt (Anregung bei 495 nm, Detektion der Emission bei 530 nm, Bandbreiten 5 nm bzw. 10 nm). Die Dauer einer Messung betrug 2 min, zuvor wurde der Ansatz 2 min bei Messtemperatur inkubiert. Die Integrationszeit betrug 18 s. Die Konzentration der fluoreszenzmarkierten RNA betrug 5 nM, Pufferbedingungen waren 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EDTA.

### 3.2.9 Analytische Grössenausschlusschromatographie

Um das Molekulargewicht von Hera und Konstrukten, sowie deren Vorliegen als Monomer oder Dimer zu bestimmen wurde unter anderem analytische Grössenausschlusschromatographie genutzt. Hierzu wurden zwischen 500 pmol und 10 nmol Protein auf analytische Chromatographiesäulen (S200 und S75 10/300, GE Healthcare) aufgetragen und bei einer Flussrate von 0.75 ml/min (S200) oder 1 ml/min (S75) ihrer Grösse entsprechend getrennt. Als Laufpuffer wurden hier Lagerpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl) und Aktivitätspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) verwendet.

### 3.2.10 RNA-Entwindungstest

Die Eigenschaften einer Helikase umfassen ATP-Hydrolyse, RNA-Bindung und RNA Entwindung. Das Zusammenspiel all dieser Reaktionen lässt sich in einem RNA-Entwindungstest dokumentieren. Das zu entwindende Substrat setzt sich zusammen aus einem 32mer Strang, welcher *hairpin 92* der 23S rRNA aus *B. subtilis* beinhaltet und einem Fluoreszein-markiertem 9mer Einzelstrang, welcher mit dem 32mer einen doppelsträngigen Bereich ausbildet. Hierzu wurden je 25 µM der beiden RNAs 30 min bei 25°C inkubiert. Der Puffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM Hera oder Konstrukt, 5 mM ATP, 5 µM doppelsträngige RNA, sowie 50 µM eines unmodifizierten 9mer-Stranges, um eine Rehybridisierung des getrennten 32mers mit dem fluoreszierenden Strang zu minimieren. Die Entwindung fand bei 25°C statt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Protein und ohne ATP. Gestoppt wurden die Reaktionen mit einem Volumen 2 x Probenpuffer (2 % SDS, 100 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.1 % Bromphenolblau, 50 mM Tris/HCl, pH 6.8) und auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel setzte sich aus

14 % Acrylamid, 0.7 % Bisacrylamid, 1 x TBE-Puffer (100 mM Tris, 100 mM Borat, 1 mM EDTA), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % APS und 0.06 % TEMED zusammen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wurde 2.5 h bei 10 V/cm und 4°C durchgeführt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert und die Intensität der einzelnen Banden mit der Geldokumentationssoftware ausgewertet.

### 3.2.11 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Für die Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden Hera und dessen Varianten an spezifisch eingeführten Cysteinresten mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die hierfür verwendeten Farbstoffe (Alexa Fluor A488 und 546) stammten von der Firma Invitrogen und trugen eine Maleimid-Gruppe, welche über einen Michael-Addition ähnlichen Mechanismus in weniger als einer Minute an die reduzierten Cysteine gebunden wurden. Hierfür musste zuerst ein Pufferaustausch stattfinden, da der Lagerpuffer für Cysteinmutanten (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl) auch 2 mM β-Mercaptoethanol enthielt, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Proteinmolekülen zu verhindern. β-Mercaptoethanol reagiert allerdings auch mit den Maleimidgruppen der Farbstoffe und stört somit die Markierungsreaktion. Mittels Grössenaustauschchromatographie mit Zentrifugensäulchen der Firma BIORAD wurde der Lagerpuffer gegen einen vergleichbaren Puffer mit 1 mM TCEP statt β-Mercaptoethanol ausgetauscht, welcher die Cysteine ebenfalls in einem reduzierten Zustand hält.

Das umgepufferte Protein, meist zwischen 10 und 30 μM wurde dann mit einem 8x molaren Überschuss Donor (Alexa 488) und einem 10x Überschuss Akzeptor (Alexa 546) versehen und 1 h bei 25°C im Dunklen inkubiert. Freier Farbstoff wurde in zwei aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten ebenfalls mit den Chromatographiesäulen von BIORAD entfernt. Die Effizienz der Markierung wurde über ein UV/Vis-Absorptionsspektrum von 200 bis 800 nm bestimmt. Es war hierbei nötig die Absorptionswerte für das Protein um die Absorptionsanteile der Farbstoffe bei 280 nm zu korrigieren:

$$[\text{Protein}] = \frac{A_{280} - \frac{A_{493}}{8.89} - \frac{A_{554}}{8.17}}{\varepsilon_{\text{Protein}} \cdot 1 \text{ cm}} \quad (17)$$

(als Extinktionskoeffizient wurde 33710 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> für Hera verwendet, 17210 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> für Hera *core*). Auch die Absorption des Donors musste korrigiert werden:

$$[\text{Alexa 488}] = \frac{A_{493} - \frac{A_{554}}{9.94}}{72000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \quad (18)$$

$$[\text{Alexa 546}] = \frac{A_{554}}{93000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \quad (19)$$

Aus den molaren Konzentrationen konnte dann die Markierungseffizienz in % (bezogen auf die Proteinkonzentration) errechnet werden.

### 3.2.12 Einzelmolekülexperimente

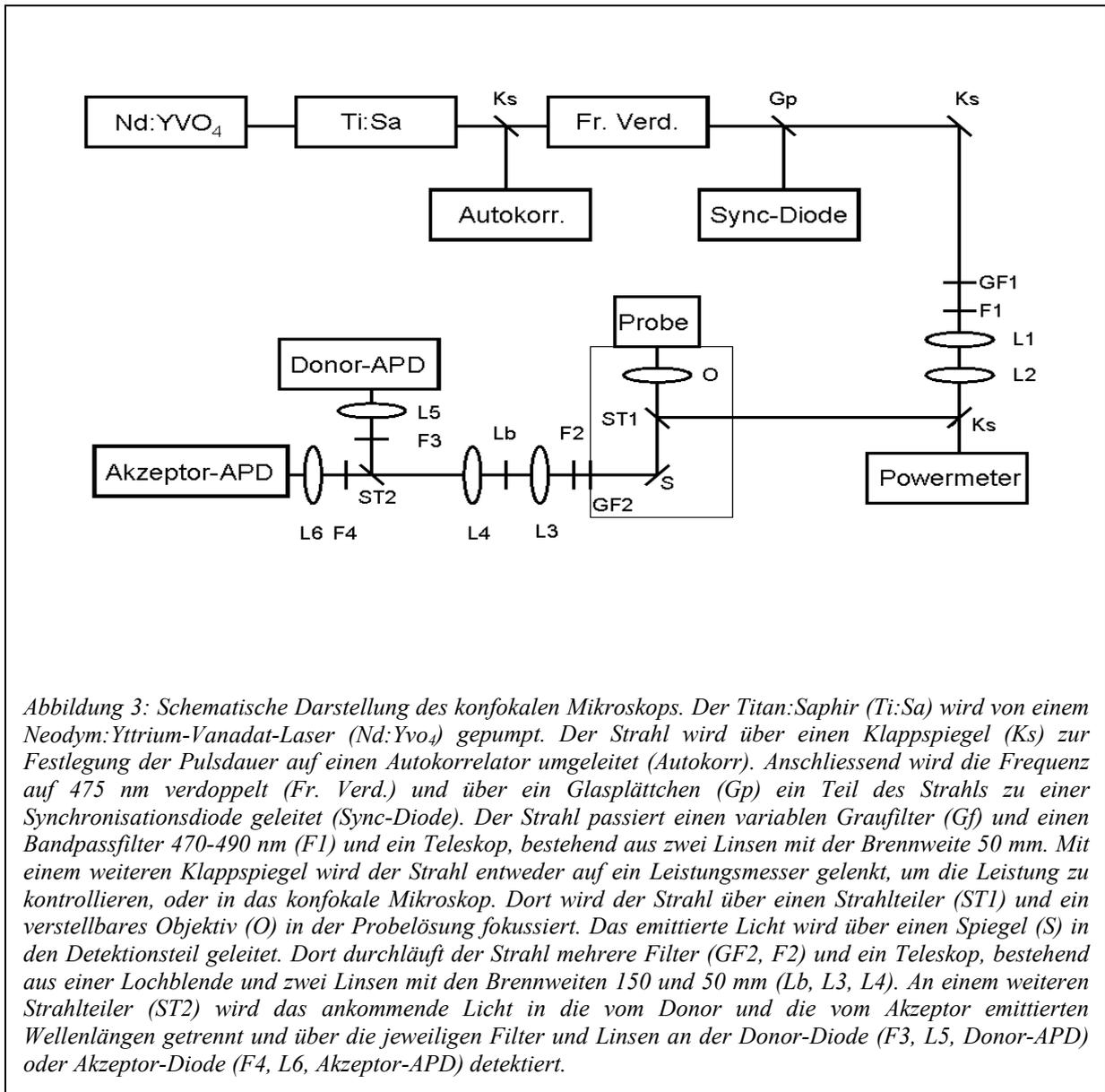
#### Experimenteller Aufbau

Alle Einzelmolekülmessungen wurden mit einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 3.

Der modengekoppelte Titan:Saphir-Festkörperlaser (Tsunami, Spectra Physics, USA) wird durch einen Neodym:Yttrium-Vanadat-Laser (Millenia Pro, Spectra Physics, USA) mit einer Leistung von 9.03 W gepumpt. Der Laser wird dauerhaft mit einer Stickstoffatmosphäre gespült und auf 18°C temperiert. Die variable Wellenlänge wurde für diese Arbeit durchwegs auf 950 nm eingestellt, bei einer Ausgangsleistung von 1 W. Zur Einstellung einer Pulsdauer von 2.5 ps wurde der Strahl über einen Klappspiegel auf einen Autokorrelator gelenkt (Pulsecout, Spectra Physics, USA).

Anschliessend wurde der Laserstrahl auf eine Wellenlänge von 475 nm frequenzverdoppelt, die Ausgangsleistung betrug hierbei ca. 80 mW. Über ein Glasplättchen wurde ein Bruchteil des Strahles auf eine Synchronisationsdiode (PHD-400-N, Beckler+Hickl GmbH, D) gelenkt, welche die ankommenden Pulse detektierte und somit als zeitliche Referenz setzt. Der Laserstrahl wurde durch einen Filter mit der OD 1.0 auf ca. 1/10 seiner Leistung geschwächt und passierte einen variablen Graufilter, mit dem die exakte Intensität im  $\mu\text{W}$ -Bereich zur Anregung der Probe eingestellt wurde. Ein Bandpassfilter stellte sicher, dass nur Licht im Bereich von 470–490 nm durchgelassen wurde. Um eine mögliche Divergenz des Strahles nach der Frequenzverdoppelung auszugleichen, wurde der Strahl durch ein Teleskop aus zwei Sammellinsen mit einer Brennweite von 50 mm geleitet und konnte danach mit einem weiteren Klappspiegel entweder auf einen Leistungsmesser zur Überprüfung der

Strahlleistung gelenkt werden oder durch eine Apertur in das konfokale Mikroskop (IX71, Olympus, D).



Hierbei handelte es sich um ein invertiertes Mikroskop, in welchem der Strahl von einem dichroistischen Strahlteiler M (DM505, Olympus, D) reflektiert und durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert wurde (UPlanApo Wasserimmersions-Objektiv, Olympus, D). Im Strahlengang war ausserdem eine CCD-Kamera (Santec by Baxall, UK) angebracht, mit deren Hilfe sichergestellt wurde, dass der Strahl im konfokalen Volumen ( $2-4 \cdot 10^{-15}$  l) fokussiert war.

Die Probe befand sich apikal in einer Probenkammer einer Lab-Tek Küvette (Nalge Nunc International, USA). Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde vom gleichen Objektiv gesammelt und vom Strahlteiler in den Detektionsteil geleitet. Elastisch gestreutes Anregungslicht wurde

durch einen weiteren Filter abgetrennt. Das Licht wurde durch eine Linse mit einer Brennweite von 150 nm auf eine Lochblende (Durchmesser 100  $\mu\text{M}$ ) fokussiert und durch eine weitere Linse mit einer Brennweite von 50  $\mu\text{m}$  parallelisiert. Ein weiterer Strahlteiler reflektierte das Fluoreszenzlicht des Donors, die Fluoreszenz des Akzeptors wurde transmittiert. Die getrennten Strahlen wurden gefiltert und von Avalanche Photodioden (APDs, Perkin Elmer Optoelectronics, D) detektiert. Über einen Router (HRT-82, Becker+Hickl GmbH, D) wurden die Signale der APDs schliesslich an eine Einzelphotonenzählkarte gesendet (SPC-630, Becker+Hickl GmbH, D), welche auch die Signale der Referenzelektrode empfing. Die Auswertung der Messungen und Darstellung in FRET Histogrammen erfolgte mit einem auf LabView (National Instruments, USA) basierendem Programm (Theissen et al., 2008).

## Bestimmung der Försterabstände und Korrekturparameter

### Försterabstände

Die Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Farbstoffe können sich je nach Art des Farbstoffes, der Orientierung und Lokalisation im Protein unterscheiden. Um eine möglichst genaue Interpretation der Einzelmolekülmessungen zu erlauben, müssen verschiedene Parameter im Vorfeld experimentell bestimmt werden. Da im vorliegenden Fall Hera nur statistisch markiert wurde und die Cysteine in den Doppelmutanten entweder mit Donor- oder Akzeptorfarbstoff besetzt waren, mussten für eine Doppelmutante (siehe 3.2.11) beide Fälle berücksichtigt werden.

Eine wichtige Eigenschaft des markierten Proteins ist der sogenannte Försterabstand der gebundenen Farbstoffe zu einander. Der Försterabstand  $R_0$  ist definiert als der Abstand  $R$ , bei dem der Energietransfer halbmaximal abläuft:

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}, \text{ und } E_{FRET} = 0.5 \text{ für } R_0 = R \quad (20)$$

Der Försterabstand ist abhängig von dem Überlappungsintegral  $J(\lambda)$  und der Quantenausbeute  $\Phi_D$  des Donors:

$$R_0^6 = 8.785 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{\Phi_D \cdot \kappa^2 \cdot J(\lambda)}{n^4} \quad (21)$$

wobei  $\kappa$  den sogenannten Orientierungsfaktor der Farbstoffe zueinander darstellt. Dieser ist schwer zu fassen, deswegen wurde hier der Wert für freien Farbstoff verwendet ( $\kappa = 2/3$ ).  $n$  ist der Brechungsindex, hier 1.33 für Wasser.

Das Überlappungsintegral  $J(\lambda)$  gibt an, inwiefern sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt. Je höher die Überlappung, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit von Transferereignissen. Das Überlappungsintegral in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$  ist wie folgt definiert:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda \quad (22)$$

$F_D(\lambda)$  beschreibt die auf 1 normalisierte Fläche aus einem Emissionsspektrum der zu untersuchenden Cysteinposition, markiert mit Donorfarbstoff,  $\varepsilon_A(\lambda)$  die molaren Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge für die gleiche Position, markiert mit Akzeptorfarbstoff. Diese erhält man durch Messung eines Absorptionsspektrums im entsprechenden Bereich und Umformung der Absorptionen nach Lambert-Beer (siehe 3.2.4).

Die Quantenausbeute  $\Phi_D$  des Donors gibt an, welcher Anteil des Anregungslichts wieder als Fluoreszenz emittiert wird. Sie kann beschrieben werden als:

$$\Phi_D = \frac{F_D \cdot E_R \cdot \Phi_R}{F_R \cdot E_D} \quad (23)$$

wobei  $F_D$  die Fläche des donormarkierten Proteins aus dem Emissionsspektrum darstellt,  $E_D$  die Absorption des donormarkierten Proteins bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und einer Wellenlänge von 460 nm. Analog hierzu wurden auch Messungen mit einer Referenzsubstanz (Uranin) in 0.1 M NaOH durchgeführt, welche Werte für  $F_R$  und  $E_R$  lieferten. Die Quantenausbeute für Uranin (bei pH 14) betrug  $\Phi_R = 0.93$  (Madge et al., 2002). Mit den experimentell bestimmten Werten für  $J(\lambda)$  und  $\Phi_D$  konnten so die die jeweiligen Försterabstände berechnet werden.

### Korrekturparameter

Die Detektion von Photonen im Donor und Akzeptorkanal wird von einer Reihe von Phänomenen beeinflusst, welche die Korrektur der Messungen nötig machen. So werden zu einem Teil vom Donor emittierte Photonen im Akzeptorkanal detektiert (Korrekturparameter  $\alpha$ ) und umgekehrt (Korrekturparameter  $\beta$ ). Die Parameter spiegeln also das Verhältnis von:

$$\alpha = \frac{I_{DA}}{I_{DD}} \text{ und } \beta = \frac{I_{AD}}{I_{AA}} \text{ wieder,} \quad (24)$$

wobei  $I_{DD}$  und  $I_{AA}$  die korrekt detektierten Photonen in Donor- oder Akzeptorkanal angeben, und  $I_{DA}$  und  $I_{AD}$  die im falschen Kanal detektierten.

Die Parameter werden im Einzelmolekülaufbau bestimmt, in dem man die jeweiligen Cysteine in Einzelmutanten entweder mit Donor oder Akzeptor markiert, etwa 1–5 min die detektierten Ereignisse misst und nach Subtraktion des Pufferhintergrundes und Division durch die Messzeit  $\alpha$  und  $\beta$  aus dem Verhältnis der Photonen in Donor und Akzeptorkanal berechnet.

Desweiteren wird der gebundene Akzeptor direkt durch den Laser angeregt. Diese Direktanregung  $\delta$  kann durch zwei unabhängige Absorptionmessungen der donor-, bzw akzeptormarkierten Einzelmutanten bei 475 nm und bekannter Farbstoffkonzentration gemessen werden:

$$\delta = \frac{\frac{A_{\text{Akzeptor}}}{c_{\text{Akzeptor}}}}{\frac{A_{\text{Donor}}}{c_{\text{Donor}}}} \quad (25)$$

Der letzte zu bestimmende Korrekturparameter  $\gamma$  ist bedingt durch die unterschiedliche Quantenausbeute und Detektionseffizienz für beide Farbstoffe in der Einzelmolekülmessung. Bei bekannten  $\delta$  ist  $\gamma$  definiert als:

$$\gamma = \frac{I_{AA}}{I_{DD} \cdot \delta} \quad (26)$$

und kann somit mit den für die Bestimmung von  $\alpha$  und  $\beta$  gemessenen Ereignissen in Donor- und Akzeptorkanal und Division durch  $\delta$  errechnet werden.

Die direkte Anregung des Akzeptors  $\delta$  beeinflusst die Korrekturparameter  $\alpha$  und  $\gamma$ , weswegen diese noch folgendermassen korrigiert werden müssen:

$$\alpha' = \frac{\alpha + \gamma \cdot \delta}{1 + \beta \cdot \gamma \cdot \delta} \quad \text{und} \quad \gamma' = \frac{\gamma + \gamma \cdot \delta}{1 + \beta \cdot \gamma \cdot \delta} \quad (27)$$

$\beta$  ist nicht von  $\delta$  beeinflusst, wodurch  $\beta' = \beta$  gilt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Die ATPase - Eigenschaften von Hera**

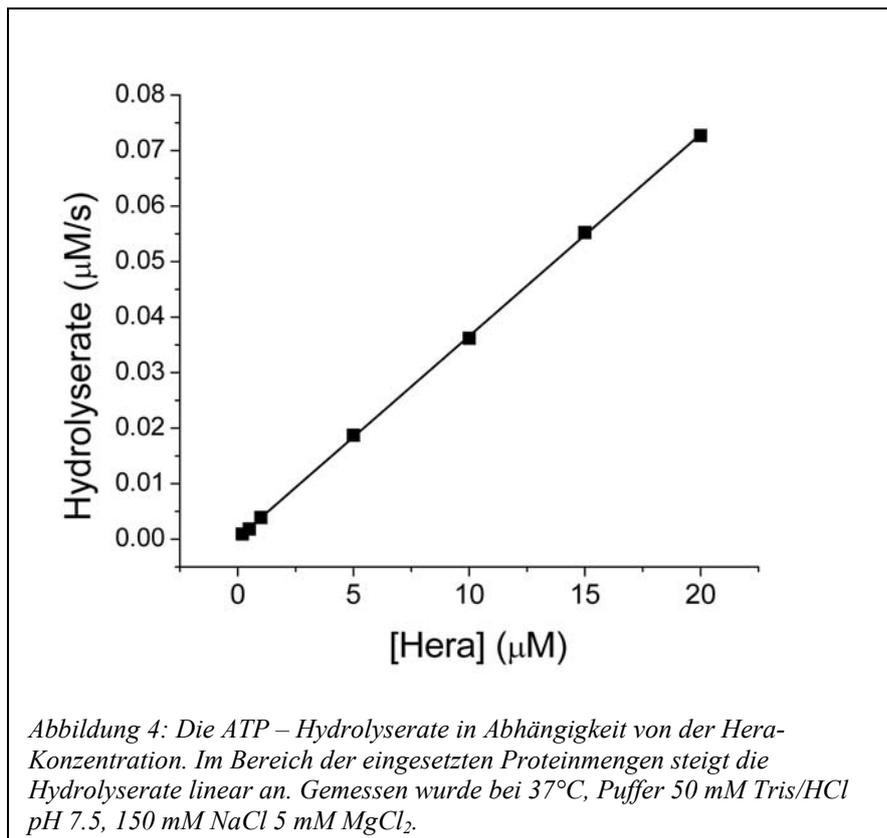
DEAD-box Helikasen verfügen über eine ATPase-Aktivität. Die Umsatzraten für ATP werden durch die Bindung geeigneter RNA-Substrate stimuliert (Rocak & Linder, 2004). Ging man früher noch davon aus, dass die aus der ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie für die Entwindungsaktivität der Proteine benötigt wurde, so sprechen neuere Erkenntnisse dafür, dass die Entwindung auch ohne ATP-Spaltung stattfinden kann (Liu et al., 2008). Unter Umständen wird die gewonnene Energie stattdessen dafür verwendet, den Ausgangszustand der Helikase wiederherzustellen und somit für eine weitere Reaktion zur Verfügung zu stellen. Die Steigerung der Hydrolyseraten in Gegenwart von RNA würde hierbei einen schnelleren Umsatz durch die Helikase ermöglichen.

#### **4.1.1. Die Untersuchung der ATP-Hydrolyse durch gekoppelt-enzymatische Tests**

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um den durch Helikasen vermittelte ATP-Umsatz experimentell zu messen. Eine Methode ist ein enzymatischer Test, bei dem die Hydrolysereaktion an Folgereaktionen gekoppelt ist, von denen eine mit einer Oxidation von NADH/H<sup>+</sup> einhergeht (siehe 3.2.5). Dieser Oxidationsschritt kann über die Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden und korreliert somit direkt mit dem ATP-Umsatz im Fließgleichgewicht.

##### **4.1.1.1 Die Abhängigkeit der ATP – Hydrolyse von der Hera-Konzentration**

Hera eluiert in der präparativen Grössenaustauschchromatographie als Dimer mit einem apparentem Molekulargewicht von 104 kDa. Um zu zeigen, ob das Monomer oder das Dimer die aktive Spezies ist, wurde die Hydrolyserate in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration gemessen (Abbildung 4).

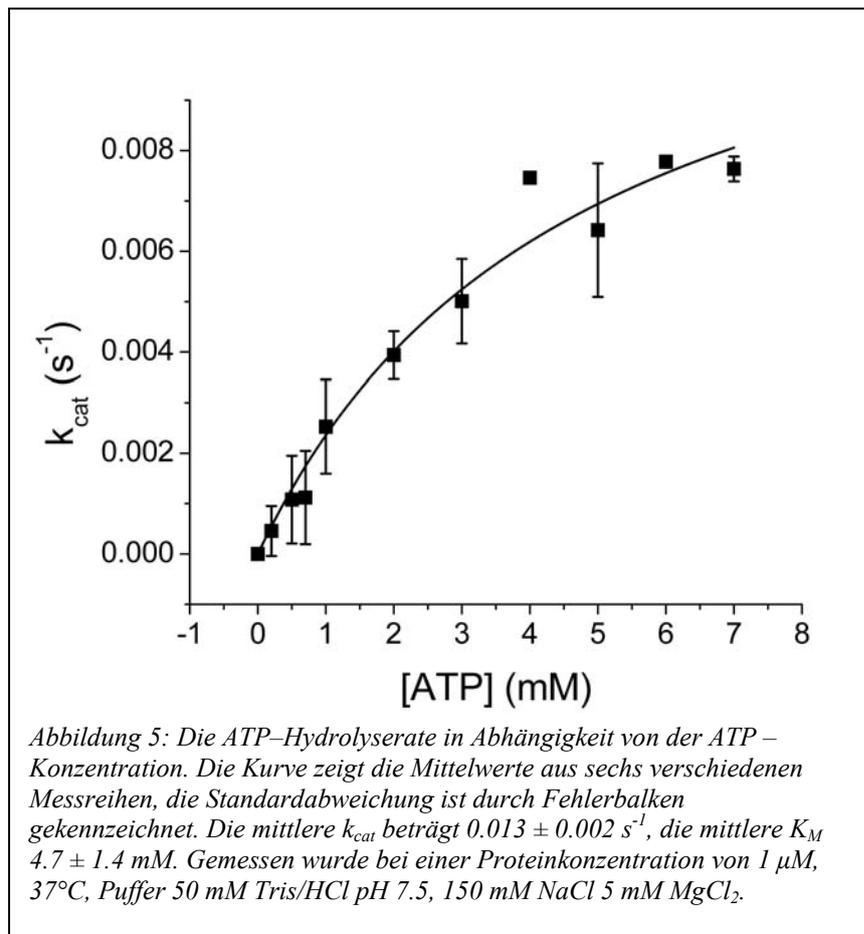


Bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen verliefen die Hydrolyseraten linear. Eine Sättigung wurde nicht erreicht. Die aktive Untereinheit ist das Monomer von Hera, eine Kooperativität des Dimers konnte nicht festgestellt werden.

#### 4.1.1.2 Die Abhängigkeit der Hydrolyserate von der ATP-Konzentration

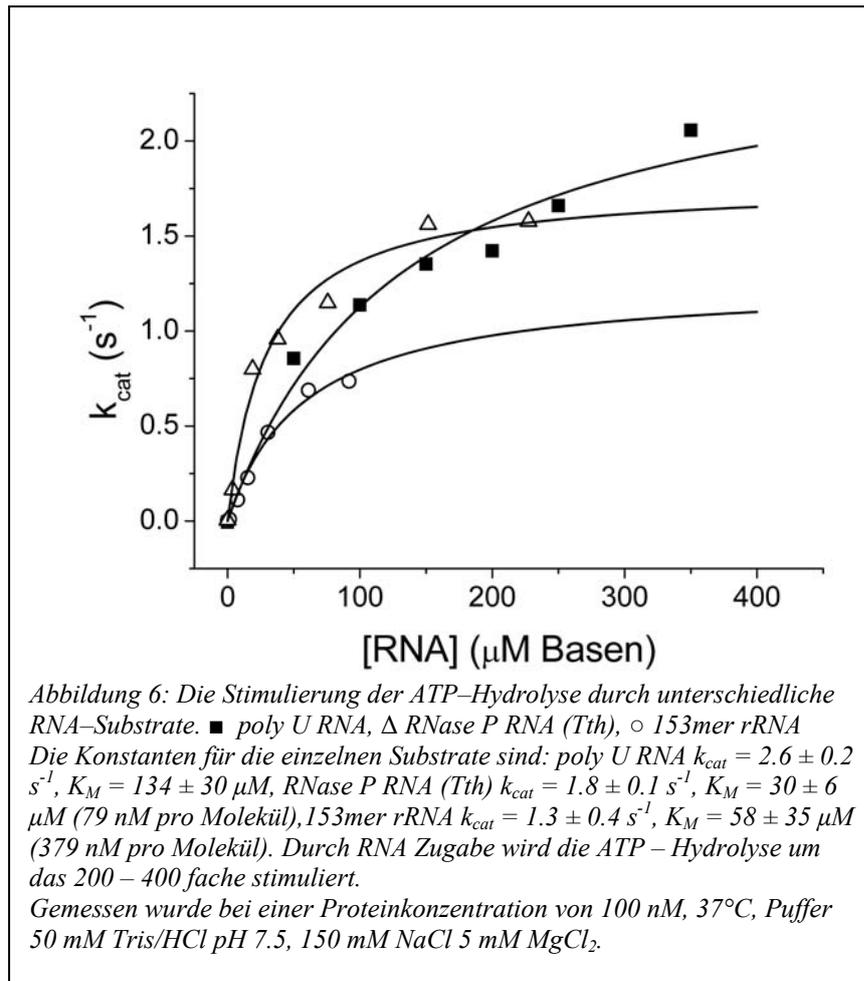
Für einen grossen Teil der Messungen dieser Arbeit musste eine ausreichende Menge an ATP (oder ATP-Analoga) zur Verfügung stehen, um zu gewährleisten, dass der ATP-Verbrauch nicht zum limitierenden Faktor der Messung wird. Aus diesem Grund wurde der gekoppelt enzymatische Test in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration durchgeführt, um Aussagen über die nicht stimulierte Umsatzrate  $k_{\text{cat}}$  und die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  treffen zu können (Abbildung 5).

Durch die niedrige Versuchstemperatur von 37°C und den langsamen ATP-Umsatz zeigten die ermittelten Raten eine hohe Streuung. Es wurden daher insgesamt sechs unabhängige Messreihen mit einer Proteinkonzentration von 1 µM durchgeführt und die Mittelwerte mit der Standardabweichung als Fehler aufgetragen. Die mittlere Umsatzrate wurde mit  $0.013 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M$  mit  $4.7 \pm 1.4 \text{ mM}$  bestimmt.



#### 4.1.1.3 Die Stimulation der ATP-Hydrolyse von Hera Wildtyp durch RNA-Substrate

Der ATP-Umsatz läuft bei DEAD-box Helikasen schneller ab, wenn zusätzlich das zu entwindende RNA-Substrat vorliegt (Cordin et al., 2006). Dabei ist die Spezifität der Helikasen für ein bestimmtes Substrat sehr unterschiedlich. Es ist bisher nicht bekannt, welche RNAs, bzw. welche RNA-Strukturen von Hera *in vivo* erkannt und entwunden werden. Morlang et al. postulierten 1999 eine mögliche Beteiligung von Hera an der ribosomalen Biogenese. Eines der verwendeten Substrate ist daher ein 153 Basen langes Fragment der 23S rRNA von *B. subtilis*, welches *hairpin 92* beinhaltet. Dieses Substrat stimuliert auch die Helikasen YxiN aus *B. subtilis* (Kossen & Uhlenbeck, 1999) und DbpA aus *E. coli* (Pugh et al., 1999). Desweiteren wurde in der Arbeit von Morlang et al. im C-terminus von Hera im Bereich der  $\alpha$ -Helix 13 eine Sequenz beschrieben, welche eine schwache Homologie mit dem RNase P RNA-Bindemotiv der RnpAs unterschiedlicher Organismen aufweist. RNase P RNA (hier aus *T. thermophilus*, Tth) war daher ein weiteres Substrat, welches auf eine Stimulierung der ATP-Hydrolyse hin überprüft wurde. Eine unspezifische Stimulation wurde mit poly U RNA getestet. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 6:



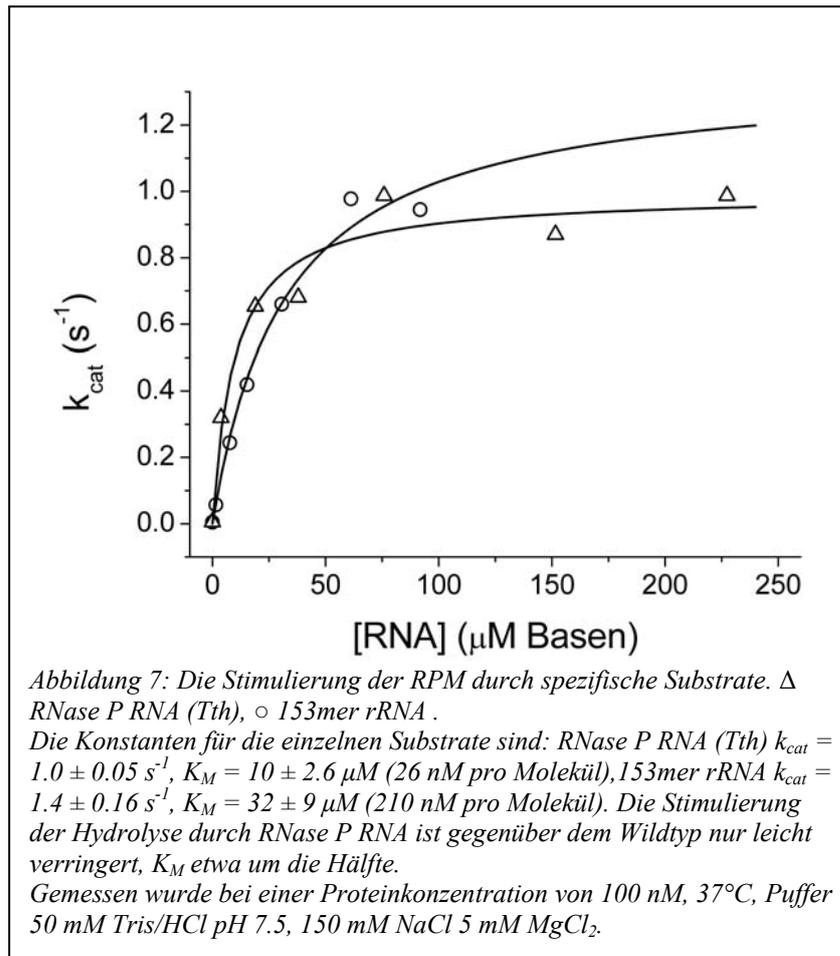
Poly U RNA hatte keine einheitliche Länge, weswegen die Konzentration in  $\mu\text{M}$  Basen angegeben wurde. In obiger Abbildung wurden die Konzentrationen für die RNase P RNA und das 153mer ebenfalls in Basenkonzentrationen umgerechnet.  $k_{cat}$  und  $K_M$  hatten für die einzelnen Substrate folgende Werte: poly U RNA  $k_{cat} = 2.6 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M = 134 \text{ μM}$ , RNase P RNA (Tth)  $k_{cat} = 1.8 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M = 30 \text{ μM}$  und 153mer rRNA  $k_{cat} = 1.3 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M = 58 \text{ μM}$ . Verglichen mit der intrinsischen Umsatzrate von  $6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bei 5 mM ATP ist die Hydrolyse somit um das 200–400fache durch die Zugabe von RNA erhöht.

#### 4.1.1.4 Die ATP-Hydrolyse durch die Helikasedomäne (core) von Hera und der RNase P-Motivmutante (RPM)

Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, welche Bereiche und Motive in Hera für die Erkennung und Bindung von RNA Substraten verantwortlich sind, wurden die Hydrolyse-Messungen mit zwei weiteren Varianten von Hera durchgeführt. Da vermutet wurde (Morlang et al., 1999), dass die Bindungsspezifität vor allem über die verlängerte C-terminale

Domäne vermittelt wird, wurde das Protein mittels Mutagenese (siehe 3.2.3) auf den *core* verkürzt, welcher die Aminosäuren 1–365 umfasst.

Gekoppelt enzymatische Tests mit dem *core* zeigten, dass dessen Hydrolyseaktivität weder durch RNase P RNA, noch durch das 153mer Fragment der 23S rRNA stimuliert wurde. Lediglich mit poly U RNA konnte eine Steigerung der Umsatzrate beobachtet werden, die aber mit  $\sim 0.17 \text{ s}^{-1}$  bei 1 mM RNA (Basen) ungefähr 10–20fach niedriger war als beim Protein voller Länge.



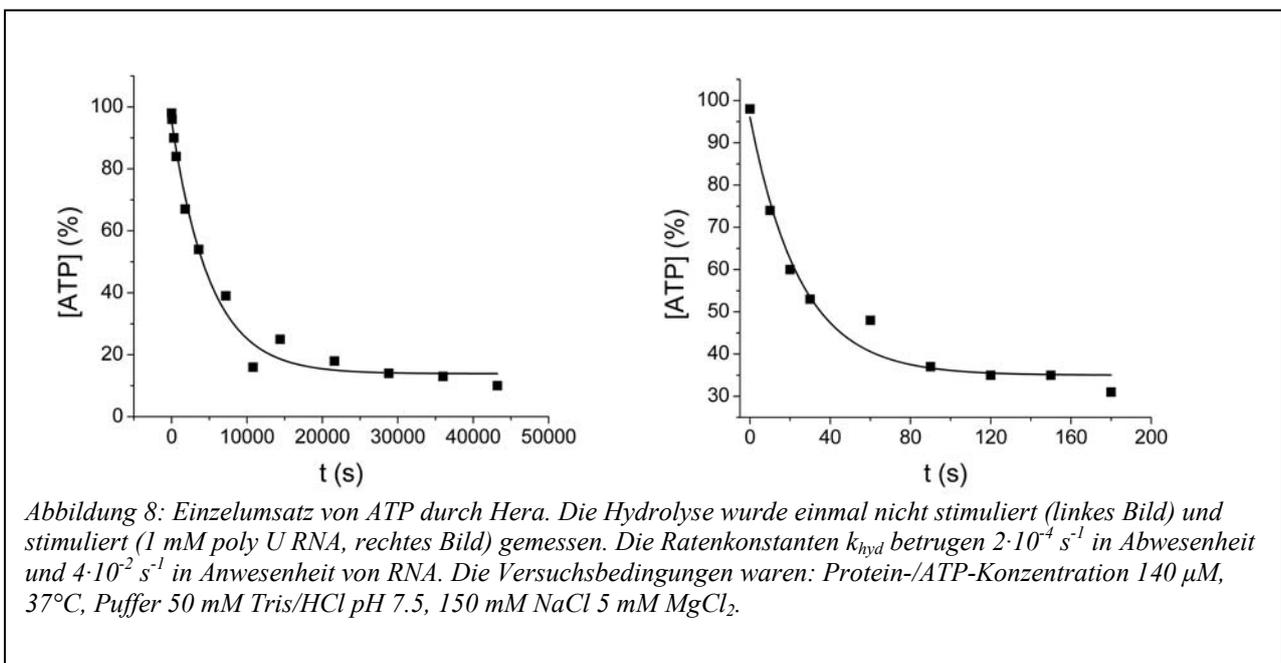
In der C-terminalen Domäne von Hera wird ein Motiv vermutet (Morlang et al., 1999), welches eine schwache Homologie mit RNase P RNA Bindemotiven aufweist. Dies stützt sich vor allem auf drei in den Bindungsmotiven strikt konservierte Argininreste, welche in Hera an den Positionen 378, 383 und 386 zu finden sind. Diese Arginine wurden gegen Alanine ausgetauscht und die RPM auf eine Stimulierung mit RNase P RNA untersucht, wie in Abbildung 7. gezeigt. Zum Vergleich wurde auch die 153mer rRNA eingesetzt, um zu überprüfen, ob es sich bei einer eventuellen Änderung der Umsatzrate um einen RNA-spezifischen Effekt des Bindemotivs handelt, oder einen generellen. Es stellte sich heraus, dass die Konstanten für das 153mer ( $k_{cat}=1.4 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M=32 \mu\text{M}$  Basen) eine gute

Übereinstimmung mit den Werten der Wildtypmessung zeigten. Für die RNase P RNA lagen die Umsatzrate mit  $k_{\text{cat}} = 1.0 \text{ s}^{-1}$  und  $K_M = 10 \text{ }\mu\text{M}$  Basen um den Faktor 0.55 bzw. 3 niedriger als beim Wildtyp. Die Stimulation der ATPase durch rRNA und RNase P RNA ist durch die Mutation nicht beeinträchtigt.

#### 4.1.2 Die ATP-Hydrolyse in Einzelumsatzexperimenten

##### 4.1.2.1 Die ATP-Hydrolyse von Hera Wildtyp in Einzelumsatzexperimenten

Eine Untersuchung der Hydrolyseeigenschaften mittels eines gekoppelt enzymatischen Test im Fließgleichgewicht bringt Nachteile mit sich. Der Temperaturbereich ist aufgrund der Hilfsenzyme begrenzt, da sie bei Temperaturen über  $37^\circ\text{C}$  präzipitieren. Die gemessene Umsatzrate spiegelt nicht die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung *per se* wider, sondern setzt sich aus den Konstanten für Hydrolyse und ADP-Freisetzung. Eine alternative Methode bietet die Bestimmung eines einzelnen Umsatzes von ATP durch Hera. Hierbei werden isomolare Konzentrationen von Hera und ATP gemischt und bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Zu bestimmten Zeitabpunkten wird ein Teil des Reaktionsansatzes entnommen, durch vollständige Hydrolyse des Proteins abgestoppt und die im Ansatz enthaltenen Nukleotide mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt (siehe 3.2.6). Über die Abnahme des ATP-Anteils kann dann die Ratenkonstante der Hydrolyse  $k_{\text{hyd}}$  in  $\text{s}^{-1}$  berechnet werden (Abbildung 8).

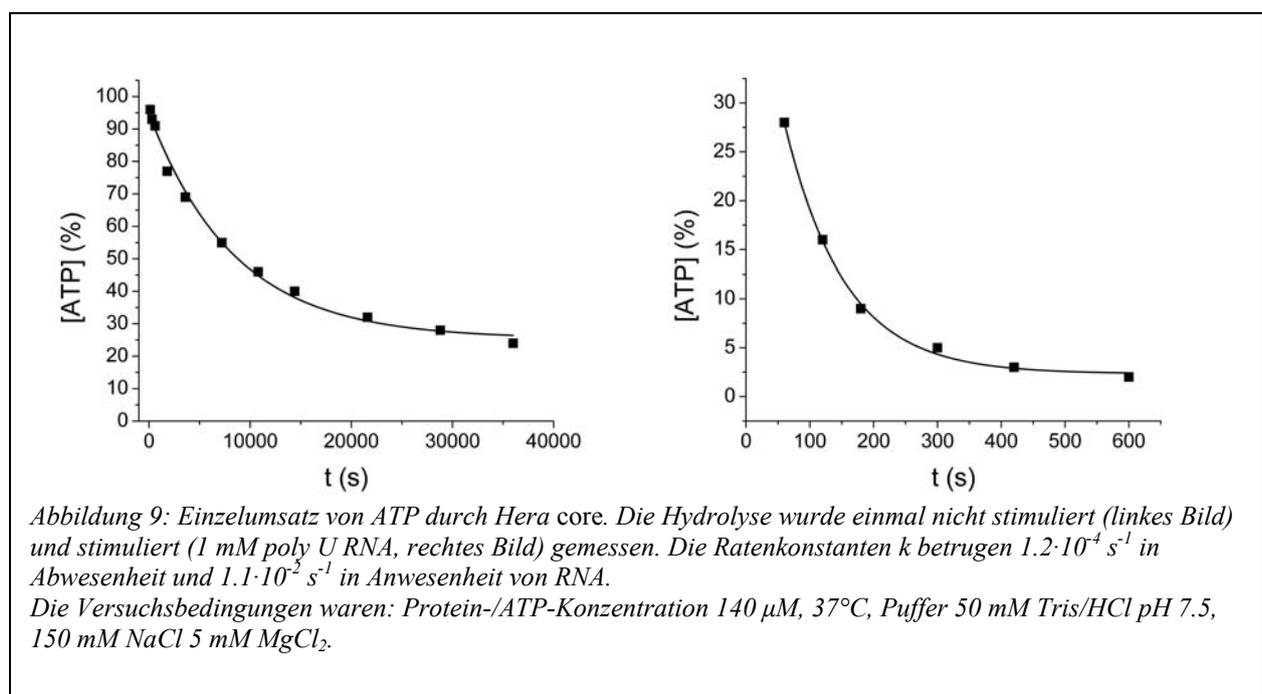


Bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  wurde die Ratenkonstante  $k_{\text{hyd}}$  mit  $2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bestimmt, in Anwesenheit von  $1 \text{ mM poly U RNA}$  mit  $4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Im Vergleich zu den Ratenkonstanten des

ATP-Umsatzes im Fließgleichgewicht liegen die Konstanten um den Faktor 30 im nichtstimulierten und sogar um den Faktor 65 im RNA stimulierten Fall niedriger. Bei vergleichbaren Einzelumsatzmessungen bei 65°C präzipitierte das im Ansatz vorhandene Protein. Dadurch konnten in dieser Arbeit keine Aussagen über den ATP-Umsatz im Temperaturoptimum von Hera getroffen werden.

#### 4.1.2.2 Die ATP – Hydrolyse von Hera core in Einzelumsatzexperimenten

Analog zu den in 3.1.2 beschriebenen Messungen an Hera Wildtyp wurden die Experimente mit dem core bei 37°C wiederholt, wie in Abbildung 9 gezeigt:



Die Ratenkonstanten liegen mit  $1.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (nicht stimuliert) und  $1.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (stimuliert, 1 mM poly U RNA) in der gleichen Grössenordnung wie die des Wildtyp.

#### 4.1.2.3 Die Bedeutung des Walker A Motivs für die ATP-Hydrolyse

In DEAD-box Helikasen ist das Walker A Motiv, auch Motiv I genannt, essentiell für die Bindung und Hydrolyse von ATP (Walker et al., 1982). Es besitzt die Konsensussequenz AxTGoGKT (o: Serin, Threonin; x: beliebige Aminosäure). Die Hydrolyserate der Helikase wird durch den Austausch des hochkonservierten Lysins drastisch verringert (Rozen et al., 1989). In Hera wurde dieses Lysin in Position 51 gegen ein Glutamin ausgetauscht. Der ATP-

Umsatz dieser K51Q-Mutante wurde dann wie Wildtyp und *core* in einem Einzelumsatzexperiment bestimmt. Über einen Zeitraum von 6 h konnte bei dieser Mutante keine signifikante Abnahme der ATP-Konzentration beobachtet werden. Durch den Aminosäureaustausch ist diese Mutante hydrolysedefizient.

#### 4.1.2.4 Bildung von AMP während der ATP-Hydrolyse: Folgereaktion oder Kontamination?

Werden die Nukleotide nach erfolgter Hydrolyse über Umkehrphasen-HPLC getrennt, so sollten im Chromatogramm bei optimalen Bedingungen zwei getrennte Absorptionskurven zu sehen sein, eine für ATP, eine für ADP. Bei den Experimenten mit Hera ist jedoch nach einiger Zeit stets eine dritte Kurve zu sehen, deren Retentionszeit der von AMP entspricht. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Folgereaktion der Art:

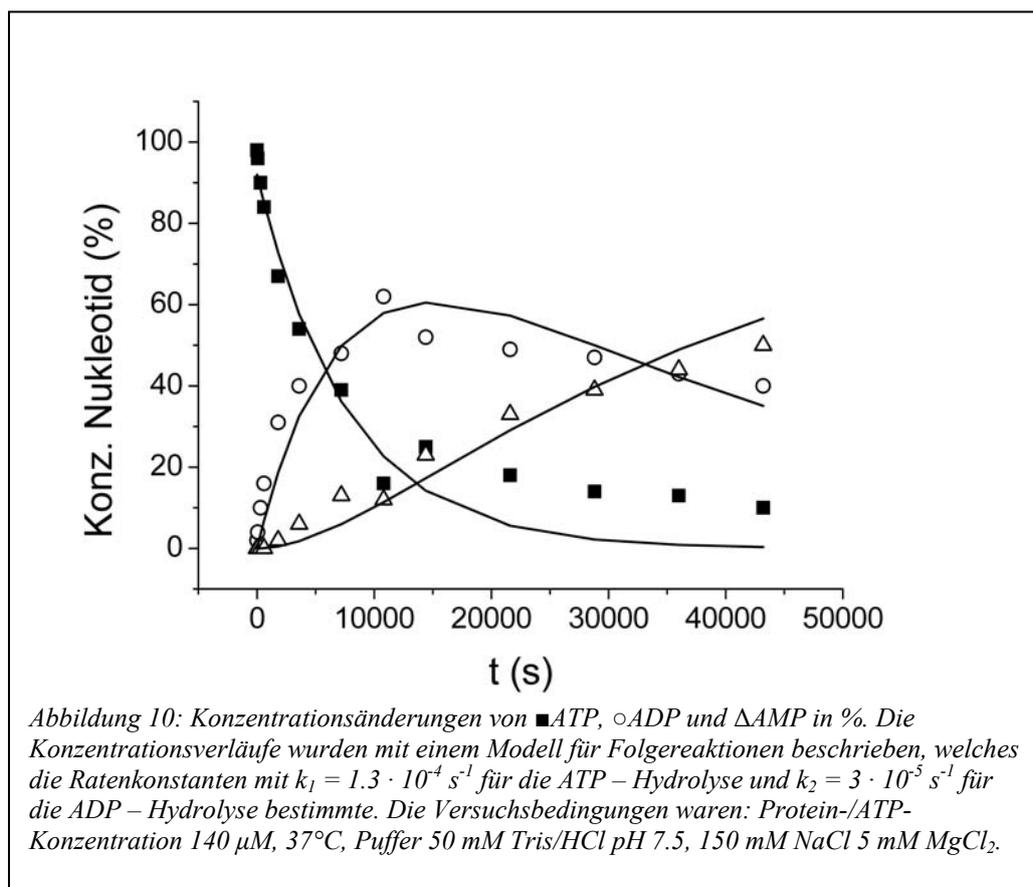


Abbildung 10 zeigt den Versuch, die Konzentrationsänderungen der verschiedenen Nukleotidspezies mit geeigneten Modellen für diese Folgereaktionen zu beschreiben (siehe

3.2.6). Die Ratenkonstante  $k_1$  für die ATP-Hydrolyse betrug  $1.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , die Ratenkonstante  $k_2$  für die Spaltung von ADP zu AMP  $3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Wie in der Abbildung zu erkennen ist, beschreibt das Modell den tatsächlichen Kurvenverlauf nicht sehr genau.

Bei Messungen, in denen Hera ADP statt ATP beigegeben wurde, wurde nach Hydrolyse neben AMP auch ATP gefunden. Zwar enthielt die verwendete ADP-Stammlösung schon vor Proteinzugabe einen Anteil von 1-2 % ATP, da ADP aus ATP synthetisiert wird und somit ein Restgehalt verbleibt. Nach Hydrolyse lag der Anteil an ATP aber deutlich über diesem Prozentsatz, abhängig von der Inkubationszeit bis zu 13 %. Dies spricht für eine ADP-Disproportionierungsreaktion:



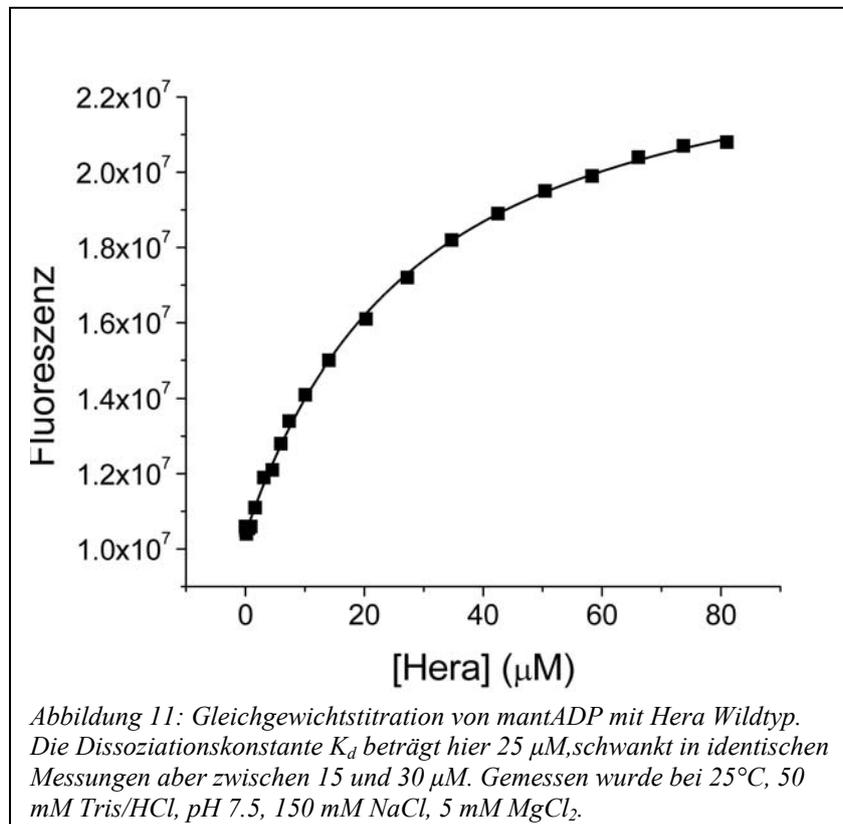
wie sie z.B. durch die Adenylatkinase katalysiert wird (Beis & Newsholme, 1975). Die Ausprägung der Disproportionierungsreaktion unterschied sich in verschiedenen Proteinreinigungen, war jedoch stets vorhanden. Versuche, eine mögliche Kontamination durch Optimierung des Reinigungsprotokolls (verschiedene Ionenaustauscher, Affinitätschromatographiesäulen, verlängerte Hitzeschritte etc.) zu eliminieren, blieben erfolglos, es war immer eine Disproportionierung zu beobachten. So konnte letztendlich nicht geklärt werden, ob es sich hierbei um eine intrinsische Eigenschaft von Hera oder eine Kontamination mit Fremdprotein handelt.

#### 4.1.3 mantADP Gleichgewichtstitrationen

Neben der Bestimmung der Umsatzraten sind auch die Bindungsaffinitäten von Hera für ATP und andere Nukleotide von Interesse, um in späteren Experimenten wie den Entwindungstests und den FRET-Experimenten sicher zu stellen, dass die entsprechenden Nukleotide in ausreichender Konzentration vorliegen. Man bedient sich hier Gleichgewichtstitrationen mit dem fluoreszenzmarkierten Nukleotid mantADP (siehe 3.2.7).

Eine Lösung mit mantADP wird mit Hera titriert, wodurch es zu einer Erhöhung der Fluoreszenz kommt, welche eine Sättigung erreicht (Abbildung 11). Anschliessend wird in einer Rücktitration das an das Protein gebundene mantADP mit einem weiteren, nicht fluoreszenzmarkierten Nukleotid verdrängt und über die Fluoreszenzabnahme die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt. Die Dissoziationskonstante für mantADP  $K_{d \text{ mantADP}}$  liegt bei 15–30  $\mu\text{M}$ . Die Dissoziationskonstante für ADP betrug 60  $\mu\text{M}$ , 187  $\mu\text{M}$  für ADPNP und

208  $\mu\text{M}$  für ADPCP. Bei einer Titration mit mantATP präzipitierte das Protein im Ansatz. Dasselbe gilt für Titrations mit der hydrolysedefizienten Mutante K51Q. So konnte nicht bestimmt werden, welchen Wert die Dissoziationskonstante für mantATP einnimmt und ob die Mutation des Walker A Motivs in der K51Q-Mutante die Nukleotidbindung beeinträchtigt.



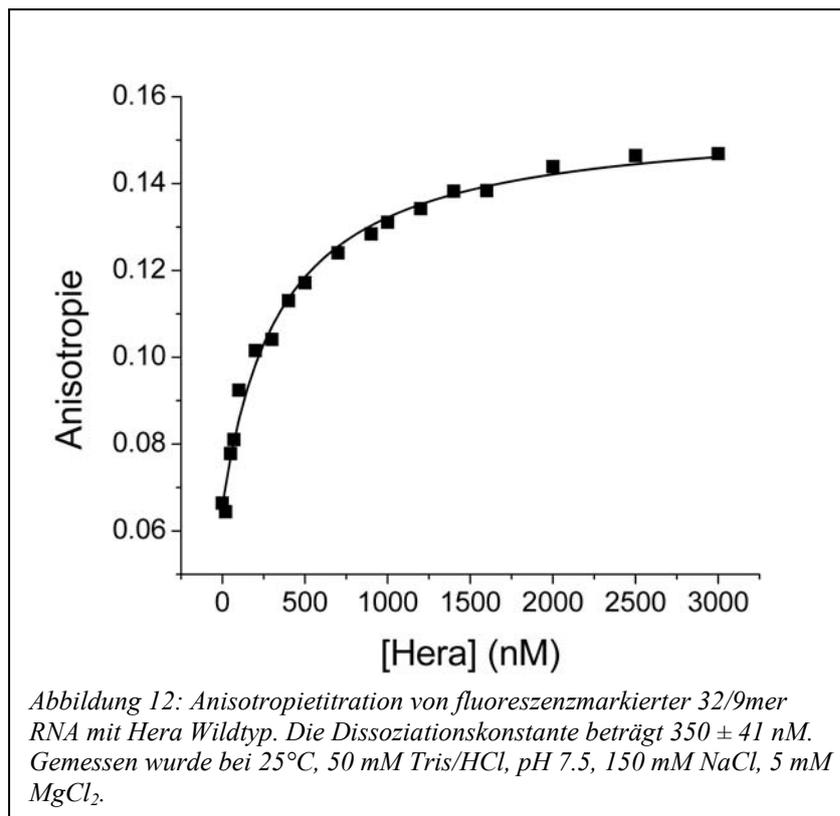
## 4.2 Die Wechselwirkung von Hera mit Nukleinsäuren

DEAD-box Helikasen werden durch Substratbindung aktiviert und verändern hierbei ihre Konformation. Im folgenden Kapitel wird die Aktivierung von Hera durch verschiedene Nukleinsäuren beschrieben. Diese Experimente sollen einen Aufschluss darüber liefern, welche Domänen und Motive in Hera für die spezifische Erkennung und Bindung von Nukleinsäuren benötigt werden. Darüber hinaus können auch Rückschlüsse über ein potentielles *in vivo* Substrat gezogen werden.

### 4.2.1 Messung der Bindungsaffinität von Hera für RNA mittels Anisotropietitration

Mit der Anisotropietitration (siehe 3.2.8) soll die Bindungsaffinität von Hera zu einem Minimal-RNA-Substrat bestimmt werden. Die RNA bestand aus einem 32 Basen langen

Fragment, welches *hairpin* 92 der 23S rRNA beinhaltet und einem 9 Basen langen und mit Fluoreszein markierten Fragment, welches mit dem 32mer einen kurzen doppelsträngigen Bereich ausbildete. Das hybridisierte Substrat diente als Sonde in diesem Versuch, deren Anisotropie sich durch Bindung an das Protein erhöhte. Das Experiment wurde ähnlich zu den in 4.1.3 beschriebenen mantADP Titrations durchgeführt. Zu einer Lösung mit RNA wurden steigende Konzentrationen von Hera titriert und die Anisotropieänderung gemessen. Für Hera Wildtyp ergab sich hierbei eine Dissoziationskonstante  $K_d$  von 350 nM (Abbildung 12).



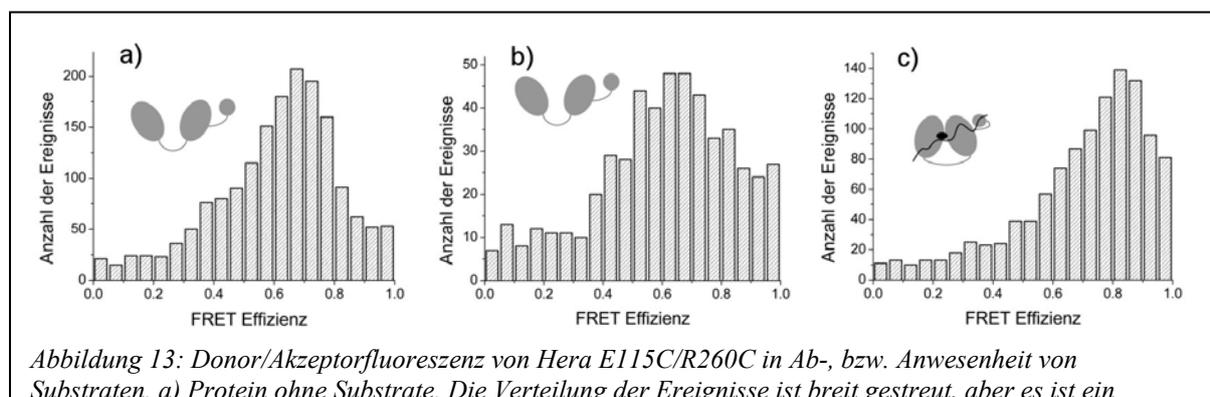
#### 4.2.2 Die Aktivierung von Hera durch Nukleinsäuren

Durch Bindung von Nukleinsäuren werden DEAD-box Helikasen in Anwesenheit von ATP oder eines analogen Substrates aktiviert (Theissen et al., 2008). Unter Aktivierung der Helikase versteht man eine Änderung der Konformation durch Substratbindung, welche in Einzelmolekül-FRET-Messungen beobachtet werden kann und die Voraussetzung für eine Entwindungsaktivität schafft. Es ist nicht bekannt, ob Hera spezifisch an bestimmte Nukleinsäuren bindet, oder ob eine Reihe verschiedener Substrate hierfür in Frage kommen. Weiterhin ist die Art und Lokalisation eines oder mehrerer Bindemotive im Protein nicht untersucht. Es wird vermutet, dass die spezifische Bindung für Nukleinsäuren durch Motive

im verlängerten C-terminus vermittelt wird, unter Umständen durch ein Motiv, welches eine schwache Sequenzhomologie mit den RNase P RNA-Bindemotiven der RnpAs einiger Organismen aufweist (Morlang et al., 1999). Zu diesem Zweck wurden Cysteine im N-terminus (E115C) und C-terminus (R260C) der Helikasedomäne eingeführt und das Protein statistisch markiert (siehe 3.2.11). Des Weiteren wurden Varianten von Hera erstellt, bei denen die C-terminale Verlängerung fehlt (*core*), das vermeintliche RNase P RNA-Bindemotiv mutiert ist (RPM), oder das konservierte Motiv III verändert ist (SAT). Für die Betrachtung der in den folgenden Punkten beschriebenen Einzelmolekülexperimente sei an dieser Stelle bereits darauf hingewiesen, dass aufgrund der dimeren Struktur von Hera die Verteilung der Transfereffizienzen nicht ausschliesslich durch den Transfer von Position E115C auf R260C und umgekehrt bedingt ist. In einem statistisch markierten Dimer mit insgesamt 4 zur Verfügung stehenden Positionen (2 x E115C, 2 x R260C) gibt es vielmehr eine Vielzahl an Möglichkeiten für FRET, je nachdem an welche Positionen Donor-, an welche Akzeptorfarbstoff gebunden sind, in welchem Abstand diese vor und nach einer Konformationsänderung zueinander orientiert sind etc. Die folgenden Histogramme spiegeln also die Summe dieser Transferereignisse wieder. Von einer Umrechnung der FRET-Effizienzen in tatsächliche Abstände wird daher abgesehen. Individuelle Experimente, in denen verschiedene Transfermöglichkeiten genauer untersucht werden, sind unter 4.4 beschrieben. Der Einfluss auf die durch Einzelmolekülexperimente getroffenen Aussagen wird im Diskussionsteil erörtert.

#### 4.2.2.1 Die Aktivierung von Hera durch RNA und DNA

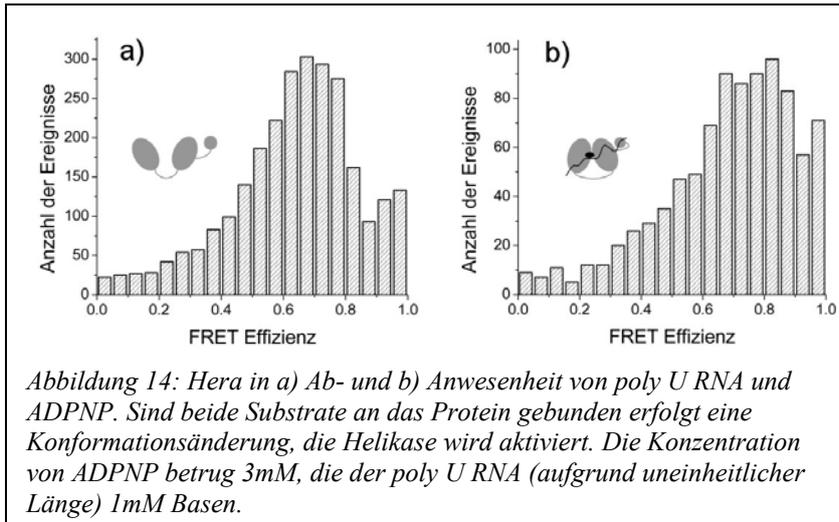
Um einen Einblick zu bekommen, welche Art von Nukleinsäuren Hera aktiviert, wurde die Donor/Akzeptorfluoreszenz des markierten Proteins in einer Konzentration von 50-100 pM



(Donorfarbstoff) gemessen (siehe 3.2.12). Aus den detektierten Ereignissen wurde unter Einbeziehung zuvor bestimmter Korrekturparameter ein Histogramm erstellt, welches die statistische Häufung von Ereignissen im Bereich der FRET-Effizienzen 0-1 wiedergibt. Die Korrekturparameter für die Fluoreszenzwerte der Farbstoffe an den Positionen E115C und R260C betragen  $\alpha = 0.56$ ,  $\beta' = 0.0052$ ,  $\gamma' = 1.09$  und  $\delta = 1.09$ . Der Försterabstand betrug 52 Å. In einer zweiten Messung wurde der Proteinlösung entweder ADPNP als nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon oder das zu untersuchende RNA bzw. DNA-Substrat zugegeben. Es sollte hiermit überprüft werden, ob die Anwesenheit eines Substrates allein ausreicht, um Hera zu aktivieren. In einer dritten Messung wurde das jeweils fehlende Substrat zugegeben. Die in den Hydrolyseexperimenten bestimmten  $K_M$  dienten als Anhaltspunkt, welche Konzentration an Substraten für eine Sättigung ausreichend ist. Wird die verwendete Nukleinsäure von der Helikase erkannt, verschiebt sich das Maximum in den Histogrammen zu einer höheren FRET-Effizienz, wie in Abbildung 13 gezeigt. Es zeigte sich, dass Hera nur in Anwesenheit beider Substrate eine geschlossene Konformation einnimmt. Für das Protein voller Länge wurden unterschiedliche Nukleinsäuren untersucht. Ziel dieser Messungen war festzustellen, ob Hera eine Spezifität für bestimmte Substrate aufweist, ob auch DNA-Substrate die Helikase aktivieren können und ob bestimmte Fragmente oder Strukturen wie z.B. ein *hairpin* zu einer Konformationsänderung des Proteins führen. Die verwendeten Substrate lassen sich in 5 Klassen einteilen, unspezifische RNA, ribosomale RNAs, RNase P RNAs, tRNAs und DNAs. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen für die einzelnen Klassen aufgeführt.

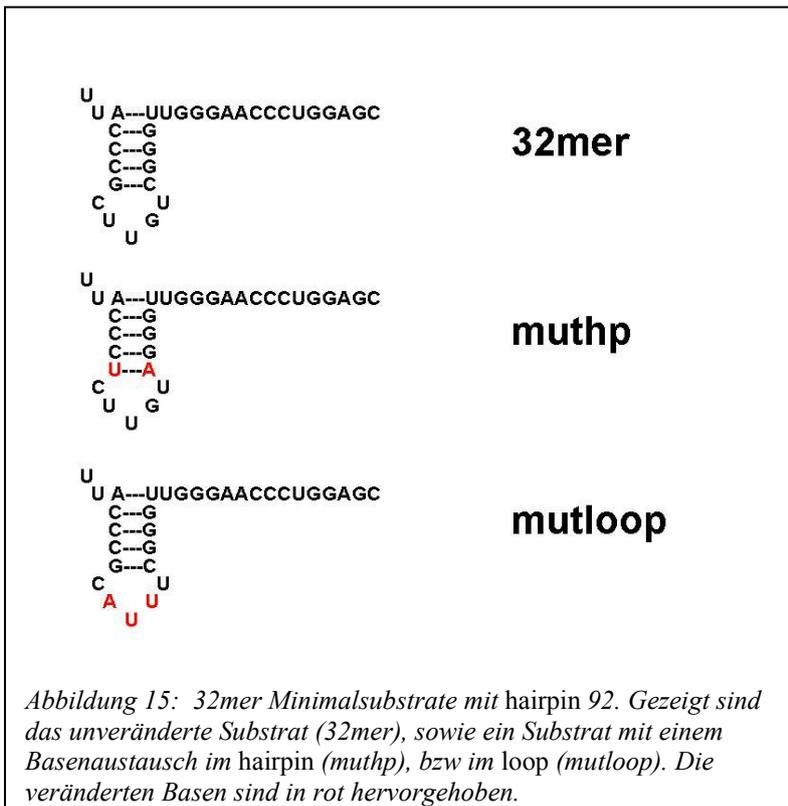
### **Unspezifische RNA**

Als einzige unspezifische RNA wurde poly U RNA verwendet. Es ist wurde bereits in 4.1.1.3 und 4.1.2 gezeigt, dass diese den ATP-Umsatz von Hera stimuliert. Abbildung 14 zeigt die Histogramme für doppelmarkiertes Hera in Ab- und Anwesenheit von poly U RNA und ADPNP. Eine zusätzliche Messung (nicht gezeigt) stellte sicher, dass die RNA alleine nicht ausreichte, eine Konformationsänderung herbeizuführen. Dies war auch in den anderen Messungen mit den verschiedenen Nukleinsäuresubstraten der Fall, weshalb diese Kontrollen nicht mit abgebildet sind. In Gegenwart von poly U RNA und ADPNP nimmt Hera eine geschlossene Konformation ein.

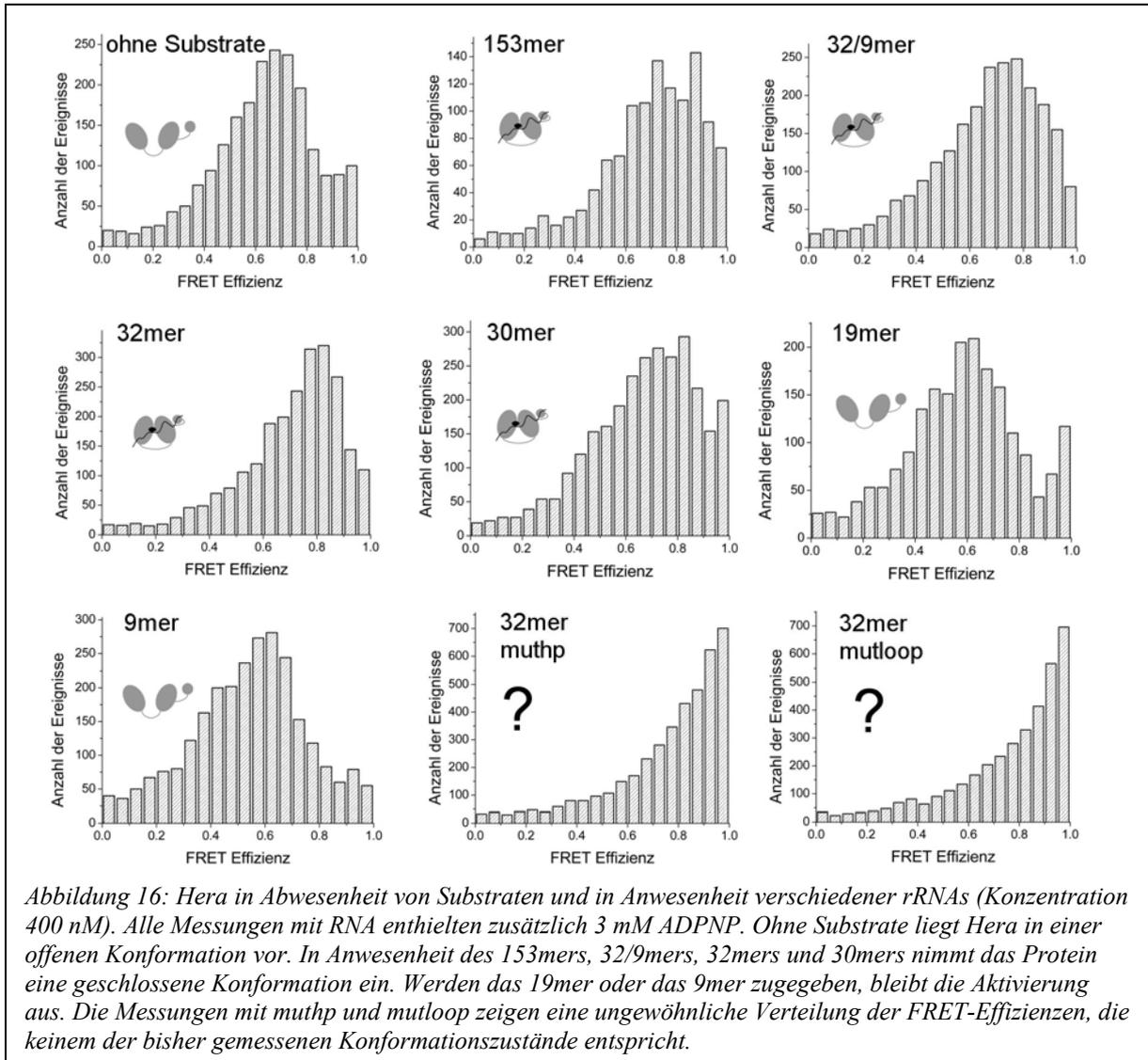


### Ribosomale RNA (rRNA)

Alle verwendeten rRNAs sind Fragmente der 23S rRNA aus *B. subtilis*. Ausser dem 9mer enthalten alle *hairpin* 92. Die Fragmente unterscheiden sich in der Länge (153, 32, 30 und 19 Basen). Aus dem 32mer Fragment und dem 9mer-Strang kann ein kurzes doppelsträngiges Minimalsubstrat hybridisiert werden (32/9mer). Zusätzlich wurden loop und *hairpin* des 32mers verändert (*muthp* und *mutloop*, Abbildung 15).



Ziel der Messungen war die Beantwortung folgender Fragen: Wird Hera generell durch diese rRNAs aktiviert? Ist die Länge der Fragmente entscheidend? Haben die Veränderungen im 32mer einen Einfluss auf die Aktivierung? Die Ergebnisse der Messungen zeigt Abbildung 16.



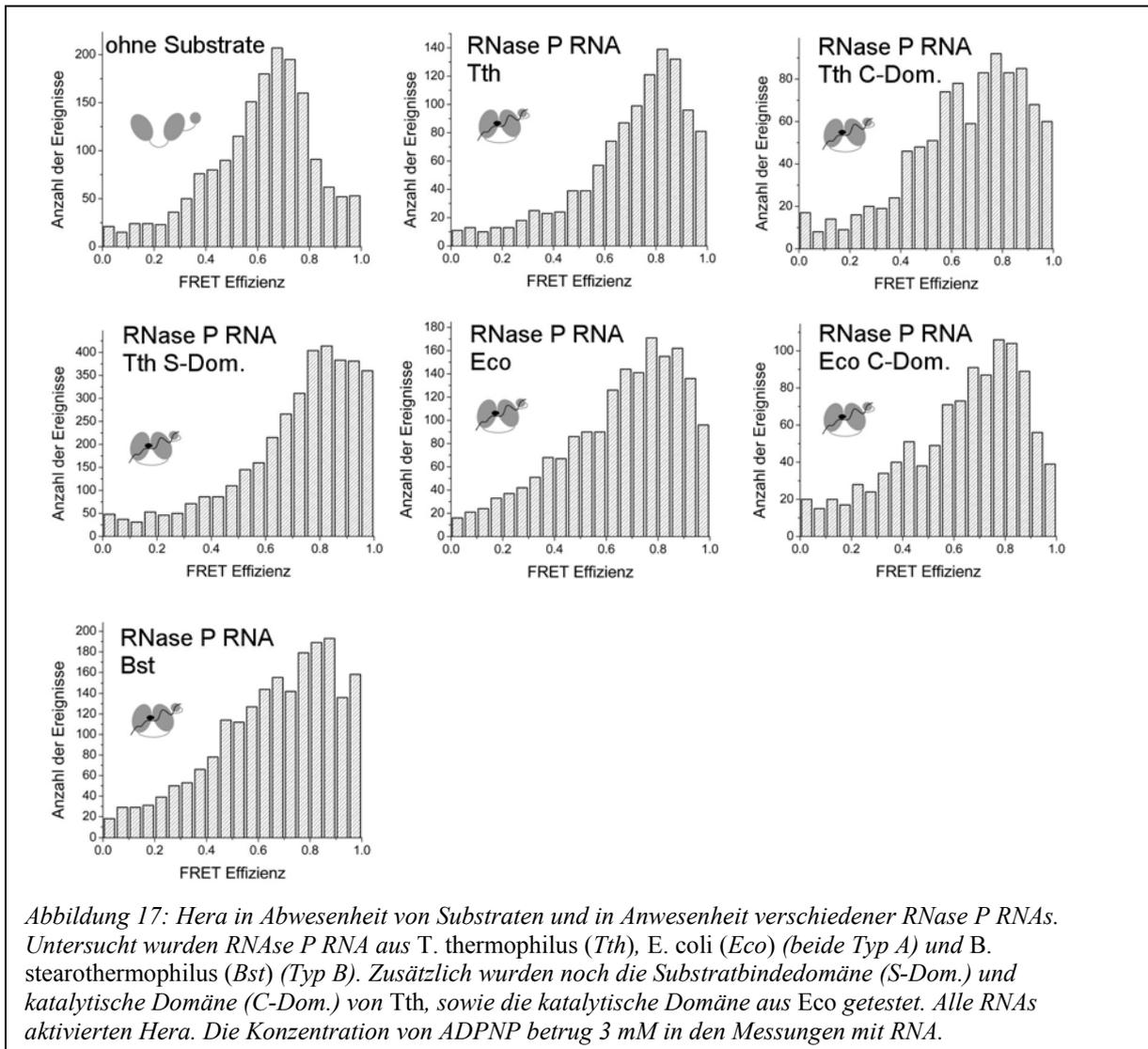
Hera wird von den eingesetzten rRNAs aktiviert, wenn sie eine Länge zwischen 153 und 30 Basen aufweisen. Es ist nicht von Bedeutung, ob der doppelsträngige Bereich zwischen dem 32mer und dem 9mer vorhanden ist oder nicht. Das 19mer, welches ebenfalls *hairpin* 92 enthält, führt nicht zu einer Konformationsänderung, womöglich müssen noch angrenzende einzelsträngige Sequenzen vorliegen. Auch mit dem 9mer verblieb Hera in einer offenen Konformation. Die veränderten 32mer Substrate mutph und mutloop bewirkten zwar eine Verschiebung der FRET-Effizienzen, diese Verteilung unterscheidet sich aber deutlich von Verteilung der FRET-Effizienzen, die Hera bei Bindung der anderen aktivierenden Substrate zeigt. Möglicherweise handelt es sich um eine fluoreszierende Verunreinigung der

Stammlösungen. Im konfokalen Mikroskop zeigten die Substrate in Abwesenheit von markiertem Protein aber keine erhöhte Fluoreszenz. Auch durch eine Fällung der Substrate konnte eine eventuell vorhandene Kontamination nicht entfernt werden. Daher wurden die Substrate zusätzlich in Entwindungstests eingesetzt.

### **RNase P RNAs**

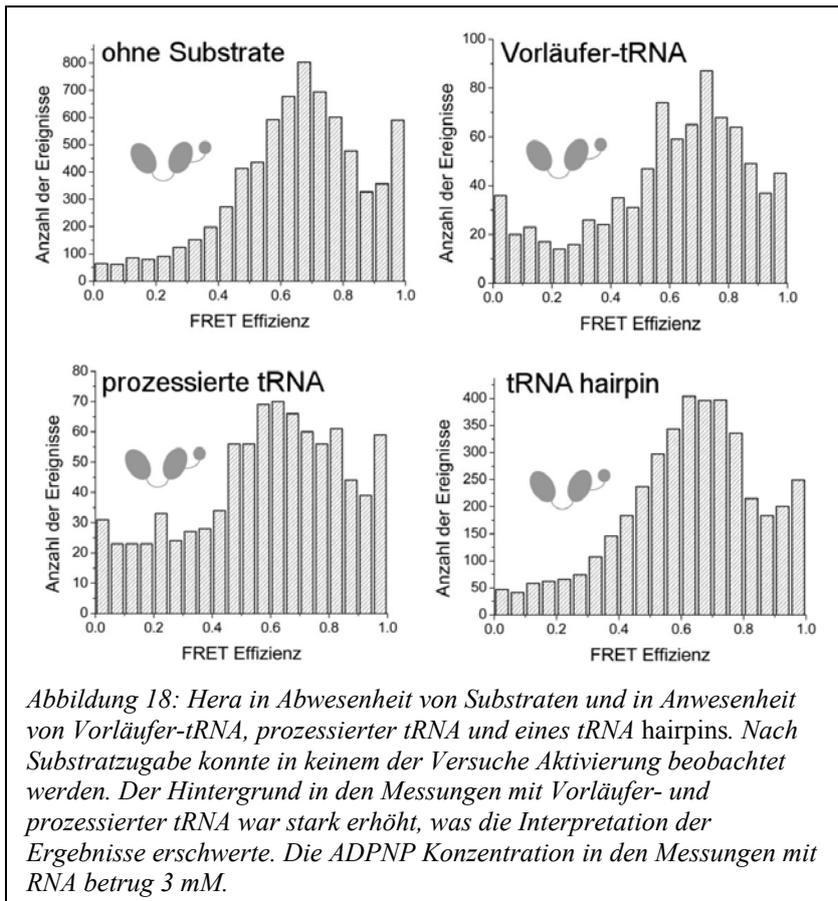
RNase P RNAs sind naheliegende Substrate für die Aktivierung von Hera, da in dessen C-terminus ein RNase P RNA-Bindemotiv vermutet wird (Morlang et al., 1999). RNase P RNAs lassen sich in Typ A und B unterscheiden (Brown et al., 1996; Haas et al., 1996), welche Unterschiede in Struktur und Faltung aufweisen. In den folgenden Messungen wurde RNase P RNA aus *T. thermophilus* und *E. coli* verwendet, welche beide zum Typ A gehören. Um zu untersuchen, ob auch RNase P RNA vom Typ B Hera aktiviert, wurde RNase P RNA aus *B. stearothermophilus* eingesetzt. RNase P RNAs lassen sich in eine Substratbindedomäne (S-Dom.) und eine katalytische Domäne (C-Dom.) aufteilen (Torres-Larios et al., 2006). Um zu klären, ob Hera eine spezifische Bindungsstelle in einer dieser Domänen erkennt, wurden zusätzlich die S- und C- Dom. der RNase P RNA aus *T. thermophilus*, sowie die C-Dom. aus *E. coli* RNase P RNA untersucht (Abbildung 17).

Alle RNAs aktivierten Hera, unabhängig vom Typ oder ob nur ein Fragment der RNA vorhanden war. Dies zeigt, dass RNase P RNA ein mögliches *in vivo* Substrat für Hera darstellt. Eine spezifische Bindungsstelle, falls vorhanden, konnte aber nicht eingegrenzt werden. In weiteren Versuchen (nicht gezeigt) stellte sich zudem heraus, dass schon 50 nM der RNase P RNA aus *T. thermophilus* ausreichen, um eine Konformationsänderung herbeizuführen.



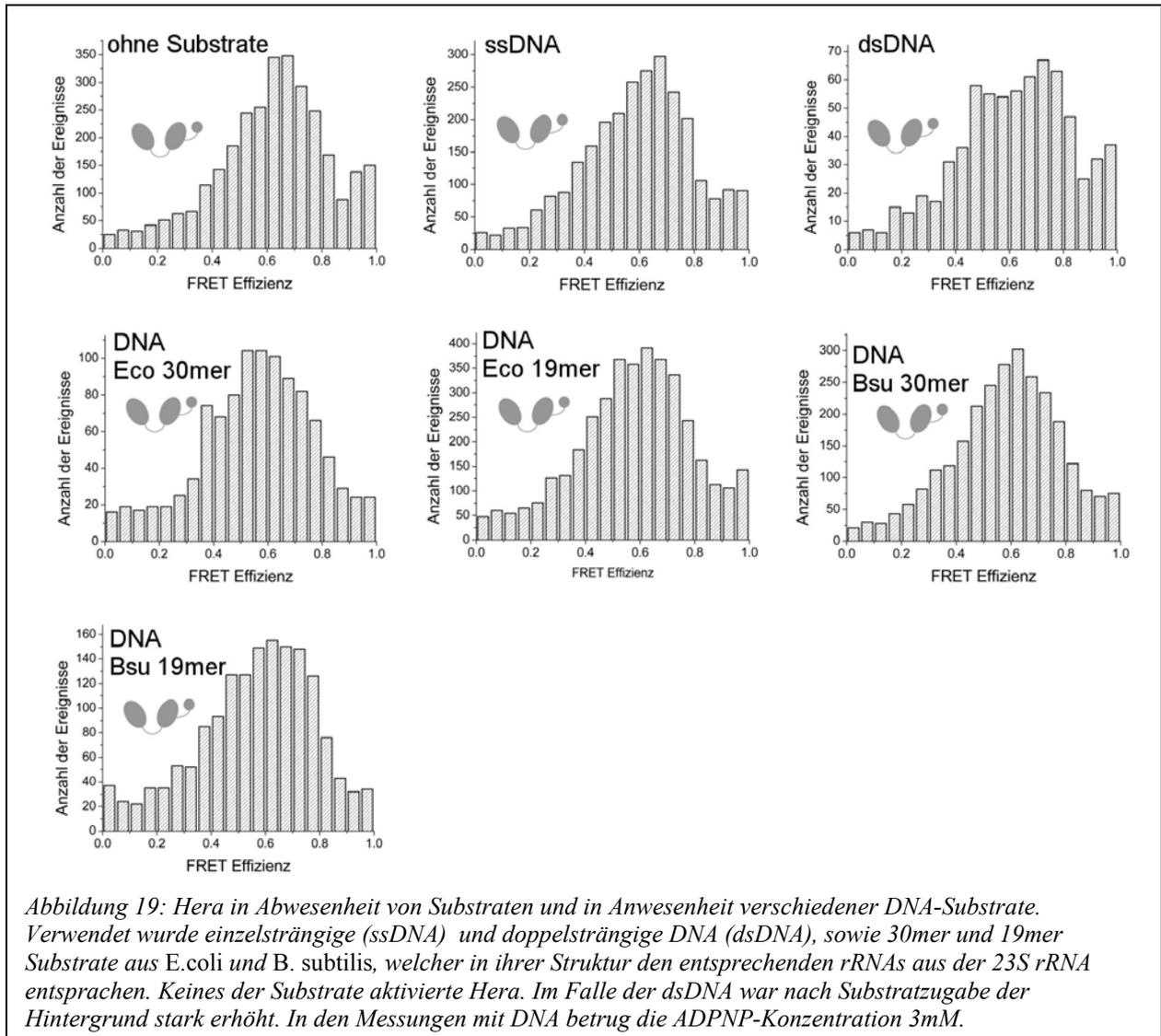
## tRNAs

RNase P RNAs prozessieren die 5'-Enden von tRNAs (Altman et al., 1993). Es ist daher logisch auch Vorläufer-RNA (nicht prozessiert) und prozessierte tRNAs auf eine mögliche Aktivierung von Hera hin zu testen. Zusätzlich wurde noch ein tRNA *hairpin* untersucht, um die Frage zu klären ob generell das Vorliegen eines *hairpins* ausreicht, um eine Konformationsänderung bei Hera zu bewirken. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 18. In Anwesenheit keines der genannten Substrate wurde Hera aktiviert. Im Falle der Vorläufer-tRNA und der prozessierten tRNA erhöhte sich der Hintergrund in den Messungen nach Substratzugabe erheblich, was eine verlässliche Interpretation der Ergebnisse erschwert.



## DNAs

Um auszuschliessen, dass Hera allgemein durch Nukleinsäuren aktiviert werden kann, wurden auch verschiedenen DNA-Substrate getestet. Als Substrate dienten ein Einzelstrang (ssDNA) und ein Doppelstrang von je 47 Basen Länge. Ausserdem wurden Substrate getestet, deren Sequenz und Struktur den 30mer und 19mer rRNA-Substraten aus *B. subtilis* und *E. coli* auf DNA-Ebene entsprachen. Bei den Einzelmolekülmessungen mit den rRNAs konnte gezeigt werden, dass das 30mer aus *B. subtilis* eine Konformationsänderung bei Hera bewirkt, das 19mer nicht. Die hier verwendeten DNA-Analoga enthalten somit auch einen *hairpin*, welcher *hairpin* 92 entspricht. Mit diesen Substraten soll gezeigt werden, ob die Struktur oder die Art der Nukleinsäure (RNA oder DNA) für die Aktivierung von Bedeutung ist. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 19.



Keines der DNA-Substrate aktivierte Hera. In der Messung mit dsDNA allerdings ist der Hintergrund stark erhöht, was die Interpretation dieser Messung erschwert. DNA kann also als Substrat für Hera ausgeschlossen werden, selbst wenn die Struktur einem RNA-Substrat entspricht, welches die Helikase aktiviert.

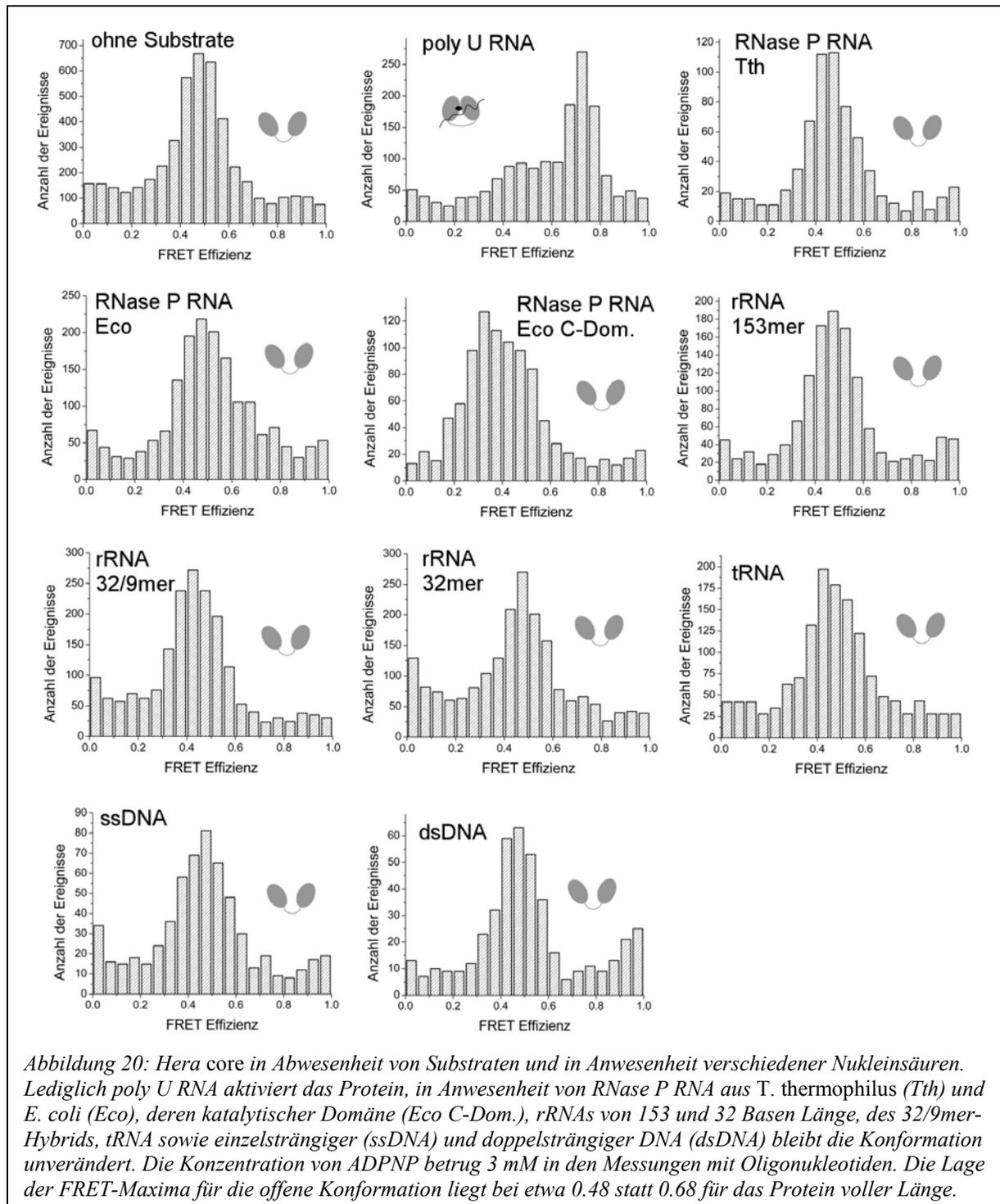
Zusammenfassung der Einzelmolekülmessungen von Hera mit verschiedenen Nukleinsäuren:

Alle bisherigen Messungen sind nochmals übersichtlich in Tabelle 1 zusammengefasst:

*Tabelle 1: RNA und DNA-Substrate wurden im konfokalen Mikroskop getestet, ob sie Hera aktivieren (+) oder nicht (-). Zu den aktivierenden Substraten gehören die poly U RNA, sämtliche RNase P RNAs inklusiver ihrer Domänen und rRNAs, welche länger als 19 Basen sind. Eine Ausnahme von letzteren bildeten die mutierten 32mer-Substrate, welche abweichende Histogramme in Anwesenheit beider Substrate lieferten. tRNAs und DNA-Substrate aktivierten Hera nicht.*

Art des Substrats	Bezeichnung	Helikase-Aktivierung (+/-)
<b>unspezifisch</b>	poly U RNA	+
<b>rRNA (<i>B. subtilis</i>)</b>	153mer	+
	32/9mer	+
	32mer	+
	30mer	+
	19mer	-
	9mer	-
	32mer, mutierter loop	?
	32mer, mutierter hairpin	?
<b>RNase P RNA</b>	RNase P RNA, <i>T. thermophilus</i>	+
	RNase P RNA, <i>T. thermophilus</i> , katalytische Domäne	+
	RNase P RNA, <i>T. thermophilus</i> , Substratbindedomäne	+
	RNase P RNA, <i>E. coli</i>	+
	RNase P RNA, <i>E. coli</i> , katalytische Domäne	+
	RNase P RNA, <i>B. stearothermophilus</i>	+
<b>tRNA</b>	tRNAGly	-
	tRNAGly, 5'-prozessiert	-
	tRNA hairpin	-
<b>DNA</b>	DNA-Einzelstrang	-
	DNA-Doppelstrang	-
	DNA 19mer hairpin, <i>B. subtilis</i>	-
	DNA 30mer hairpin, <i>B. subtilis</i>	-
	DNA 19mer hairpin, <i>E. coli</i>	-
	DNA 30mer hairpin, <i>E. coli</i>	-

#### 4.2.2.2 Die Aktivierung des *core* durch RNA und DNA



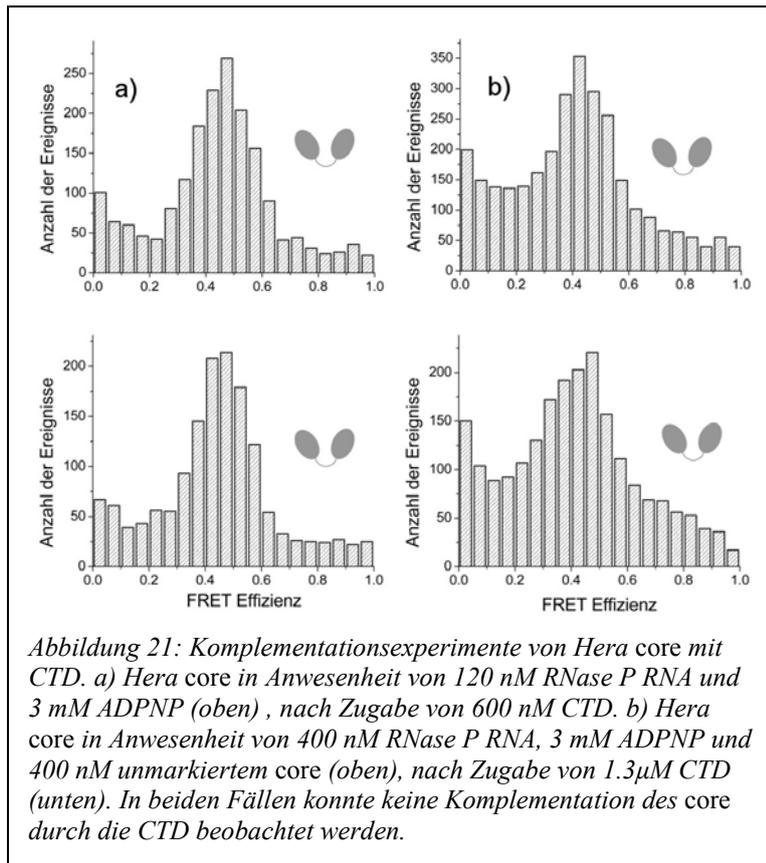
Hera wird durch unspezifische, ribosomale und RNase P RNAs aktiviert. Nicht bekannt ist, ob es im Protein Motive gibt, welche die spezifische RNA-Bindung vermitteln. Bei der Helikase YxiN aus *B. subtilis* befindet sich ein solches Motiv im verlängerten C-terminus (Kossen et al., 2002). Auch Hera ist carboxyterminal über die Helikasedomäne um 145 Aminosäuren verlängert. In diesem Bereich liegt das Dimerisierungsmotiv (Klostermeier &

Rudolph, 2009) und möglicherweise auch ein Bindungsmotiv für RNA. Durch Deletion wurden diese 145 Aminosäuren entfernt und die Aktivierung der verbleibenden Helikasedomäne durch Nukleinsäuren (*core*) analog 4.2.2.1 durch Einzelmolekülexperimente untersucht (Abbildung 20).

Es zeigte sich, dass Form und Lage des Transfermaximums sich in der Messung für das markierte *core* signifikant von den Messungen für doppelmarkiertes Hera voller Länge unterschieden. Die Verteilung der verschiedenen Effizienzen ist beim *core* weniger breit und das Maximum liegt bei einer FRET-Effizienz von 0.48, statt ~0.68 im vollständigen Protein. Nach Zugabe von ADPNP zeigte sich nur in Gegenwart von poly U RNA eine Konformationsänderung auf einen Wert von 0.68 (Abbildung 20). In Anwesenheit von rRNA (153mer, 32/9mer, 32mer), RNase P RNA (*T. thermophilus*, *E. coli*, *E. coli* katalytische Domäne), tRNA und einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA blieb die Konformation unverändert. Dies bestärkt die Vermutung, dass die spezifische RNA-Bindung durch die deletierte C-terminale Domäne (CTD) vermittelt wird, während poly U RNA möglicherweise unspezifisch an das *core* bindet und diesen aktiviert.

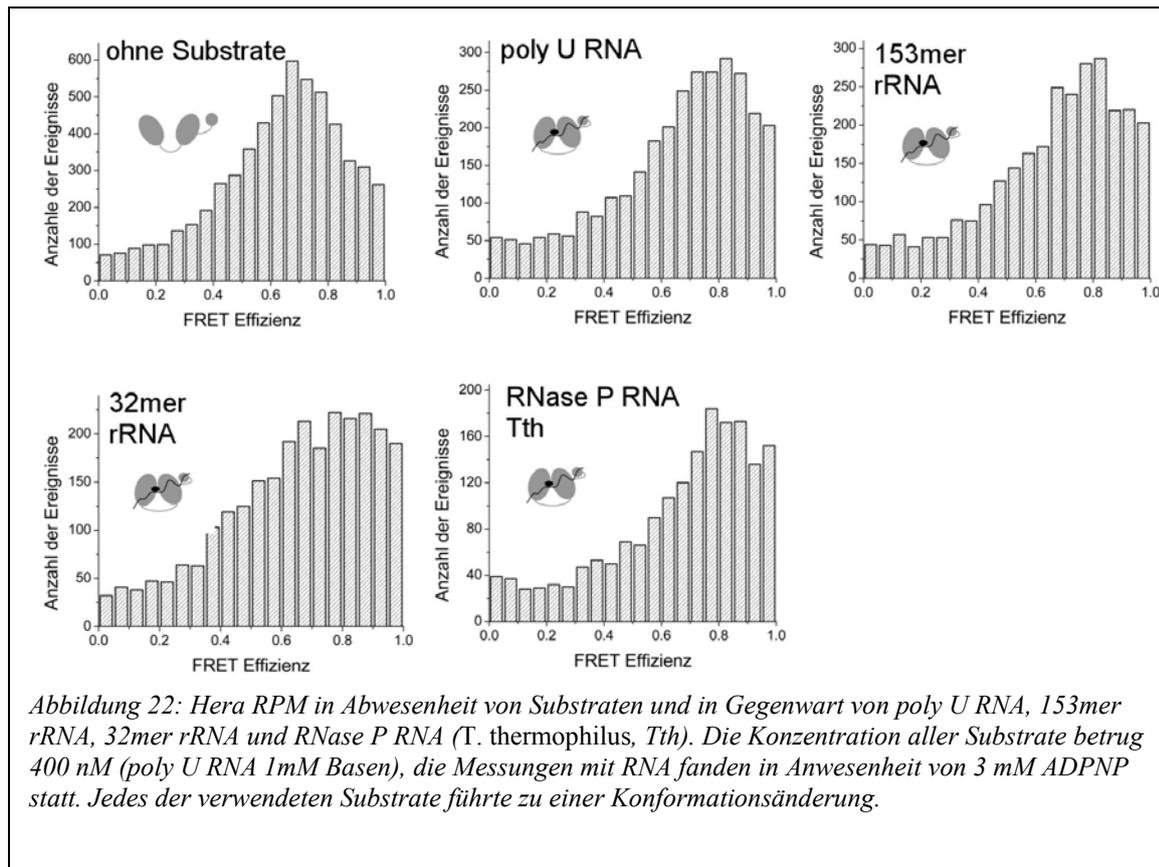
In Komplementationsexperimenten wurde hierauf untersucht, ob die vollständige Aktivität von Hera durch Zugabe der CTD wiederhergestellt werden konnte. Hierzu wurde eine Messung des markierten *core* in Anwesenheit von 3 mM ADPNP und 120 nM RNase P RNA (*T. thermophilus*) durchgeführt (Abbildung 21a). Es konnte keine Aktivierung des *core* beobachtet werden. In einer zweiten Messung wurde der Lösung dann 600 nM CTD zugegeben. Die maximale Transfereffizienz blieb unverändert.

Das Ausbleiben einer Komplementation von CTD und *core* könnte durch die niedrigen Proteinkonzentrationen im Ansatz erklärt werden. Deshalb wurde in einer zweiten Messung (Abbildung 21b) unmarkiertes *core* zugegeben und auch die Konzentration der CTD (1.3  $\mu$ M) und der RNA (400 nM) erhöht. Auch bei dieser Messung konnte keine Rekonstitution der Aktivität *in trans* beobachtet werden. Das bedeutet, dass die Anwesenheit CTD für die Aktivität von Hera nicht ausreicht, sie muss auch kovalent mit dem Protein verbunden sein.



#### 4.2.2.3 Die Aktivierung der RNase P RNA-Bindemotivmutante (RPM)

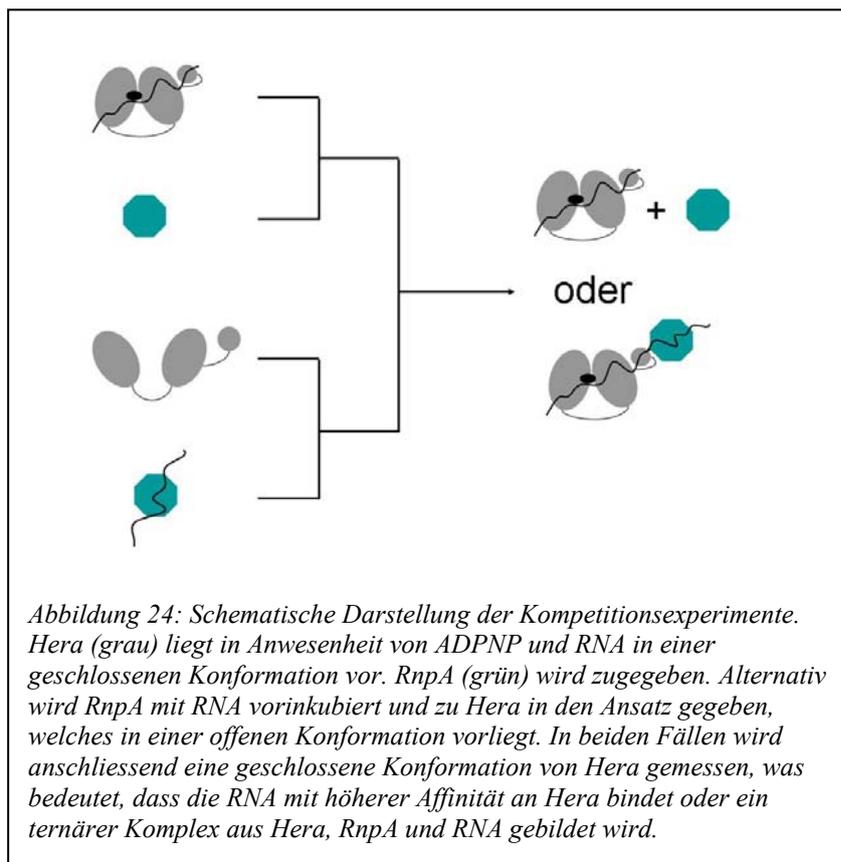
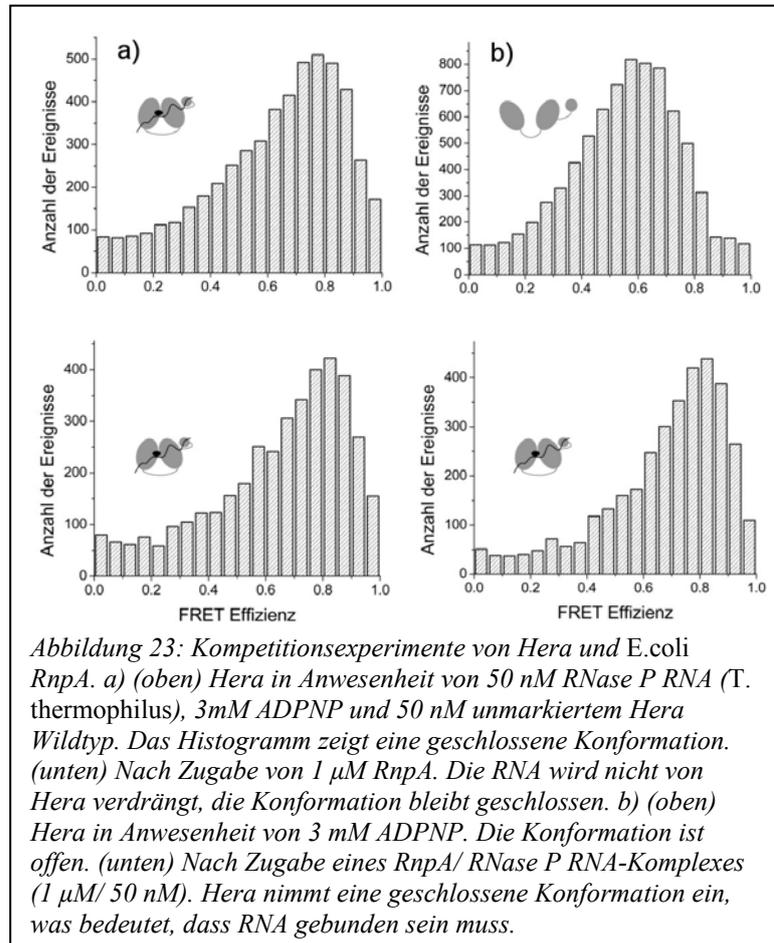
Wie bereits in 3.1.1.4 erläutert, wird die ATP-Hydrolyse einer Mutante von Hera, in welcher das vermeintliche RNase P RNA-Bindemotiv verändert ist, im gleichen Masse durch RNase P RNA stimuliert wie der Umsatz beim Wildtyp. Auch die Aktivierung der RPM durch unspezifische, ribosomale und RNase P RNA wurde untersucht. Verwendet wurden poly U RNA, 153mer, 32mer und RNase P RNA (*T. thermophilus*). Wie die Histogramme in Abbildung 22 belegen, tritt eine Konformationsänderung nach Zugabe aller genannten Substrate in Gegenwart von ADPNP ein. Das vermeintliche Bindemotiv wird also nicht für die Bindung von RNase P RNA benötigt, auch nicht für die Bindung anderer RNAs. Auch die Affinität zu diesem Substrat scheint nicht beeinträchtigt, schon 50 nM RNase P RNA genügen, um die RPM zu aktivieren, ähnlich wie bei der unveränderten Doppelcysteinmutante.



#### 4.2.2.4 Konkurrenz zwischen Hera und *E. coli* RnpA

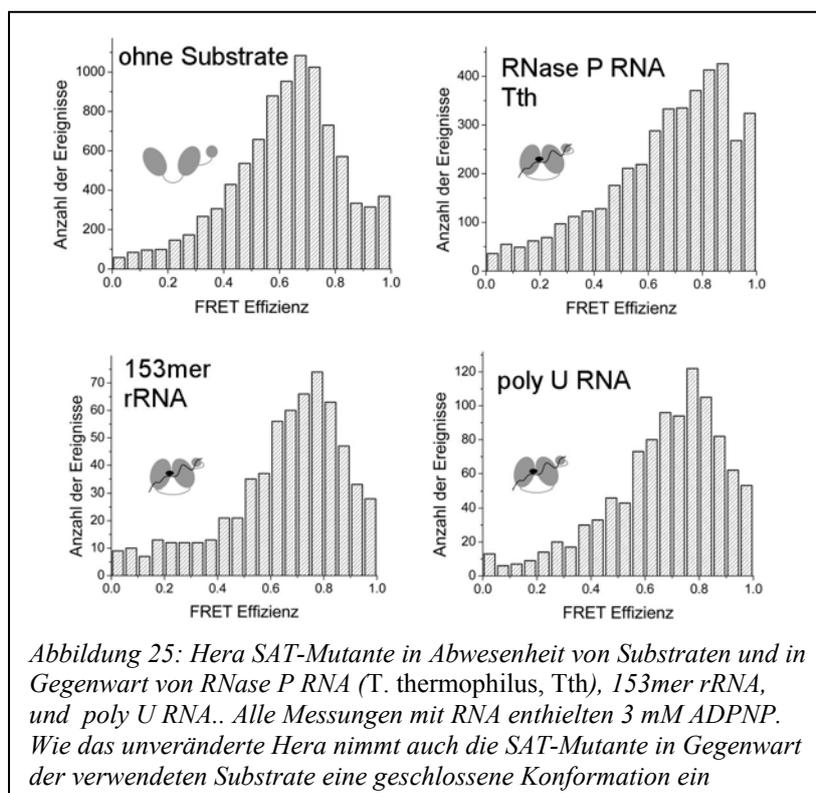
Die Ähnlichkeit des C-terminalen Motivs von Hera mit dem RNase P RNA Bindemotiv (Morlang et al., 1999) legt die Vermutung nahe, dass beide Proteine an die gleiche Sequenz von RNase P RNA binden. Deshalb wurde die Konkurrenz zwischen Hera und *E. coli* RnpA in Anwesenheit von *T. thermophilus* RNase P RNA untersucht. Hartmann et al., (2008) zeigten, dass unter ähnlichen Pufferbedingungen die Ausbildung eines aktiven Ribozymkomplexes aus der genannten RNA und RnpA möglich ist. Die Konzentration der RNase P RNA betrug 50 nM und war ausreichend, um eine Konformationsänderung zu bewirken. Um zu verhindern, dass kleinste Mengen RNA an Hera gebunden bleiben und somit keine sichtbare Verschiebung der Transfereffizienz durch eine Verdrängung mit RnpA eintritt, enthielt der Ansatz noch 50 nM unmarkierten Hera Wildtyp. Die Transfereffizienz veränderte sich auch nach Zugabe von 1  $\mu$ M RnpA nicht. (Abbildung 23a). Um sicher zu gehen, dass nicht eine langsame Dissoziation der Grund für das Ausbleiben eines Konkurrenzeffektes ist, wurde in einem Kontrollexperiment ein Komplex aus 1  $\mu$ M RnpA und 50 nM RNase P RNA präinkubiert und zu doppelmarkiertem Hera gegeben (Abbildung 23b). Nach Zugabe trat eine Konformationsänderung ein. Dies lässt zwei Schlüsse zu: Entweder besitzt Hera eine höhere Bindungsaffinität zu RNase P RNA als RnpA oder Hera

bindet an eine andere Sequenz in der RNA und es bildet sich womöglich ein ternärer Komplex aus Hera, RNA und RnpA. Die Experimente sind schematisch in Abbildung 24 dargestellt.



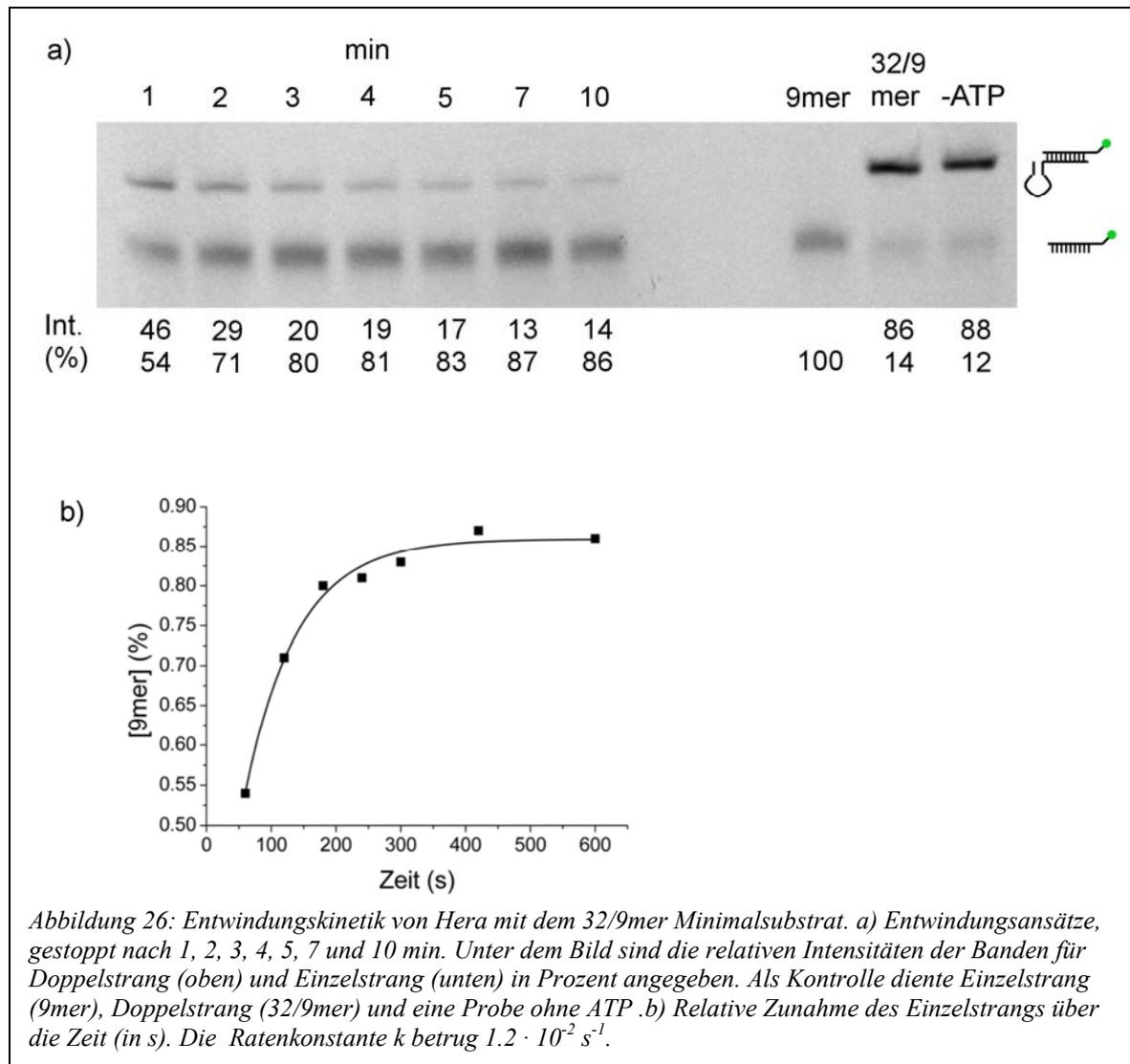
#### 4.2.2.5 Die Aktivierung der SAT-Mutante

DEAD-box Helikasen tragen in ihrer N-terminalen RecA-Domäne ein konserviertes Motiv mit der Konsensussequenz Serin, Alanin und Threonin (SAT). Dieses Motiv spielt eine tragende Rolle bei der Kopplung von ATP-Hydrolyse und Doppelstrangentwindung (Cordin et al., 2006). Bei Hera wurde das Motiv durch drei Alanine ausgetauscht, um zu überprüfen, welchen Einfluss die Mutation auf die Aktivierung und Entwindungsaktivität hat. In Abbildung 25 ist dargestellt, dass auch diese Mutante in Gegenwart von RNase P RNA (*T. thermophilus*), 153mer und poly U RNA eine geschlossene Konformation einnimmt wie Hera mit intaktem SAT-Motiv. Die Mutation des SAT-Motivs beeinträchtigt die Erkennung der RNA-Substrate und die Aktivierung der Helikase durch diese nicht.



### 4.3 Die Entwindungsaktivität von Hera

#### 4.3.1 Die Entwindungskinetik eines RNA-Minimalsubstrats durch Hera Wildtyp

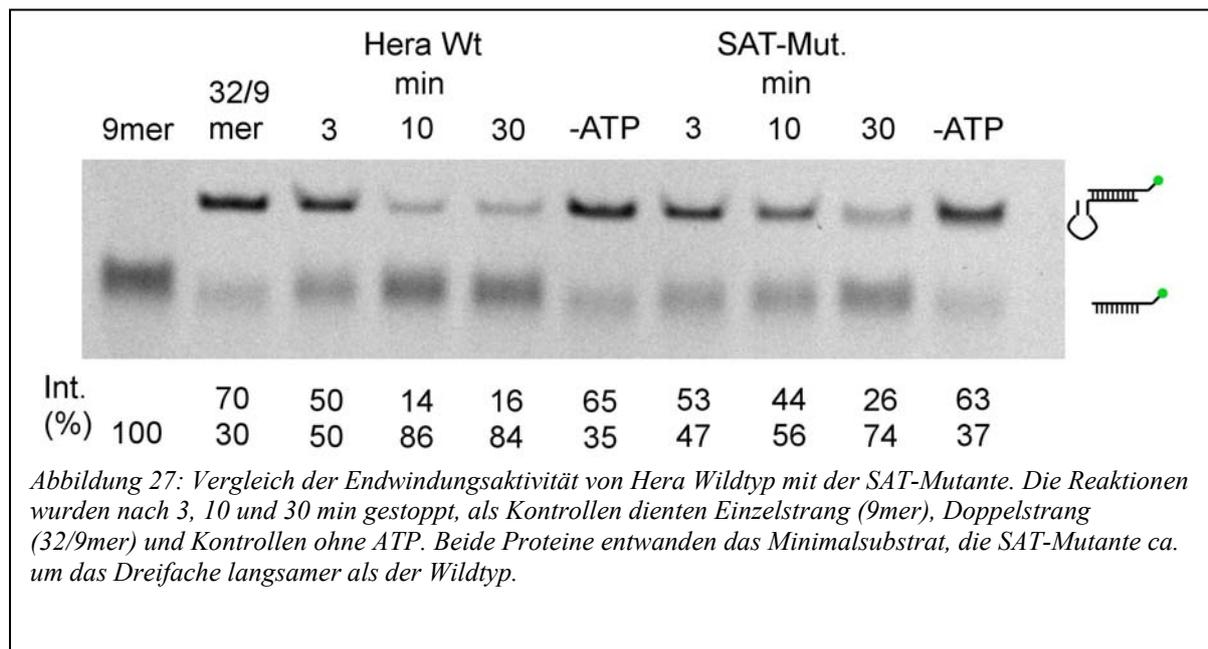


Einige DEAD-box-Helikasen sind in der Lage, unter ATP-Verbrauch kurze doppelhelikale Segmente zu entwinden (Rocak & Linder, 2004). Es wurde bereits gezeigt, dass Hera ATP hydrolysiert und verschiedenste RNA-Substrate unter Änderung der Konformation bindet. Eine Entwindungsaktivität wurde mit Hilfe des 32/9mer Minimalsubstrates getestet, wie es auch in den Anisotropietitrationen verwendet wurde (siehe 4.2.1). Dieses Substrat wird von der Helikase YxiN entwunden und es konnte bereits gezeigt werden, dass es Hera aktiviert (siehe 4.2.2.1, Abbildung 16). Nach Inkubation der RNA mit Hera wurden die Reaktionsansätze auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen, in welchem doppelsträngiges von einzelsträngigem Substrat getrennt wurde. Unter UV-Licht wurde das Fluoreszein,

welches an das 9mer gebunden ist zur Fluoreszenz angeregt. Auf diese Weise detektiert werden konnten einzelsträngiges 9mer und doppelsträngiges 32/9mer. Über die Auswertung der relativen Bandenintensitäten konnte die Umsatzrate der Entwindung bestimmt werden. Abbildung 26a zeigt ein Gel für die Entwindungskinetik von Hera mit diesem RNA-Substrat. Zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 10 min wurden die Reaktionen gestoppt und die Ansätze auf das Gel aufgetragen, die Banden für Doppelstrang und 9mer Einzelstrang sind deutlich getrennt zu erkennen. Als Kontrollen dienten Einzelstrang und Doppelstrang, sowie eine Kontrolle ohne ATP, in welcher keine Entwindung beobachtet wurde. Hera entwindet das Substrat in Anwesenheit von ATP. Die relative Zunahme von 9mer Einzelstrang (in Prozent) über die Zeit wurde in Abbildung 26b dargestellt, die Ratenkonstante  $k$  betrug  $1.2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

#### 4.3.2 Der Vergleich der Entwindungsaktivität von Hera Wildtyp und der SAT-Mutante

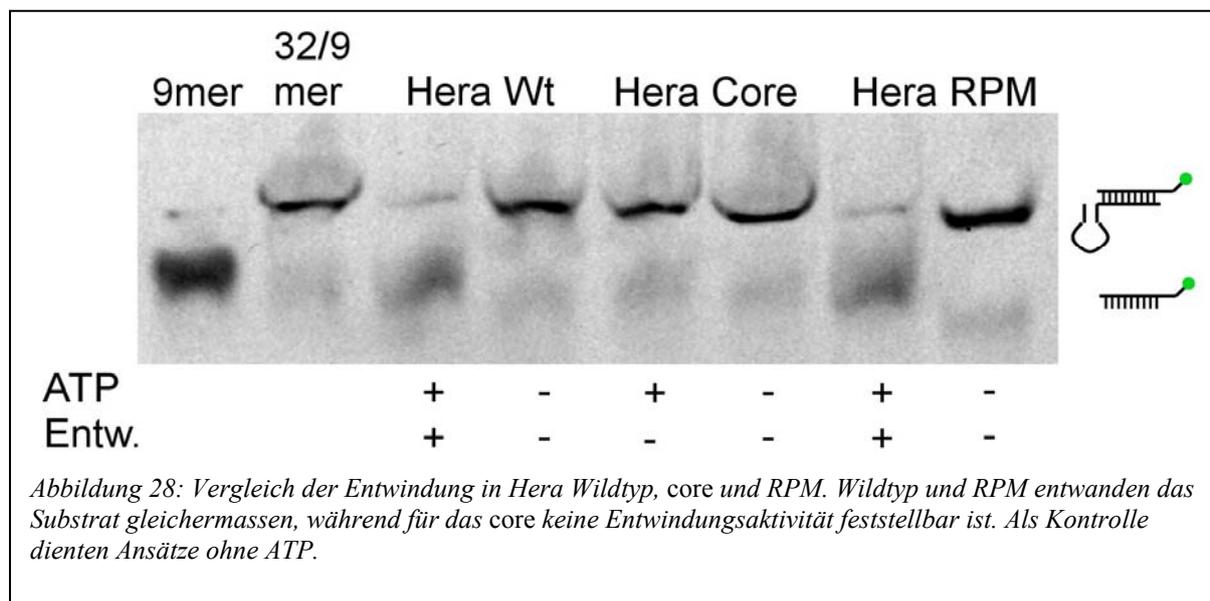
Unter Punkt 4.2.2.5 konnte mittels Einzelmolekülexperimenten gezeigt werden, dass eine



Mutation des SAT-Motivs von Hera die Aktivierung durch RNA-Substrate nicht beeinträchtigt. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob diese Mutante auch zur Entwindung des Minimalsubstrates fähig ist und ob diese Reaktion mit einer ähnlichen Geschwindigkeit abläuft wie beim Wildtyp. Hierzu wurden Entwindungsansätze mit Hera und der SAT-Mutante durchgeführt, nach je 3, 10 und 30 min gestoppt und auf ein Nativgel aufgetragen. Als Kontrollen dienten Einzelstrang und Doppelstrang, sowie Ansätze ohne ATP (Abbildung 27). Die SAT-Mutante entwindet ebenfalls den Doppelstrang. Auch wenn die

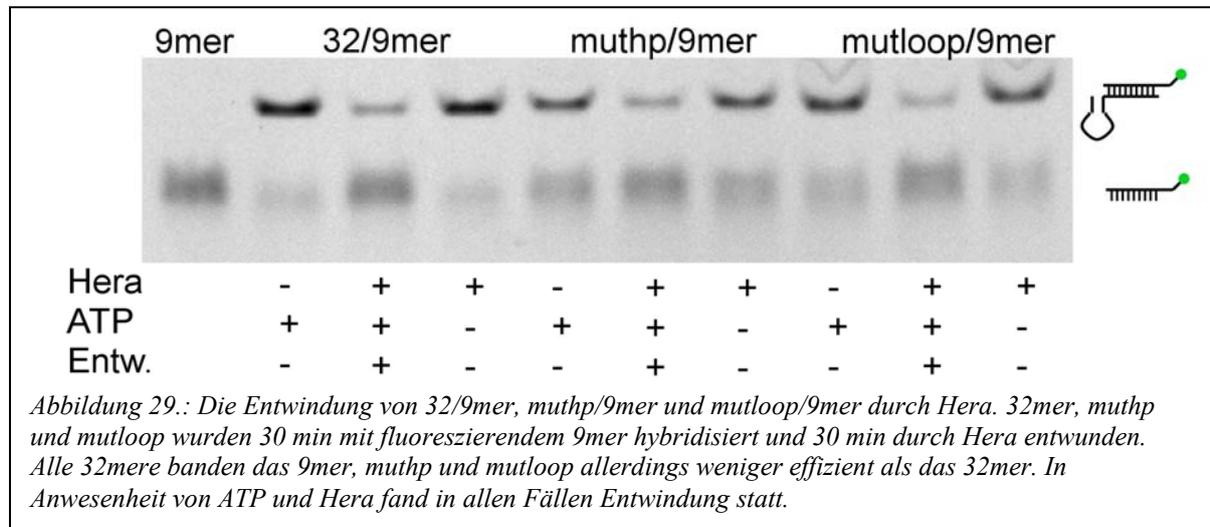
Anzahl der Messpunkte nicht ausreicht, um die Ratenkonstante genau zu beschreiben, so lässt sich doch aus den Bandenintensitäten ein Unterschied in der Entwindungsgeschwindigkeit von Wildtyp und SAT-Mutante abschätzen. Letztere entwindet ca. dreimal langsamer als der Wildtyp. Eine Mutation des SAT-Motivs reicht demnach nicht aus, die Entwindungsaktivität von Hera vollständig zu hemmen, beeinträchtigt diese aber.

#### 4.3.3 Der Vergleich der Entwindungsaktivität von Hera Wildtyp mit dem *core* und der RNase P Motiv-Mutante (RPM)



In Einzelmolekülmessungen konnte gezeigt werden, dass eine Hera-Mutante (RPM), welche C-terminal Alanine statt der drei konservierten Arginine trägt, wie der Wildtyp von ribosomaler RNA aktiviert wird (siehe 4.2.2.3). Das *core* hingegen weist keine spezifische Aktivierung durch diese RNA auf (siehe 4.2.2.2). Die Entwindungsaktivität beider Proteinmutanten wurde mit der des Wildtyps verglichen (Abbildung 28). Da hier keine kinetischen Parameter bestimmt werden sollten, wird in der Abbildung auf eine Angabe der relativen Bandenintensitäten verzichtet. In Anwesenheit von RNA entwand die RPM ähnlich effektiv wie der Wildtyp, während das *core* keine Entwindung zeigte.

#### 4.3.4 Die Entwindung mit mutierten 32mer-Strängen

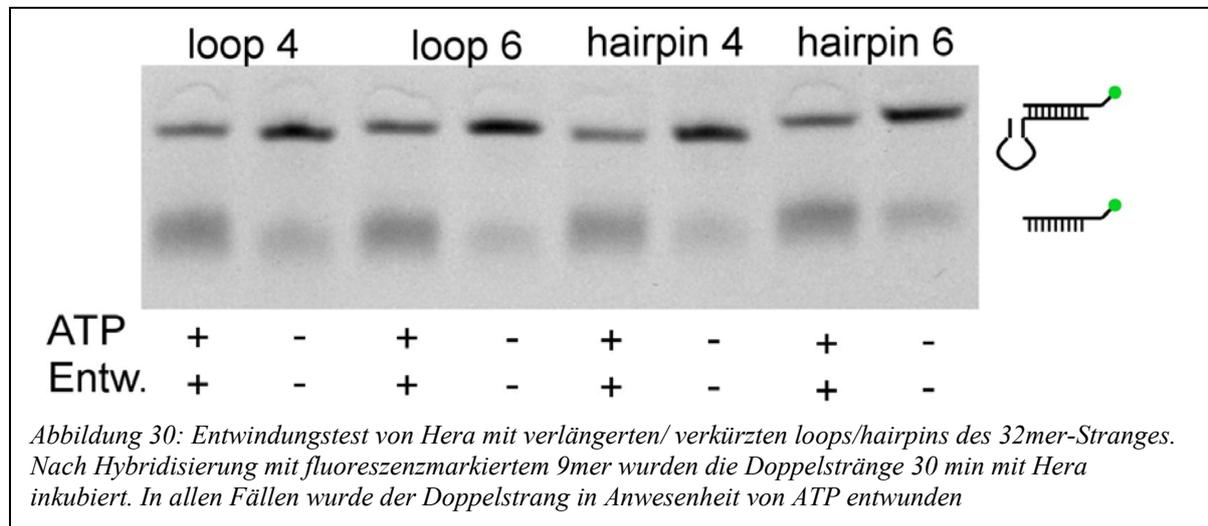


In 4.2.2.1 wurde gezeigt, dass Hera durch eine Vielzahl von RNA-Substraten aktiviert wird. Nicht eindeutig waren hier allerdings Messungen mit 32mer Substraten, bei denen eine Mutation entweder im *hairpin* (muthp) oder im *loop* (mutloop) vorlag (siehe Histogramme, Abbildung 16). In einem Entwindungstest sollte untersucht werden, ob diese 32mere ebenfalls mit dem fluoreszenzmarkiertem 9mer hybridisiert und durch Hera entwunden werden können. Die Dauer der Hybridisierung und der Entwindungsreaktion betrug jeweils 30 min. Als Vergleich diente die Entwindung des regulären 32/9mers. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 29. Neben den Kontrollen ohne ATP wurden auch Doppelstrangkontrollen ohne Hera aufgetragen, um Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz zu ermitteln. muthp und mutloop hybridisierten mit dem 9mer, allerdings bedeutend schwächer als das unveränderte 32mer (32mer: 75% Doppelstrang, muthp und mutloop: ~40% Doppelstrang). In Anwesenheit von ATP und Protein erfolgte die Entwindung der Substrate in allen Fällen. Auch *hairpin* und *loop* mit veränderter Sequenz werden von Hera erkannt und entwunden. Die ungewöhnliche Verteilung der Ereignisse in den Einzelmolekülmessungen mit diesen beiden Substraten ist aber nach wie vor nicht geklärt.

#### 4.3.5 Die Entwindung mit verlängerten/verkürzten loop/hairpin 32mer-Substraten

Alle bisherigen Versuche zur Aktivierung und Entwindungsaktivität von Hera haben nur eingegrenzt, was die Minimalanforderungen der Helikase an ein spezifisches RNA-Substrat sind. RNase P RNAs und Fragmente der 23 S rRNA führen zu einer Konformationsänderung, tRNAs und DNAs nicht. Das Vorliegen einer *hairpin*-Struktur alleine reicht nicht aus, ein

tRNA-*hairpin* aktivierte Hera nicht. Aus diesem Grunde wurden Entwindungstest mit um eine Base bzw. um ein Basenpaar verkürzten/verlängerten Varianten des 32mer-Stranges durchgeführt (verkürzt: loop 4, hairpin 4, verlängert: loop 6, hairpin 6). Es soll hiermit gezeigt werden, ob Hera die ursprüngliche Länge von 5 Basen bzw. Basenpaaren von *hairpin* und *loop* für die Substraterkennung benötigt oder nicht. Die 32mer-Varianten wurden mit



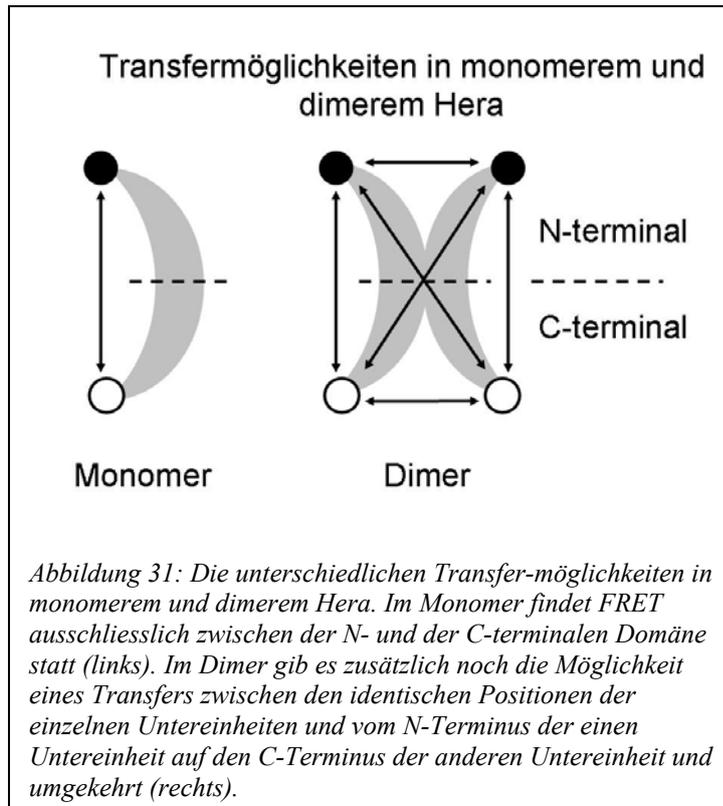
fluoreszenzmarkiertem 9mer hybridisiert und in den Entwindungstest eingesetzt. In allen Fällen wurde der Doppelstrang entwunden (Abbildung 30). Hera erkennt den *hairpin* und den *loop* nicht nur, wenn die Sequenz mutiert ist, sondern auch, wenn die Länge verändert ist.

#### 4.4 Hera: Eine dimere DEAD-box Helikase

Das Vorliegen von Hera als Dimer stellt eine Ausnahme unter den DEAD-box Helikasen dar. Das Dimerisierungsmotiv ist C-terminal im Bereich der  $\alpha$ -Helix 18 lokalisiert und weist eine überraschend grosse Flexibilität und Stabilität auf (Klostermeier & Rudolph, 2009). Um die monomeren Einheiten voneinander zu trennen ist eine Inkubation bei 65°C über mehrere Minuten erforderlich.

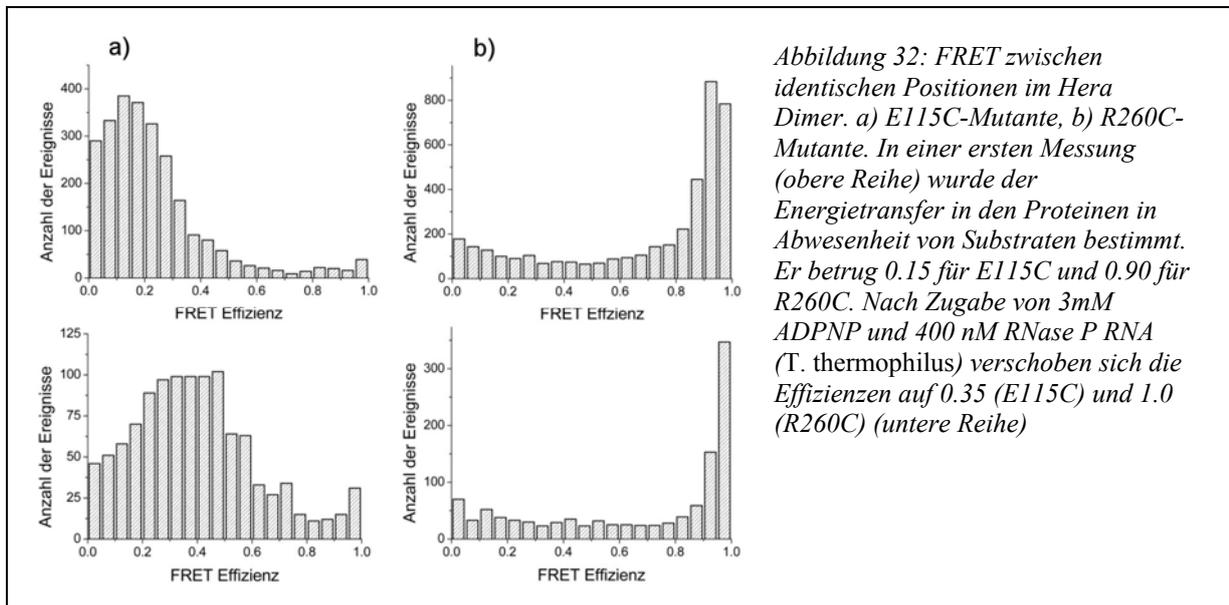
Wie schon unter 4.2.2 erläutert, führt die dimere Struktur zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Einzelmolekülexperimente. Um eine möglichst eindeutige Aussage über die Transfereffizienz und somit über den intramolekularen Abstand der Farbstoffe zueinander treffen zu können, sollten an ein Molekül jeweils nur ein Donor- und ein Akzeptorfarbstoff gekoppelt sein (Abbildung 31). Im günstigsten Fall könnte sogar beeinflusst werden, an welcher Position Donor und an welcher Akzeptor gebunden ist. In Hera ist dies nicht möglich, da die Cysteine an den Positionen E115C und R260C beide leicht zugänglich für die Fluorophore sind und schnell (< 1 min) mit deren Maleimiden reagieren. Der Transfer kann

also von der N-terminalen Domäne in Richtung der C-terminalen Domäne stattfinden oder umgekehrt, was bei der Bestimmung der Korrekturparameter berücksichtigt wurde.



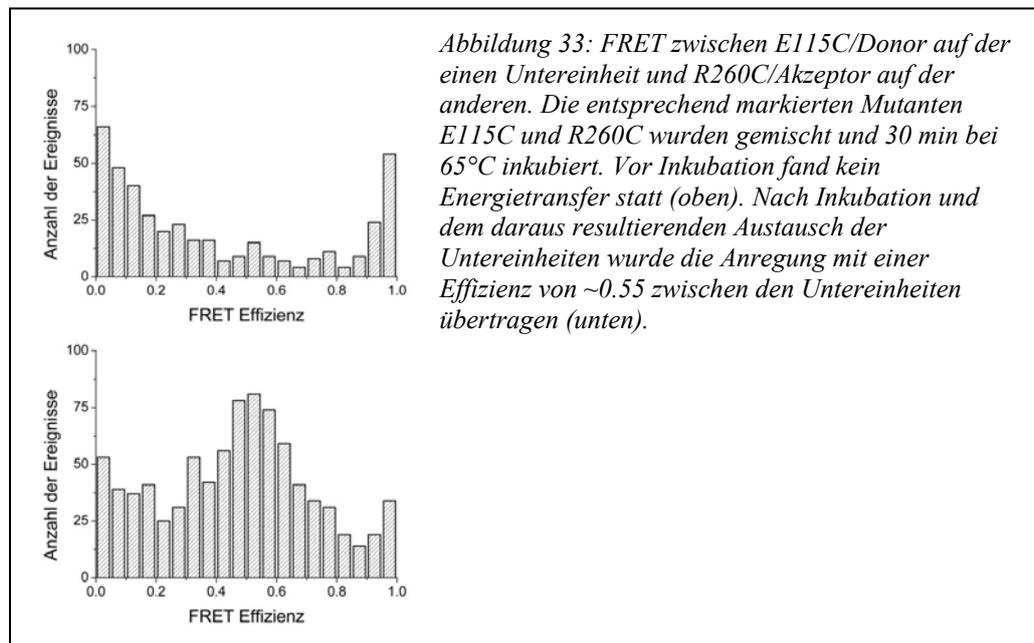
Ist das zu untersuchende Protein wie im vorliegenden Fall ein Dimer sind vier markierbare Cysteine statt zweien vorhanden. Hierdurch ergeben sich bei einem statistisch markierten Protein eine Vielzahl von Transfermöglichkeiten: Innerhalb der monomeren Untereinheiten, zwischen identischen Positionen auf den Untereinheiten (z.B. von E115C auf E115C) oder von der N-terminalen Position der einen Untereinheit auf die C-terminale Position der anderen Untereinheit und umgekehrt (Abbildung 31). Ist hierzu noch eine gewisse Flexibilität durch die Art der Dimerisierungsdomäne gewährleistet und verändert sich die FRET-Effizienz aufgrund einer Konformationsänderung durch Substratzugabe, ist es sehr schwierig, die Messungen hinreichend genau zu interpretieren. Deshalb sollte der Einfluss der einzelnen Transferereignisse mit den folgenden Experimenten genauer untersucht werden.

#### 4.4.1 Der Energietransfer zwischen den Fluorophoren auf identischen Positionen innerhalb der monomeren Untereinheiten



In einem ersten Schritt sollte der Energietransfer untersucht werden, der im Dimer zwischen zwei Fluorophoren stattfindet, welche entweder beide an das Cystein an Position E115, bzw. R260 gekoppelt sind. Hierzu wurden die entsprechenden Cysteinmutanten statistisch mit einem Gemisch aus Donor- und Akzeptorfarbstoff markiert und die Donor/Akzeptorfluoreszenz gemessen. In Abwesenheit von Substraten findet in beiden Fällen FRET statt. Die Transfereffizienz zwischen den beiden Farbstoffen an E115C beträgt 0.35, für die Farbstoffe an R260C 0.90. Nach der Kristallstruktur von Hera (Klostermeier et al., 2008) war zu erwarten, dass die Fluorophore an R260C nahe beieinander liegen, sie befinden sich im C-terminalen Teil des *core* in der Nähe des Dimerisierungsmotivs. Die Farbstoffe an E115C hingegen liegen im N-terminale Teil und sind durch die Flexibilität des *linker* in der Helikasedomäne und des Dimerisierungsmotivs weiter voneinander entfernt. Dies wurde hier bestätigt. Um zu überprüfen, ob sich auch hier eine Konformationsänderung nach Substratzugabe zu beobachten ist, wurden den Proteinen 400 nM RNase P RNA (*T. thermophilus*) und 3 mM ADPNP zugegeben. Im Fall der E115C-Mutante wurde eine Verschiebung der FRET-Effizienz von 0.15 auf ~0.35 beobachtet, bei der R260C-Mutante von 0.90 auf 1.0 (Abbildung 32).

#### 4.4.2 Der Energietransfer zwischen dem N-terminalen Fluorophor einer Untereinheit und dem C-terminalen Fluorophor der anderen Untereinheit.

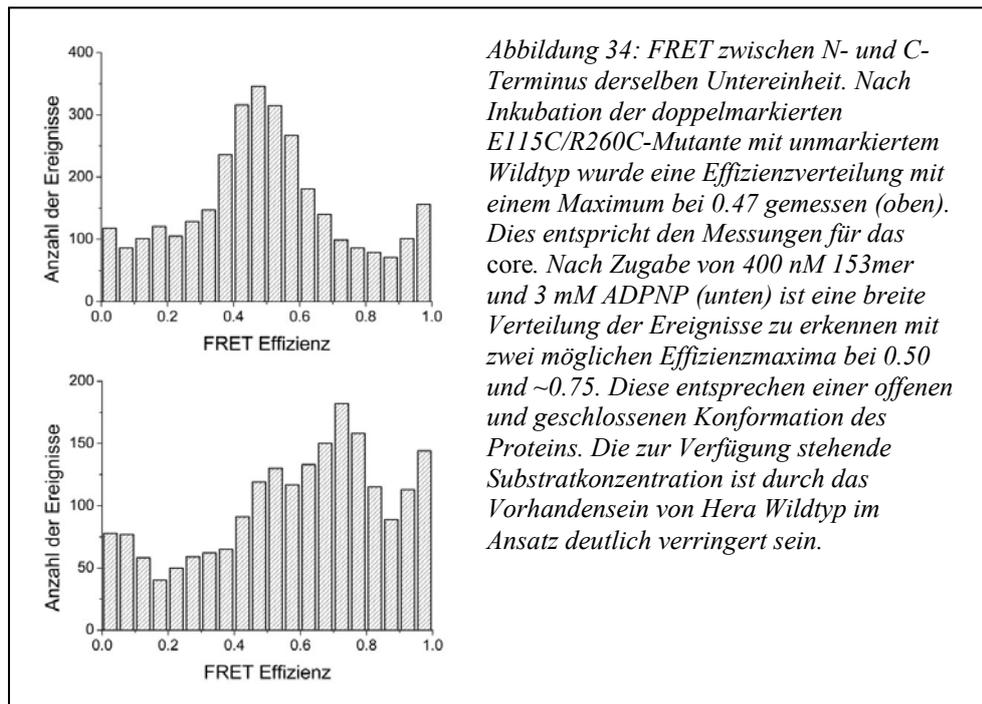


Nachdem in einem ersten Schritt der Energietransfer zwischen den Fluorophoren auf identischen Positionen beider Untereinheiten bestimmt wurde, sollte nun der Transfer vom N-Terminus der einen Untereinheit auf den C-Terminus der anderen untersucht werden. Hierzu wurden mit Donor markierte E115C-Mutante und mit Akzeptor markierte R260C-Mutante im gleichen molaren Verhältnis gemischt, 30 min bei 65°C inkubiert und vor der Messung auf Eis gekühlt. Vor und nach Inkubation wurde die Donor/Akzeptorfluoreszenz gemessen. (Abbildung 33). Vor der Inkubation fand kein Austausch der Untereinheiten statt, daher ist auch kein FRET zu beobachten. Nach der Inkubation sind FRET-Ereignisse mit einer Effizienz von ~0.55 zu erkennen. Es wurden also Untereinheiten ausgetauscht, welche ein neues Dimer bildeten, mit einem an E115C gekoppelten Donorfarbstoff auf der einen Untereinheit und einem an R260C gekoppelten Akzeptorfarbstoff auf der anderen.

#### 4.4.3 Der Energietransfer zwischen dem N-terminalen und C-terminalen Fluorophor innerhalb einer Untereinheit

Um den Transfer innerhalb einer Untereinheit bestimmen zu können, darf keinerlei Interaktion mit Fluorophoren auf der anderen Untereinheit stattfinden. Da es bisher keinerlei Möglichkeit gab, dass Dimer in seine monomeren Untereinheiten zu trennen, wurde die

statistisch markierte Doppelcysteinmutante E115C/R260C mit unmarkiertem Hera Wildtyp 2 h bei 65°C inkubiert. Durch einen Überschuss des Wildtyps sollte gewährleistet werden, dass am Ende der Inkubation fast ausschliesslich ein Dimer vorlag, dessen eine Untereinheit N- und C-terminal ein Fluorophor trug, während die andere Untereinheit unmarkiert war. Wenn es sich bei den Farbstoffen um ein Donor- und ein Akzeptorfluorophor handelte, sollte FRET zu beobachten sein. Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse nach der Inkubation in Abwesenheit von Substraten und nach Zugabe von 400 nM 153mer und 3mM ADPNP. Ohne Substrate



zeigt das Histogramm eine Transferverteilung mit einer mittleren Effizienz von 0.47. Dieser Wert entspricht der FRET-Effizienz, die für das core bestimmt wurde (vgl. 4.2.2.2), welches durch das Fehlen des verlängerten C-Terminus mit der Dimerisierungsdomäne als Monomer vorliegen sollte. Eine Verschiebung der FRET-Effizienz auf den niedrigeren Wert durch die zweistündige Inkubation konnte durch eine Kontrolle ausgeschlossen werden, bei der nur das markierte Protein ohne Wildtyp 2 h bei 65 °C inkubiert wurde. Diese Messung zeigte wie bei den bisherigen Messungen mit der doppelmarkierten Doppelcysteinmutante von Hera eine Verteilung mit einem Maximum bei 0.66. Nach Substratzugabe waren die Ereignisse weit über die verschiedenen Effizienzen verteilt. Zu erkennen sind mögliche Maxima bei einer FRET-Effizienz von 0.50, was bedeuten könnte, dass noch Protein in einer geschlossenen Konformation vorliegt und einer FRET-Effizienz von ~0.75, welche aktiviertem Dimer in einer geschlossenen Konformation entspräche. Diese Verteilung kann dadurch erklärt werden, dass sich nach der erfolgten Inkubation noch ein Überschuss an Hera Wildtyp in der

Messlösung befindet, welches ebenfalls an die Substrate bindet und somit die zur Verfügung stehende Konzentration für das markierte Protein verringert.

#### **4.4.4 Die bevorzugte Bindung der Fluorophore an E115C und R260C in Hera**

In Hera werden Cysteine an den Positionen E115 und R260 innerhalb von weniger als 1 min an die Farbstoffe gekoppelt. Es ist daher unmöglich, die Positionen sequentiell zu markieren. Stattdessen erfolgt die Markierung statistisch und es ist unmöglich vorherzusagen, welche Position ein Donor-, welche ein Akzeptorfluorophor trägt. Dennoch kann im vorliegenden Fall zumindest eine gewisse Tendenz für die Markierung vorhergesagt werden. Bei der Markierung der R260C-Mutante mit einem Gemisch aus Donor und Akzeptor wurde der Akzeptor offensichtlich schneller an das Cystein gebunden. Bei dieser Markierung musste das Verhältnis Donor/Akzeptor stark in Richtung des Donors verschoben werden (10 x mehr Donor als Akzeptor), um vergleichbare Markierungseffizienzen wie bei der Doppelcysteinmutante für beide Farbstoffe zu erhalten.

Die E115C-Mutante hingegen neigte zur Präzipitation, wenn höhere Konzentrationen (mehr als das fünffache der Proteinkonzentration) des Akzeptors eingesetzt wurden.

Da die Markierungseffizienz für die Doppelmutante E115C/R260C am besten mit einem 8 x Überschuss Donor und einem 10 x Überschuss Akzeptor war, kann aufgrund der vorangegangenen Beobachtungen vermutet werden, dass bei diesem Farbstoffverhältnis Donor bevorzugt an E115C und Akzeptor an R260C gebunden ist. Ein Experiment, welches diese Hypothese bestätigt, fehlt allerdings. Ein mögliches Kontrollexperiment ist ein gezielter proteolytischer Verdau des doppelmarkierten Proteins. Nach erfolgter Gelelektrophorese kann die Fluoreszenz der Farbstoffe an den Fragmenten gezielt angeregt werden. Hierdurch kann eine Präferenz der Fluorophore für die Bindung an ein spezifisches Cystein in Hera abgeleitet werden.

#### **4.4.5 Die Stabilität des Dimers**

Aus den vorangegangenen Versuchen war bekannt, dass das Hera Dimer eine aussergewöhnlich hohe Stabilität aufweist und erst bei längerer Inkubation bei 65°C dissoziiert. Um die Dissoziationskonstante abschätzen zu können wurde Hera Wildtyp mit der gleichen Konzentration eines Fragments, bestehend aus den Aminosäuren 208-419, gemischt und 2 h bei 65°C inkubiert. Das Fragment enthält die Dimerisierungsdomäne. Die Bildung

eines Heterodimers aus dem Protein voller Länge und dem Fragment ist daher möglich. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 und 120 min wurden Aliquots entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden dann mittels analytischer Grössenausschlusschromatographie (Säule: S200, 10-600 kDa) analysiert. Hera Wildtyp eluierte mit einem apparentem Molekulargewicht von 118 kDa, das Fragment mit den Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 35 kDa. Beide Werte entsprechen den aus der Sequenz errechneten Molekulargewichten für die jeweiligen Dimere (Wildtyp: 112 kDa, Fragment: 46 kDa). Nach einer Inkubation von 10 min und mehr eluiert noch eine dritte Proteinspezies mit einem Molekulargewicht von 70 kDa. Es handelt sich hierbei um das Heterodimer mit einem errechneten Molekulargewicht von 79 kDa. Die drei Proteine eluierten in einem Abstand von lediglich 1.3 Minuten. Daher waren die Absorptionskurven nicht voneinander getrennt und eine quantitative Auswertung des Anteils einer Spezies an der Gesamtproteinmenge nicht möglich. Eine Verringerung der eingesetzten Proteinmenge, sowie die Verwendung einer Säule mit unterschiedlichem Ausschlussvolumen (S75, 3-70 kDa) verbesserte die Trennung nicht. Eine Austauschkinetik konnte daher nicht erstellt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Hera ist eine vollständig funktionale Helikase

10 Jahre vor dem Verfassen der vorliegenden Arbeit wurde Hera erstmals ausführlicher von Morlang et al. (1999) charakterisiert. In den betreffenden Experimenten zeigte sich, dass Hera eine ATPase-Aktivität aufweist, welche durch RNase P RNA, 16S und, ebenso wie YxiN oder DbpA, 23S rRNA stimuliert werden kann (Kossen & Uhlenbeck, 1999; Fuller-Pace et al., 1993). Eine Entwindungsaktivität der Helikase konnte mit DNA-RNA-Hybriden dokumentiert werden. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass Hera eine Helikase im eigentlichen Sinne ist, es besitzt ATPase- und Entwindungsaktivität. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Eigenschaften detaillierter untersucht.

Der ATP Umsatz von Hera wird durch die Zugabe von unspezifischer (poly U RNA), ribosomaler RNA und RNase P RNA 200-400fach gesteigert. Die Umsatzraten  $k_{\text{cat}}$  im Fliessgleichgewicht lagen hierbei zwischen  $7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  (nicht stimuliert) und  $1.3\text{-}2.6 \text{ s}^{-1}$  (stimuliert). Die apparenten Michaelis-Menten-Konstanten  $K_{\text{M app}}$  für RNA lagen zwischen 30 und 134  $\mu\text{M}$  (Basen). Diese Konstanten sind in der gleichen Grössenordnung wie die der DEAD-box-Helikase YxiN aus *B. subtilis* ( $k_{\text{cat}}$ :  $1.48 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_{\text{M app}}$ : 24  $\mu\text{M}$  Basen, stimuliert durch 153mer der 23 S rRNA, Theissen et al., 2008). DbpA aus *E. coli* zeigt mit  $k_{\text{cat}} = 10 \text{ s}^{-1}$  und  $K_{\text{M app}} = 1.5 \mu\text{M}$  Basen eine höhere Wechselzahl (Tsu & Uhlenbeck, 1998), wenn es durch 23 S rRNA stimuliert wird. *Thermus thermophilus* ist ein Organismus, der bei 75°C aktiv ist, deswegen wird für Hera ein Temperaturoptimum im gleichen Temperaturbereich erwartet. Obwohl bei dieser Bestimmung des RNA-stimulierten ATP-Umsatzes von Hera bei 37°C unterhalb des Temperaturoptimums gemessen wurde, sind die Umsatzraten mit anderen DEAD-box Helikasen vergleichbar. Daraus lässt sich schliessen, dass Hera auch bei Temperaturen unterhalb des Temperaturmaximums aktiv ist und weitere Versuche ebenfalls bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden können. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da die Versuchstemperatur in vielen Experimenten limitiert ist. So sind Einzelmolekülmessungen bei Temperaturen über Raumtemperatur nur mit einer heizbaren Probenkammer möglich. In den Entwindungstests trennen sich die Stränge des Minimalsubstrats bei Temperaturen über 25°C:

In Messungen der Wechselzahl unabhängig von der RNA-Konzentration liess sich keine Kooperativität im niederen  $\mu\text{M}$  Konzentrationsbereich beobachten. Dies bedeutet, dass die Untereinheiten im Dimer unabhängig voneinander ATP hydrolysieren.

Um den ATP-Umsatz auch bei höheren Temperaturen bestimmen zu können, wurden Einzelumsatzexperimente mit isomolaren Konzentrationen von Hera und ATP durchgeführt, welche nicht von der Thermostabilität von Hilfsenzymen abhängig sind. Erstaunlicherweise fielen die Umsatzraten in Messungen von Einzelumsätzen bei 37°C mit  $2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (unstimuliert) und  $4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (stimuliert, poly U RNA) deutlich niedriger als die Umsatzraten im Fließgleichgewicht aus. Dies mag zum einen an dem möglichen Vorhandensein einer Kontamination der Proteinstammlösungen liegen, die eine Disproportionierungsreaktion von ADP zu ATP und AMP katalysiert. In diesem Fall könnte durch die Rückbildung von ATP die gemessene Konzentrationsabnahme des Nukleotids langsamer ausfallen. Dieser Effekt kommt in diesen Experimenten wegen der höheren Proteinkonzentration von 100-140  $\mu\text{M}$  (vgl. 100 nM–1  $\mu\text{M}$  im Fließgleichgewicht) verstärkt zum Tragen. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Größenordnungen der Umsatzkonstanten könnte die vermutlich geringe Affinität von Hera zu ATP sein. Das bedeutet, dass andere Schritte als nur die Hydrolyse zur Umsatzrate beitragen, z.B. die Bindung des Nukleotids. Die Bindungsaffinität für ATP konnte zwar nicht bestimmt werden, betrug aber für ADP  $K_d \text{ ADP} = 60 \mu\text{M}$  und für die nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga ADPNP und  $K_d \text{ ADPCP ADPNP} \sim 200 \mu\text{M}$ . Geht man davon aus, dass die  $K_d$  für ATP im gleichen Bereich liegt wie für ADPNP und ADPCP, so ist sie vergleichbar mit den Werten für die Dissoziationskonstanten für YxiN/ATP (346  $\mu\text{M}$ , Karow et al., 2007) und DbpA/ATP (400  $\mu\text{M}$ , Talavera & De La Cruz, 2005). Dies spricht für eine Beteiligung der Bindung an der Umsatzrate. Bei einer Erhöhung der Versuchstemperatur auf 65°C aggregierte das Protein in den Ansätzen, es konnten daher keine Umsatzraten bestimmt werden.

Zusätzlich zu der ATPase-Aktivität von Hera wurde die Entwindungs-Aktivität bestimmt. Als RNA-Substrat diente hierzu ein 32 Basen langes Fragment der 23 S rRNA mit *hairpin 92*, welches mit einem 9 Basen Strang hybridisiert wurde, wodurch sich ein kurzer doppelhelikaler Bereich neben der Stamm-Schleifen-Struktur von *hairpin 92* ausbildete (32/9mer). Ein 153 Basen langes Fragment der 23 S rRNA wird von der Helikase YxiN mit einer Affinität von  $K_d=2 \text{ nM}$  gebunden (Kossen & Uhlenbeck, 1999). Die  $K_d$  für die Bindung des 32/9mer an Hera liegt mit 350 nM 125mal höher als bei YxiN, wobei zu bedenken ist, dass sich die Bindungsaffinitäten für das 153mer und das kleinere 32/9mer durchaus unterscheiden können und die verwendete Temperatur in den Anisotropietitrationen mit Hera und dem Minimalsubstrat von 25°C nicht im Temperaturoptimum des thermophilen Proteins lag. Bei einer höheren Temperatur aber wären die Bindungen zwischen dem 32mer mit *hairpin* und dem 9mer mit Fluoreszenzmarker getrennt worden und eine Veränderung der

Anisotropie nicht mehr messbar gewesen. Mit dem hybridisierten Substrat konnte die Entwindungsaktivität von Hera untersucht werden. Hera entwindet den Doppelstrang mit einer Umsatzrate  $k$  von  $1.2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Dies entspricht in etwa dem Umsatz von ATP in den Einzelumsatzexperimenten. Der ATP-Umsatz mit der vergleichbaren 153mer rRNA im Fliessgleichgewicht liegt hingegen um etwa den Faktor 100 höher. Sowohl bei den ATPase-Messungen im Fliessgewicht oder Einzelumsatz betrug die Versuchstemperatur  $37^\circ\text{C}$ , in den Entwindungstests  $25^\circ\text{C}$ , was die Vergleichbarkeit der Umsatzzaten zusätzlich erschwert. Unter den verwendeten Bedingungen werden pro Entwindungsreaktion 100 Moleküle ATP hydrolysiert. Dies steht im Gegensatz zu der Aussage von Chen et al. (2008), dass die Hydrolyse nur eines ATPs für die Entwindung einer 6 Basen langen Duplex ausreicht. Diese vermeintlich schwache Kopplung von ATP-Hydrolyse und Entwindung ist aber unter Umständen durch die niedrige Versuchstemperatur zu erklären.

## **5.2 Hera wechselwirkt mit poly U RNA, RNase P RNA und ribosomaler RNA**

Nach dem prinzipiellen Nachweis der Stimulierung der ATPase-Aktivität von Hera durch RNA-Substrate und der Entwindungs-Aktivität stellte sich die Frage, welche Nukleinsäuren in der Lage sind, Hera zu aktivieren. Als Kriterium diente hierbei die Konformationsänderung der Helikase durch Substratzugabe. Theissen et al. zeigten 2008 mittels konfokaler Einzelmolekülexperimente an YxiN, dass die Helikase in Gegenwart von ATP oder RNA eine flexible offene Konformation der Helikasedomäne einnimmt. Nur wenn beide Substrate vorhanden sind und an YxiN binden, kommt es zu einer definierten Konformationsänderung, der Spalt zwischen der N- und der C-terminalen Domäne schliesst sich. Für Hera wurde eine umfangreiche Anzahl verschiedener RNAs und DNAs auf diese Weise getestet. Die Fluoreszenz einer Donor/Akzeptor-markierten Cysteinmutante (E115C/R260C) von Hera wurde zusammen mit den entsprechenden Nukleinsäuren und ADPNP gemessen. In Gegenwart von aktivierenden Substraten nahm Hera eine geschlossene Konformation ein und es zeigte sich eine Verschiebung der FRET-Effizienz zu einem höheren Wert. Blieb diese Verschiebung aus, so konnte davon ausgegangen werden, dass Hera das Substrat nicht binden konnte oder nach Bindung keine Aktivierung erfolgte. Wie bei YxiN änderte sich die Konformation nur in Gegenwart von Nukleinsäure und ADPNP, nicht bereits in Anwesenheit eines der beiden Substrate.

Die Substrate liessen sich in fünf Klassen einteilen: unspezifische, ribosomale, RNase P RNA, tRNA und DNA. Keine der DNAs und tRNAs waren in der Lage, Hera zu aktivieren.

Hingegen nahm Hera in Gegenwart aller RNase P RNAs eine geschlossene Konformation ein. RNase P RNAs lassen sich in 2 unterschiedliche Typen unterteilen, A und B (Brown et al., 1996; Haas et al., 1996). Diese Typen prozessieren vergleichbar effektiv Vorläufer tRNAs, unterscheiden sich aber in ihrer Sekundärstruktur. Beide Typen der RNase P RNA lassen sich in eine substratbindende und eine katalytische Domäne aufteilen. (Loria & Pan, 1996). Hera wurde durch Typ A (*T. thermophilus*, *E. coli*) und Typ B (*B. stearothermophilus*) RNase P RNA aktiviert. Im Falle der Typ A RNAs aktivieren auch die einzelnen Domänen. Hera bindet also nicht ausschliesslich Typ A oder B RNAs, trotz deren unterschiedlicher Sekundärstruktur. Eine spezifische Bindungsstelle scheint demnach nicht vorhanden zu sein. Dies wird auch durch Konkurrenzexperimente mit RnpA aus *E. coli* bestärkt. An Hera gebundene RNase P RNA konnte nicht mit einem Überschuss RnpA von Hera verdrängt werden. In einem anderen Experiment hingegen erfolgte eine Konformationsänderung von Hera, wenn ein präinkubierter Komplex aus RnpA und RNase P RNA zugegeben wurde. Dies lässt mehrere Interpretationsmöglichkeiten zu: Zum einen kann die Bindungsaffinität von Hera für RNase P RNA höher sein, als die von RnpA. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass Hera und RnpA an unterschiedliche Bereiche in der RNase P RNA bindet. Dadurch entsteht ein ternärer Komplex aus Hera-RNA-RnpA. Möglich wäre, dass Hera unspezifisch an eine der zahlreichen Stamm-Schleifen-Strukturen unterschiedlicher Länge in den Domänen der RNase P RNAs bindet. Diese Hypothese wird durch die Messungen mit ribosomaler RNA als Substrat ergänzt. Von diesen aktivierten nur diejenigen Oligonukleotide, die *hairpin* 92 der 23S rRNA (*B. subtilis*) enthielten und eine Länge von 153, 32 und 30 Basen hatten. Das 32 und 30mer weisen zusätzlich zu dem *hairpin* einen einzelsträngigen Bereich in 5' Richtung auf. Im Falle des 32mers konnte dieser noch mit einem 9 Basen Fragment hybridisiert werden. Auch dieses 32/9mer aktivierte Hera. Wird das Substrat jedoch auf den *hairpin* ohne flankierende einzel- oder doppelsträngige Bereiche verkürzt (19mer), bleibt die Aktivierung aus. Dies gilt auch für das 9mer allein. Hera benötigt zur Aktivierung folglich ein RNA-Substrat, welches neben einer Stamm-Schleifen-Struktur noch flankierende einzel- oder doppelsträngige Bereiche besitzt. Eine *hairpin*-Struktur alleine genügt demnach nicht. Dies zeigte auch eine Messung mit einem tRNA-*hairpin*. Um die Determinanten für die Bindung und Aktivierung in der RNA zu definieren, wurden Sequenz und Länge der Stamm-Schleifenstruktur des 32 Basen RNA-Substrats verändert. Wie das 32/9mer konnten auch diese Substrate, nachdem sie mit dem 9mer hybridisiert wurden, von Hera entwunden werden. Länge und Sequenz einer des Stamms oder der Schleife sind demnach nicht die

Determinanten für die RNA-Erkennung. Dies spricht für eine spezifische Wechselwirkung von Hera mit RNase P RNA und ribosomaler RNA.

Die Experimente von Morlang et al. (1999) und die Kristallstruktur von Hera (Klostermeier & Rudolph, 2009) zeigen eine mögliche Lage der RNA-Bindedomäne von Hera im Bereich der 140 C-terminalen Aminosäuren. Dieser Abschnitt enthält das vermeintliche RNase P RNA-Bindungsmotiv und die Dimerisierungsdomäne.

Wird in Hera dieser Bereich (C-terminale Domäne, CTD) durch Deletion entfernt, verändern sich die Eigenschaften der verbleibenden Helikasedomäne (*core*) drastisch. Die ATP-Hydrolyse wird nur noch durch poly U RNA stimuliert, wenn auch 10-20mal langsamer als der Wildtyp (Experimente im Fließgleichgewicht). Dieser Befund wurde auch in den Einzelmolekülmessungen bestätigt: Ausschliesslich poly U RNA war in der Lage, eine Konformationsänderung des *core* zu bewirken, ribosomale oder RNase P RNA waren hierzu nicht in der Lage. Auch zeigte das *core* keine Helikase-Aktivität mehr. Die Deletion der CTD führt also zu einem Verlust der Substratspezifität, poly U RNA wechselwirkt möglicherweise unspezifisch mit dem *core*.

Komplementationsexperimente zeigen, dass *in trans* zum *core* gegebene CTD die Aktivierung durch ribosomale RNA nicht wiederherstellen konnte. Für die volle Funktionalität muss die C-terminale Domäne kovalent mit dem *core* verknüpft sein.

Ist hiermit schon nachgewiesen, dass die spezifische Substraterkennung in Hera über Erkennungsmotive im deletierten C-terminalen Bereich vermittelt wird? Auch wenn dies sehr wahrscheinlich bleibt, ist die Schlussfolgerung nicht zwingend korrekt. Es konnte gezeigt werden, dass Hera möglicherweise auch in seiner physiologischen Form als Dimer vorliegt (Klostermeier & Rudolph, 2009). Diese Arbeit zeigte stabile Dimere auch noch bei pM Konzentrationen und ein Austausch der Untereinheiten erforderte lange Inkubationszeiten des Dimers bei 65°C. Da Hera aus einem thermophilen Organismus stammt, ist die Frage noch ungeklärt, ob bei den physiologischen Umweltbedingungen die monomere oder dimere Form überwiegt. Geht man davon aus, dass die aktive Form von Hera ein Dimer ist, so könnte der Verlust der Substratspezifität mit dem Verlust der Dimerisierungsdomäne einhergehen.

Um die Rolle der C-terminalen Domäne für die ATPase-Stimulation, RNA-Bindung und Helikaseaktivierung einzugrenzen, wurde in einem nächsten Schritt die Rolle des vermeintlichen RNase P RNA Bindungsmotivs in  $\alpha$ -Helix 15 ( $\alpha$ 15) gezielt untersucht. Hierzu wurden in Hera die drei Arginine R378, R383 und R386 gegen Alanine ausgetauscht (RNase P RNA Motivmutante, RPM). Drei konservierte Arginine sind auch im RNase P RNA-

Bindungsmotiv bakterieller RnpAs zu finden und vermitteln die RNA-Bindung in der RBD (Jovanovic et al., 2002)

Zuerst wurde bei der RPM die ATPaseaktivität im Fließgleichgewicht mit der des Wildtyps verglichen. Die Ratenkonstanten  $k_{cat}$  lagen mit  $1.4 \text{ s}^{-1}$  für die 153mer rRNA im identischen Bereich, mit  $1.0 \text{ s}^{-1}$  für die RNase P RNA (*T. thermophilus*) leicht unter dem Wert des Wildtyps ( $1.3 \text{ s}^{-1}$  für 153mer,  $1.8 \text{ s}^{-1}$  für RNase P RNA). Die Stimulation der ATP-Hydrolyse ist also durch die Mutation nicht nennenswert beeinträchtigt.

Dasselbe gilt auch für die Aktivierung der RPM durch verschiedene RNA-Substrate. Die Mutante nimmt in Gegenwart von poly U RNA, 153mer, 32mer und RNase P RNA eine geschlossene Konformation ein, genauso wie die wildtypische Doppelcysteinmutante E115C/R260C. Im Falle der RNase P RNA sind ebenfalls schon niedrige Konzentrationen ausreichend (50 nM). Das 32/9mer Doppelstrangsubstrat wird von der RPM ebenfalls entwunden. Eine Mutation dieses Motivs hat keinen Effekt auf ATPase-Aktivität, spezifische Substratbindung und Entwindung.

Betrachtet man den strukturellen Kontext des vermeintlichen RNase P RNA Bindemotivs von Hera mit dem Bindemotiv in RnpA, so fallen deutliche Unterschiede auf. Während der C-Terminus von Hera in diesem Bereich strikt  $\alpha$ -helikal gefaltet ist, bestehen RnpAs aus einer Mischung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern (Stams et al., 1998, Kazantsev et al., 2003). Die begrenzte Übereinstimmung der Sequenzen könnte also durchaus zufällig sein.

Es ist im Rahmen dieser Arbeit leider nicht gelungen, definierte Bereiche der C-terminalen Domäne einzugrenzen, welche für die Erkennung und Bindung von RNA essentiell sind. Neben der Rolle des verlängerten C-Terminus wurde auch der Einfluss von Mutationen in Motiv I (Walker A) und III (SAT) untersucht. Motiv I ist essentiell für die ATPase- und Helikaseaktivität. Mutationen des konservierten Alanins, Lysins oder des letzten Threonins verringern die Affinität und Hydrolyserate von ATP (Rozen et al., 1989; Blum et al., 1992; Pugh et al, 1999; Caruthers & McKay, 2002; Cordin et al., 2004). In Hera wurde das Lysin an Position 52 gegen Glutamin ausgetauscht. Diese Mutante ziegte keine ATP-Hydrolyse, die Mutante ist ebenfalls hydrolysedefizient.

Motiv III verbindet die ATP-Hydrolyse mit der RNA-Entwindung und reagiert auf die Anwesenheit von  $\gamma$ -Phosphaten (Caruthers and McKay, 2002). Durch Mutageneseexperimente an der Helikase Has1p aus Hefe, in denen das Serin und das Threonin des Motivs durch Alanine ersetzt wurden, ging hervor, dass hierdurch die ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung nur schwach beeinträchtigt werden. Die Entwindungsaktivität hingegen ist durch die Mutationen, vor allem den Threoninaustausch stark verringert und beträgt 20-30% der

Wildtypaktivität (Rocak et al., 2005). Der Initiationsfaktor eIF4a und die DexH-box Helikasen NPH-II und Prp22p verlieren bei gleichzeitigem Austausch des Threonins und des Serins (Threonin bei NPH-II) ihre Entwindungs-Aktivität vollständig (Pause & Sonenberg, 1992; Gross & Shuman, 1998), bzw. entwinden lediglich mit weniger als 10% der Wildtypaktivität (Schwer & Meszaros, 2000).

In Hera wurden im SAT-Motiv Serin und Threonin durch Alanine ersetzt. Diese Mutante wird durch poly U RNA, 153mer rRNA und RNase P RNA aktiviert und entwindet das 32/9mer. Im Vergleich mit Hera Wildtyp ist die Entwindung um ca. das Dreifache langsamer. Die Entwindungsaktivität scheint also nicht so stark beeinträchtigt zu sein, wie bei eIF4A, NPH-II und Prp22p. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Diskrepanz der Entwindungsgeschwindigkeit von Hera Wildtyp und der SAT-Mutante im Temperaturoptimum grösser ist. Vergleichbare Messungen mit YxiN aus *B. subtilis* weisen ebenfalls eine ähnliche Verminderung der Entwindungsgeschwindigkeit auf (Karow & Klostermeier, 2009). Die Verlangsamung der Entwindung bei Hera könnte theoretisch auch auf die eingeführten Cysteine an Position E115 und R260 zurückzuführen sein. Allerdings hydrolysiert die RPM, welche ebenfalls diese Cysteine enthält, mit vergleichbarer Geschwindigkeit ATP wie der Wildtyp. Dies ist ein Indikator dafür, dass das Ersetzen der Aminosäuren durch Cysteine an diesen Positionen keinen Einfluss auf die Aktivität hat.

Die tatsächliche Rolle von Hera *in vivo* ist weiterhin ungeklärt. Für das DEAD-box Protein CYT-19 aus *Tetrahymena thermophila* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es an fehlerhaft gefaltete Ribozyme binden kann und dort die Ausbildung des korrekten Faltungszustandes beschleunigt. Zusätzlich entwindet es die P1 Duplex, welche sich zwischen dem Ribozym und dessen Oligonukleotidsubstrat befindet. CYT-19 fungiert daher als ein Chaperon, welches unspezifisch an RNA-Strukturen bindet und nahegelegene helikale Bereiche entwindet. (Tijerina et al., 2006). Dies bestärkt die Vermutung, dass viele DEAD-box Helikasen nicht bestimmte Strukturen ihrer RNA-Substrate erkennen, vielmehr ist die Entwindungseffizienz von der Zugänglichkeit dieser Strukturen abhängig (Chu & Herschlag, 2008). Die CTD von Hera weist zwar keine Ähnlichkeit mit den basisch hydrophilen CTDs bekannter RNA-Chaperone wie CYT-19 oder Mss116p auf (Linden et al., 2008), trotzdem wäre eine Funktion als Chaperon vorstellbar.

### 5.3 Hera ist ein stabiles Dimer

In einer dimeren Doppelcysteinmutante stehen insgesamt vier statt zwei Cysteine für die Markierung zur Verfügung, je zwei identische in den N-terminalen und C-terminalen RecA-Domänen. Dies hat Konsequenzen für die Interpretation der Ergebnisse aus den Einzelmolekülmessungen, welche im Folgenden erläutert werden sollen. Obwohl bei einer statistischen Markierung von Hera mit Donor- und Akzeptorfluorophoren eine gewisse Präferenz vermutet wird, dass der Donor eher N-terminal, der Akzeptor eher C-terminal gebunden wird, so tragen doch alle Transfermöglichkeiten zu der Gesamtheit der Ereignisse in den errechneten Histogrammen bei. Möglichkeiten für Energietransfer sind: Zwischen Fluorophoren an den gleichen Stellen in unterschiedlichen Untereinheiten (E115C-E115C, R260C-R260C), vom N-terminal gekoppelten Fluorophor einer Untereinheit auf das C-terminal gekoppelte Fluorophor der anderen Untereinheit (und *vice versa*) und zwischen den N-terminal und C-terminal gekoppelten Fluorophoren einer Untereinheit. Die einzelnen Transfermöglichkeiten wurden mit verschiedenen Mutanten von Hera untersucht. Die dimeren Einzelcysteinmutanten E115C (2 x E115C) und R260C (2x R260C) wurden jeweils mit Akzeptor und Donor doppelmarkiert. Sowohl im Falle der an E115C-E115C, als auch der an R260C-R260C gekoppelten Fluorophore fand Energietransfer statt. Durch Inkubation bei 65°C über mindestens 20 min konnten die Untereinheiten der markierten E115C- und R260C-Mutanten ausgetauscht werden, wodurch der Transfer zwischen dem N-terminal gekoppelten Fluorophor einer Untereinheit auf das C-terminal gekoppelte Fluorophor der anderen Untereinheit bestimmt werden konnte. Den Transfer innerhalb einer Untereinheit konnte man bestimmen, wenn die doppelmarkierte Doppelcysteinmutante E115C/R260C mit einem Überschuss Hera Wildtyp inkubiert wurde. Hierdurch entstand ein Heterodimer, dessen eine Untereinheit Donor- und Akzeptorfarbstoffe trug, die andere hingegen nicht. Interessanterweise lag das Maximum der Transfereffizienz hier bei 0.48, nicht bei 0.68 wie für die doppelmarkierte Doppelcysteinmutante. Dieser Wert entspricht dem für das *core* gemessene, welches durch das Fehlen der Dimerisierungsdomäne als Monomer vorliegt. Man kann hieraus schliessen, dass die Transfer-Effizienz im Heterodimer tatsächlich den Energietransfer zwischen den Fluorophoren einer Untereinheit widerspiegelt.

Welchen Einfluss hat die Vielzahl dieser Transfer-Möglichkeiten auf die Schlussfolgerungen aus den Einzelmolekülmessungen zur Aktivierung von Hera und dessen Mutanten? Bei allen Mutanten von Hera zeigte sich nach Substratzugabe eine Verschiebung zu einer höheren FRET-Effizienz, wenn ein Nukleinsäuresubstrat die jeweilige Mutante aktivieren konnte. In

den Messungen lagen Hera E115C/R260C, sowie RPM und SAT-Mutante als Dimer, das *core* wegen der fehlenden Dimerisierungsdomäne als Monomer vor. Hierbei unterschied sich zwar die Lage der Transfermaxima bei dimerem und monomerem Protein, nach Substratzugabe erfolgte aber in beiden Fällen die Verschiebung zu einer höheren FRET-Effizienz. Auch in den Messungen der einzelnen Transfer-Möglichkeiten konnte diese durch Substratzugabe bedingte Verschiebung für die Messungen mit der doppelmarkierten Einzelcysteinmutante E115C und für das Heterodimer beobachtet werden. Die Änderungen in den FRET-Effizienzen repräsentieren damit tatsächlich die Aktivierung der Helikase, auch wenn mehrere Transferereignisse überlappen.

Man kann bei der statistischen Markierung nicht vorhersagen, welche Art von Fluorophor an welche Position gekoppelt wird, daher kommen die Transfereffekte bei unterschiedlichen Markierungsansätzen auch unterschiedlich stark zu tragen. Die grosse Flexibilität der Untereinheiten im Dimer zueinander erhöht zusätzlich die Varianz der gemessenen FRET-Effizienzen. Tatsächlich sind diese in den Histogrammen für die Doppelcysteinmutante weit verteilt, mit einem Maximum, welches in Abwesenheit von Substraten in einem Bereich von 0.65 bis 0.7 schwankt. Daher sind Aussagen über tatsächliche intramolekulare Abstandsänderungen in der doppelmarkierten Doppelcysteinmutante nur schwer zu treffen.

Hera ist die erste DEAD-box Helikase, deren Kristallstruktur ein Dimer zeigt. Als thermophiles Protein dient die Ausbildung eines Dimers womöglich einer Erhöhung der Thermostabilität. Verwandte Helikasen aus den nahe verwandten Organismen *Deinococcus geothermalis* und *Deinococcus radiodurans* weisen Sequenzen mit grosser Ähnlichkeit zum Dimerisierungsmotiv von Hera auf, obwohl diese Organismen lediglich mesophil bis leicht thermophil sind (Klostermeier & Rudolph, 2009). Dies spricht gegen eine rein stabilisierende Funktion des Dimers.

Die Strukturuntersuchungen an der DExH-box Helikase NS3 des Hepatitis C Virus (HCV) zeigten zwar ein Monomer (Yao et al., 1997), aber neuere Untersuchungen haben ergeben, dass die Helikase Oligomere bilden kann, wobei das Dimer thermodynamisch begünstigt ist (Locatelli et al., 2002). Durch die Dimerisierung werden die Helikase-Aktivität und die Prozessivität kooperativ erhöht (Serebrov & Pyle, 2004; Dumont et al., 2006). In der Diskussion über die *in vivo* Funktion von Hera wurde bereits die Vermutung geäussert, dass Hera möglicherweise ein Chaperon für die korrekte Faltung von RNA-Substraten darstellt. Die Ausbildung eines Dimers könnte Hera dabei helfen, an zwei Stellen gleichzeitig zu entwinden, wenn eine komplexe RNA wie z.B. RNase P RNA gebunden ist.

Geeignete Kontrollexperimente hierzu sind geplant. So könnte z.B. die Dimerisierung von Hera durch den gezielten Austausch von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten im Dimerisierungsmotiv die Ausbildung eines Dimers unterbinden. Mögliche Positionen hierfür sind Valin 411 und Leucin 414 (Klostermeier & Rudolph, 2009). Mit monomeren Hera kann dann die Stimulation des ATP-Umsatzes und Aktivierung durch verschiedene RNA-Substrate, sowie die Entwindung des ribosomalen Minimalsubstrates gemessen und mit dem Wildtyp verglichen werden.

## 6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die ATPase- und Helikase Eigenschaften aufbauend auf den Erkenntnissen von Morlang et al. (1999) detaillierter beschrieben werden.

Die C-terminale Domäne von Hera vermittelt die Dimerisierung der Helikase. Unter der Annahme, dass die Untereinheiten in Hera unabhängig voneinander aktiv sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass Bereiche der C-terminalen Domäne darüber hinaus für die spezifische Erkennung und Bindung von RNA benötigt wird. Welche Motive aber diese Funktionen vermitteln, ist immer noch unklar. Eine Beteiligung des vermeintlichen RNase P RNA-Bindungsmotiv an der RNA-Bindung konnte widerlegt werden. Hier müssen weitere Mutationen der C-terminalen Domäne untersucht werden. Besonders im Bereich der Aminosäuren, welche sich C-terminal der  $\alpha$ 18-Helix und somit der Dimerisierungsdomäne befinden, könnten Bindungsmotive lokalisiert sein.

Zum anderen konnte die Auswahl an möglichen *in vivo*-Nukleinsäuresubstraten zumindest eingeschränkt werden. DNAs und tRNAs aktivieren die Helikase nicht, poly U RNA, RNase P RNAs und rRNAs hingegen schon. Typ und Domäne sind bei den RNase P RNAs nicht entscheidend. Bei den rRNAs aktivierten Substrate mit *hairpin* 92 der 23S rRNA wenn ihre Länge 30 Basen oder mehr betrug. Eine *hairpin*-Struktur alleine ist für die Aktivierung nicht ausreichend, Änderungen in Sequenz und Länge von *hairpin* 92 allerdings beeinträchtigen die Entwindung nicht. Aus all diesen Erkenntnissen kann aber nicht schlussgefolgert werden, welche Rolle Hera im Organismus spielt. Anhand der Substrate, welche Hera aktivieren, wäre eine Beteiligung sowohl bei der ribosomalen Biogenese als bei der Formation und katalytischen Aktivität von Ribozymkomplexen denkbar. Aufgrund der dimeren Struktur von Hera wäre darüber hinaus eine Rolle als Chaperon möglich, welches komplexe RNAs wie RNase P RNA oder ribosomale RNAs bei ihrer korrekten Faltung unterstützt. Ein Stamm von *Thermus thermophilus*, in dem die Produktion von Hera unterbunden ist, könnte die Frage nach der physiologischen Rolle der Helikase klären.

Kristallstrukturen, welche die geschlossene Konformation von Hera mit gebundener RNA in Gegenwart von ADPNP zeigen, werden wichtige Einsichten liefern, ob die Untereinheiten gemeinsam an ein RNA-Molekül binden oder an unterschiedliche und wo in der C-terminalen Domäne Wechselwirkungen mit der RNA stattfinden.

Es sind desweiteren Mutanten von Hera geplant, bei denen Aminosäuren im Dimerisierungsmotiv ausgetauscht werden. Hierdurch sollen die hydrophoben Wechselwirkungen geschwächt werden und die Dimerisierung unterbunden werden. Mit

diesen Mutanten, soweit korrekt gefaltet und aktiv, kann dann untersucht werden, inwiefern sich die katalytischen Eigenschaften der Monomere von denen des Dimers unterscheiden, ob die gleichen Substrate erkannt werden oder ob die Umsatzraten für ATP und die Entwindung divergieren.

Der Entwurf von chimären Fusionsproteinen ist eine weitere elegante Möglichkeit, die Rolle der C-terminalen Domäne weiter zu untersuchen. Hierbei wird die CTD an die Helikasedomäne einer anderen DEAD-Box Helikase gekoppelt. In anschließenden Experimenten zur ATPase-Aktivität, RNA-Bindung und Entwindung werden die Eigenschaften der Chimäre mit denen des Hera Wildtyps verglichen. Dadurch ergeben sich neue Einsichten, welche Eigenschaften und Substratspezifitäten unmittelbar von der CTD vermittelt werden und welche nicht.

Abgesehen von neuen Erkenntnissen für die Funktionsweise von DEAD-box Helikasen mag die CTD mit ihrem Dimerisierungsmotiv in Zukunft noch weitere praktische Anwendungen finden. Das Dimer weist neben einer hohen Flexibilität eine bemerkenswert hohe Stabilität auf und dissoziiert bei einer Inkubationszeit von mehreren Minuten bei 65°C. Diese hohe Stabilität macht sie zwar für Anwendungen im Bereich der Affinitätschromatographie ungeeignet, aber möglicherweise interessant für Oberflächenkopplungen. Das gewünschte Protein könnte mit der Hera CTD (oder zumindest der Dimerisierungsdomäne) als Fusionsprotein produziert werden. In Lösung könnte dieses dann an eine Trägermatrix gekoppelt werden, welche ebenfalls die CTD/Dimerisierungsdomäne trägt. Es ist zu erwarten, dass diese Kopplung schnell stattfindet und auch innerhalb eines grossen Temperaturbereichs und unterschiedlichen Ionenkonzentrationen stabil bleibt. Die Flexibilität des Dimerisierungsmotivs sollte gewährleisten, dass das Protein von der Fusion mit der CTD relativ unbeeinflusst bleibt und sich daher korrekt falten und seiner eigentlichen katalytischen Funktion nachkommen kann.

Zusätzlich zu dieser konkreten Anwendung wäre es auch vorstellbar das Dimerisierungsmotiv von Hera generell als eine Art „molekularen Klebstoff“ zu verwenden, um Biomoleküle jeder Art nicht-kovalent möglichst hochaffin miteinander zu verbinden.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADP: Adenosindiphosphat

AMP: Adenosinmonophosphat

ATP: Adenosintriphosphat

CTD: C-terminale Domäne

C-terminal: carboxyterminal

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure

ds: *double stranded*, doppelsträngig

$E_{\text{FRET}}$ : FRET-Effizienz

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

et al.: et altera, und andere

FPLC: *fast protein liquid chromatography*, schnelle Protein-Flüssigchromatographie

FRET: Försterresonanzenergietransfer

GmbH: Gesellschaft mit beschränkter Haftung

GST: Gluthation-S-Transferase

HPLC: *high performance liquid chromatography*, Hochleistungs-Flüssigchromatographie

kDa: Kilodalton

mantADP: 2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosin-5'-phosphat

MWCO: *molecular weight cut-off*, Molekülgrössenausschluss

NADH/H<sup>+</sup>: Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert

N-terminal: aminoterminal

OD: optische Dichte

p.a.: pro analysi, analysenrein

PEP: Phosphoenolpyruvat

P-loop: *phosphate binding loop*, Phosphat-Bindeschleife

RBD: RNA-Bindedomäne

RNA: *ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure

rRNA: ribosomale RNA

RPM: RNase P RNA Bindemotivmutante

SDS: *sodiumdodecyl sulphate*, Natriumdodecylsulfat

SF: Superfamilie

ss: *single stranded*, einzelsträngig

TCEP: Tris-(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

tRNA: Transfer-RNA

UV: ultraviolett

Vis: *visible*, sichtbarer Bereich des Lichtspektrums

z.B.: zum Beispiel

Basen in Nukleotidsequenzen wurden mit den üblichen Einzelbuchstaben, Aminosäuren im Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

## 8. Literaturverzeichnis

Altman, Sidney; Kirsebom, Leif; Talbot, Simon, *Recent studies of ribonuclease P*, The FASEB Journal, **1993**, vol. 7, 7-14

Beis, Isidoros; Newsholme, Eric A., *The Content of Adenine Nucleotides, Phosphagens and some Glycolytic Intermediates in Resting Muscles from Vertebrates and Invertebrates*, Journal Biochemistry, **1975**, 152, 23-32

Benz, Jörg; Trachsel, Hans; Baumann, Ulrich, *Crystal structure of the ATPase domain of translation initiation factor 4A from Saccharomyces cerevisiae-the prototype of the DEAD box protein family*, Structure, **1999**, 7:671-679

Bizebard, Thierry; Ferlenghi, Ilaria, *Studies on Three E. coli DEAD-Box Helicases Point to an Unwinding Mechanism Different from that of Model DNA Helicases*, Biochemistry, **2004**, 43, 7857-7877

Blum, Sylviane; Schmid, Stefanie R.; Pause, Arnim; Buser, Peter; Linder, Patrick; Sonenberg, Nahum; Trachsel, Hans, *ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in Saccharomyces cerevisiae*, **1992**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, 7664-7668

Brown, James W.; Nolan, James M.; Haas, Elizabeth S.; Rubio, Mary Anne T.; Major, Francois; Pace, Norman R., *Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural microbial populations reveals tertiary structural elements*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **1996**, vol. 93, 3001-3006

Busch, Silke; Kirsebom, Leif A.; Notbohm, Holger; Hartmann, Roland K., *Differential Role of the Intermolecular Base-pairs G292-C75 and G293-C74 in the Reaction Catalyzed by Escherichia Coli RNase P RNA*, Journal of Molecular Biology, **2000**, 299, 941-951

Carmel, Andrew B.; Matthews, Brian W., *Crystal structure of the BstDEAD N-terminal domain: a novel DEAD protein from Bacillus stearothermophilus*, RNA, **2004**, 10:66-74

Caruthers, Jonathan M.; McKay, David B., *Helicase structure and mechanism*, Current Opinion in Structural Biology, **2002**, 12:123-133

Caruthers, Jonathan M.; Johnson, Eric R.; McKay, David B., *Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase*, PNAS, **2000**, vol. 97, no. 24, 13080-13085

Chen, Yingfeng; Potratz, Jeffrey P.; Tijerina, Pilar; Del Campo, Mark; Lambowitz, Alan M.; Russell, Rick, *DEAD-box proteins can completely separate an RNA duplex using a single ATP*, PNAS, **2008**, vol. 105, no. 51, 20203-20208

Chu, Vincent B.; Herschlag, Daniel, *Unwinding RNA's secrets: advances in the biology, physics, and modeling of complex RNAs*, Current Opinion in Structural Biology, **2008**, 18: 305-314

Cordin, Olivier; Banroques, Josette; Tanner, N. Kyle; Linder, Patrick, *The DEAD-box protein family of RNA helicases*, GENE, **2006**, 367, 17-37

- Cordin, Olivier; Tanner, N. Kyle, Doère, Monique, Linder, Patrick; Banroques, Josette, *The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity*, EMBO Journal, **2004**, 23, 2478-2487
- Del Campo, Mark; Mohr, Sabine; Jiang, Yue; Jia, Huijue, Jankowsky, Eckhard; Lambowitz, Alan M., *Unwinding by Local Strand Separation Is Critical for the Function of DEAD-Box Proteins as RNA Chaperones*, Journal of Molecular Biology, **2009**, published online, 20 pages
- Diges, Camille M.; Uhlenbeck, Olke C., *Escherichia coli DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA*, The EMBO Journal, **2001**, vol. 20, no. 19, 5503-5512
- Dumont, Sophie; Cheng, Wei; Serebrov, Victor; Beran, Rudolf K.; Tinoco jr., Ignacio; Pyle, Anna Marie; Bustamante, Carlos, *RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP*, Nature, **2006**, 439(7072): 105-108
- Förster, Th., *Discussion of the Faraday Society about Energy Transfer with Special Reference to Biological Systems*, no. 27, **1959**
- Fuller-Pace, F. V.; Nicol, S. M.; Reid, A. D.; Lane, D. P., *DbpA: a DEAD box protein specifically activated by 23S rRNA*, EMBO Journal, **1993**, vol. 12, no. 9, 3619-3626
- Gößringer, Markus; Hartmann, Roland K., *Function of heterologous and truncated RNase P proteins in Bacillus subtilis*, Molecular Microbiology, **2007**, 66(3), 801-813
- Gorbalenya, A. E.; Koonin, E. V., *Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships*, Current Opinions in Structural Biology, **1993**, 3, 419-429
- Gross, Christina H.; Shuman, Stewart, *The Nucleoside Triphosphate and Helicase Activities of Vaccinia Virus NPH-II Are Essential for Virus Replication*, **1998**, Journal of Virology, vol. 72, no. 6, 4729-4736
- Haas, Elizabeth S.; Banta, Amy B.; Harris, J. Kirk; Pace, Norman R.; Brown, James W., *Structure and evolution of ribonuclease P RNA in Gram-positive bacteria*, Nucleic Acid Research, **1996**, vol. 24, no. 23, 4775-4782
- Hartmann, Enno; Hartmann, Roland K., *The enigma of ribonuclease P evolution*, TRENDS in Genetics, **2003**, vol. 19, no. 10, 561-569
- Heide, Corinna; Pfeiffer, Thomas; Nolan, James M.; Hartmann, Roland K., *Guanosine 2-NH<sub>2</sub> groups of Escherichia coli RNase P RNA involved in intramolecular tertiary contacts and direct interactions with tRNA*, RNA, **1999**, 5:102-116
- Huang, Y.; Liu, Z.R., *The ATPase, RNA unwinding, and RNA binding activities of recombinant p68 RNA helicase*, Journal of Biological Chemistry, **2002**, 277, 12810-12815
- Johnson, Eric R.; McKay, David B., *Crystallographic structure of the amino terminal domain of yeast initiation factor 4A, a representative DEAD-box RNA helicase*, RNA, **1999**, 5: 1526-1543

Jovanovic, Milan; Sanchez, Ruth; Altman, Sidney; Gopalan, Venkat, *Elucidation of structure-function relationships in the protein subunit of bacterial RNase P using a genetic complementation approach*, Nucleic Acid Research, **2002**, vol. 30, no. 23, 5065-5073

Karow, Anne R.; Klostermeier, Dagmar, *A conformational change in the helicase core is necessary but not sufficient for RNA unwinding by the DEAD box helicase YxiN*, nucleic Acid Research, **2009**, ahead of print

Karow, Anne R.; Theissen, Bettina; Klostermeier, Dagmar, *Authentic interdomain communication in an RNA helicase reconstituted by expressed protein ligation of two helicase domains*, FEBS Journal, **2007**, 274, 463-473

Kazantsev, Alexei V.; Krivenko, Angelika A.; Harrington, Daniel J.; Carter, Richard J.; Holbrook, Stephen R.; Adams, Paul D.; Pace, Norman R., *High resolution structure of RNase P protein from Thermotoga maritima*, PNAS, **2003**, vol. 100, no. 13, 7497-7502

Klostermeier, Dagmar; Rudolph, Marcus, *A novel dimerization motif in the C-terminal domain of the Thermus thermophilus DEAD box helicase Hera confers substantial flexibility*, Nucleic Acid Research, **2009**, vol. 37, no. 2, 421-430

Kossen, Karl; Karginov, Fedor V.; Uhlenbeck, Olke C., *The Carboxy-terminal Domain of the DExD/H Protein YxiN is Sufficient to Confer Specificity for 23 S rRNA*, Journal of Molecular Biology, **2002**, 324, 625-636

Kossen, Karl; Uhlenbeck, Olke C., *Cloning and biochemical characterization of Bacillus subtilis YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel subfamily of bacterial DEAD proteins*, Nucleic Acid Research, **1999**, vol. 27, no. 19, 3811-3820

Kuang, Wan-Fen; Lin, Yu-Chieh; Jean, François; Huang yu-wen; Tai, Chun-Ling; Chen, Ding-Shinn, Chen Pei-Jer, Hwang, Lih-Hwa, *Hepatitis C virus NS3 RNA helicase activity is modulated by two domains of NS3 and NS4A*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **2004**, 317, 211-217

Linden, Martin H.; Hartmann, Roland K.; Klostermeier, Dagmar, *The putative RNase P motif in the DEAD-box helicase Hera is dispensable for efficient interaction with RNA and helicase activity*, Nucleic Acid Research, **2008**, vol. 36, no. 18, 5800-5811

Linder, Patrick, *DEAD-box proteins: a family affair-active and passive players in RNP-remodeling*, Nucleic Acid Research, **2006**, vol. 34, no 15, 4168-4180

Linder, Patrick, *mRNA Export: RNP Remodeling by DEAD-Box Proteins*, Current Biology, **2008**, vol. 18, no. 7, 297-299

Liu, Fei; Putnam, Andrea; Jankowsky, Eckhard, *ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding*, PNAS, **2008**, vol. 51, no. 105, 20209-20214

Locatelli, Giada Aurora; Spadari, Silvio; Maga, Giovanni, *Hepatitis C Virus NS3 ATPase/Helicase: An ATP Switch Regulates the Cooperativity among the Different Substrate Binding Sites*, Biochemistry, **2002**, 41, 10332-10342

- Loria, A; Pan, T., *Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P*, RNA, **1996**, 2:551-563
- Magde, Douglas; Wong, Roger; Seybold, Paul G.; *Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields*, Photochemistry and Photobiology, **2002**, 75(4), 327-334
- Massire, Christian; Jaeger, Luc; Westhof, Eric, *Derivation of the Three-dimensional Architecture of Bacterial Ribonuclease P RNAs from Comparative Sequence Analysis*, Journal of Molecular Biology, **1998**, 279, 773-793
- Mohr, Sabine; Stryker, John M.; Lambowitz, Alan M., *A DEAD-Box Protein Functions as an ATP-Dependent RNA Chaperone in Group I Intron Splicing*, Cell, **2002**, vol. 109, 769-779
- Morlang, Susanne; Weglöhner, Wolfgang; Franceschi, François, *Hera from Thermus thermophilus: The First Thermostable DEAD-box Helicase with an RNase P Protein Motif*, Journal of Molecular Biology, **1999**, 294, 795-805
- Parker, C. A.; Rees, W. T.; *Correction of Fluorescence Spectra and Measurement of Fluorescence Quantum Efficiency*, Barbiturates from their infra-red Spectra, **1960**, vol. 85, 587-600
- Pause, Arnim; Sonenberg, Nahum, *Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A*, EMBO Journal, **1992**, vol.11, no.7, 2643-2654
- Pugh, G. E.; Nicol, S. M.; Fuller-Pace, F. V., *Interaction of the Escherichia coli DEAD Box Protein DbpA with 23 S Ribosomal RNA*, Journal of Molecular Biology, **1999**, 292, 771-778
- Richter, Nancy j.; Rogers, George W. jr.; Hensold, Jack O., Merrick, William C., *Further Biochemical and Kinetic Characterization of Human Eukaryotic Initiation Factor 4H*, Journal of Biological Chemistry, **1999**, vol. 274, no. 50, 35415-35424
- Rocak, Sanda; Emery, Bertrand; Tanner, N. Kyle; Linder, Patrick, *Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs*, Nucleic Acid Research, **2005**, vol. 33, no. 3, 999-1009
- Rocak, Sanda; Linder, Patrick, *DEAD-Box Proteins: The Driving Forces Behind RNA Metabolism*, Nature, **2004**, vol. 5, 232-241
- Rogers, George W. jr.; Lima, Walt F.; Merrick, William C., *Further Characterization of the Helicase Activity of eIF4A*, Journal of Biological Chemistry, **2001**, vol. 276, no. 16, 12598-12608
- Rogers, George W. jr.; Lima, Walt F.; Merrick, William C., *Modulation of the Helicase Activity of EIF4A by eIF4B, eIF4H and eIF4F*, Journal of Biological Chemistry, **2001**, vol. 276, no. 33, 30914-30922
- Rogers, George W. jr; Richter, Nancy J.; Merrick, William C., *Biochemical and Kinetic Characterization of the RNA Helicase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A*, Journal of Biological Chemistry, **1999**, vol. 274, no.18, 12236-12244

Rozen, Florence; Pelletier, Jerry; Trachsel, Hans; Sonenberg, Nahum, *A Lysine Substitution in the ATP-Binding Site of Eucaryotic Initiation Factor 4A Abrogates Nucleotide-Binding Activity*, *Molecular and Cellular Biology*, **1989**, vol. 9, no. 9, 4061-4063

Schlegl, Judith; Hardt, Wolf-Dietrich; Erdmann, Volker A.; Hartmann, Roland K., *Contribution of structural elements to Thermus thermophilus ribonuclease P RNA function*, *The EMBO Journal*, **1994**, vol. 13, no. 20, 4863-4869

Schwer, Beate; Meszaros, Tamar, *RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing*, *EMBO Journal*, **2000**, vol. 19, no. 23, 6582-6591

Sengoku, Toru; Nureki, Osamu; Nakamura, Akira; Kobayashi, Satoru; Yokoyama, Shigeyuki, *Structural Basis for RNA Unwinding by the DEAD-Box Protein Drosophila Vasa*, *Cell*, **2006**, 125, 287-300

Serebrov, Victor; Pyle, Anna Marie, *Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase*, *Nature*, **2004**, vol. 430, 476-480

Shi, Hang; Cordin, Olivier; Minder, C. Michael; Linder, Patrick; Xu, Rui-Ming, *Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56*, *PNAS*, **2004**, vol. 101, no. 51, 17628-17633

Singleton, Martin R.; Wigley, Dale B., *Modularity and Specialization in Superfamily 1 and 2 Helicases*, *Journal of Bacteriology*, **2002**, vol. 184, no. 7, 1819-1826

Stams, Travis; Niranjanakumari, S.; Fierke, Carol A., Christianson David W., *Ribonuclease P Protein Structure: Evolutionary Origins in the Translational Apparatus*, *Science*, **1998**, vol. 280, 752-755

Story, Randall M.; Hong, Li; Abelson John N., *Crystal structure of a dead box protein from the hyperthermophile Methanococcus jannaschii*, *PNAS*, **2001**, vol. 98, no. 4, 1465-1470

Sun, Lei; Campbell, Frank E.; Zahler, Nathan H.; Harris, Michael E., *Evidence that substrate-specific effects of C5 protein lead to uniformity in binding and catalysis by RNase P*, *EMBO Journal*, **2006**, 25, 3998-4007

Tanner, N. Kyle; Linder, Patrick, *DEAD/H Box RNA Helicases: From Generic Motors to specific Dissociation Functions*, *Molecular Cell*, **2001**, vol.8, 251-262

Talavera, Miguel A.; De La Cruz, Enrique M., *Equilibrium and Kinetic Analysis of Nucleotide Binding to the DEAD-Box RNA Helicase Dbpa*, *Biochemistry*, **2005**, 44, 959-970

Theissen, Bettina; Karow, Anne R.; Köhler, Jürgen; Gubaev Airat; Klostermeier, Dagmar, *Cooperative binding of ATP and RNA induces a closed conformation in a DEAD box RNA helicase*, *PNAS*, **2008**, vol. 105, no. 2, 548-553

Thrall, Sara H.; Reinstein, Jochen; Wöhrl Birgitta M.; Goody, Roger S., *Evaluation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Primer tRNA Binding by Fluorescence Spectroscopy: Specificity and Comparison to Primer/Template Binding*, *Biochemistry*, **1996**, 35, 4609-4618

Tijerina, Pilar; Bhaskaran, Hari; Russell, Rick; *Nonspecific binding to structured RNA and preferential unwinding of an exposed helix by the CYT-19 protein, a DEAD-box RNA chaperone*, PNAS, **2006**, vol. 103, no.45, 16698-16703

Tomei, Licia; Failla, Cristina; Santolini, Elisa, Francesco, Raffaele De; Monica, Nicola La, *NS3 Is a Serine Protease Required for Processing of Hepatitis C Virus Polyprotein*, Journal of Virology, **1993**, vol. 67, no. 7, 4017-4026

Torres-Larios, Alfredo; Swinger, Kerren K.; Pan, Tao; Mondragón, Alfonso, *Structure of ribonuclease P- a universal ribozyme*, Current Opinion in Structural Biology, **2006**, 16:327-335

Tsu, Christopher, A.; Uhlenbeck, Olke C., *Kinetic Analysis of the RNA-Dependent Adenosinetriphosphate Activity of DbpA, an Escherichia coli DEAD Protein Specific for 23S Ribosomal RNA*, Biochemistry, **1998**, 37, 16989-16996

Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J.; Gay, N. J., *Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ - subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*, EMBO Journal, **1982**, 1, 945-951

Wang, Shuying; Hu, Yaoxiong; Overgaard, Michael T.; Karginov, Fedor V.; Uhlenbeck, Olke C.; McKay, David B., *The domain of the Bacillus subtilis DEAD-box helicase YxiN that is responsible for specific binding 23S rRNA has an RNA recognition motif fold*, RNA, **2006**, 12:959-967

Wegscheid, Barbara; Condon, Ciarán; Hartmann, Roland K., *Type A and B RNase P RNAs are interchangeable in vivo despite substantial biophysical differences*, EMBO reports, **2006**, vol. 7, no. 4, 411-417

Yao, Nanhua; Hesson, T.; Cable, M.; Hong, Z.; Kwong, A. D.; Le, H. V.; Weber, Patricia C., *Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain*, Nature, **1997**, vol. 4, no. 6, 463-467

Zhao, Rui; Shen, Jingping; Green, Michael R.; MacMorris, Margaret; Blumenthal, Thomas, *Crystal Structure of UAP56, a DExD/H-Box Protein Involved in Pre-mRNA Splicing and mRNA Export*, Structure, **2004**, vol. 12, 1373-1381

## 9. Zusammenfassung

Hera ist eine DEAD-Box Helikase aus *Thermus thermophilus*. Wie bei vielen anderen DEAD-Box Helikasen auch, ist wenig über die physiologische Rolle von Hera bekannt. Vorangegangene Untersuchungen ergaben, dass der ATPase-Umsatz von Hera vor allem durch ribosomale 16S und 23S RNAs, sowie RNase P RNAs stimuliert wurde. Ausserdem wurde eine Entwindungsaktivität für DNA-RNA Hybride dokumentiert. Desweiteren zeigte sich, dass die spezifische Stimulierung ausblieb, wenn die C-terminale Domäne um etwa 140-150 Aminosäuren verkürzt wurde. In diesem deletierten Bereich wurde ein Motiv vermutet, welches eine schwache Sequenzhomologie mit den RNase P RNA-Bindemotiven bakterieller RnpAs aufweist. Eine Beteiligung an der ribosomalen Biogenese wurde als mögliche Funktion *in vivo* vorgeschlagen (Morlang et al., 1999). Hera bildet als einzige bisher beschriebene DEAD-Box Helikase ein stabiles Dimer aus, welches sich durch eine hohe intramolekulare Flexibilität auszeichnet (Klostermeier & Rudolph, 2009).

Diese ersten Einsichten wurden in der vorliegenden Arbeit konkretisiert und erweitert. Es wurde der ATP-Umsatz von Hera in Ab- und Anwesenheit von RNAs bestimmt, sowie die Entwindung doppelhelikaler Bereiche von RNA-Minimalsubstraten. Verwendet wurden hierzu Hydrolysetests für den ATP-Umsatz im Fliessgleichgewicht oder als Einzelumsatz, sowie Entwindungstests mit nativer Polyacrylamidgelelektrophorese. Da bisher wenig über die *in vivo* Substrate von Hera bekannt war, lag ein Schwerpunkt der Arbeit auf der Eingrenzung möglicher Substrate, welche die Helikase aktivieren. Hierunter versteht man die Konformationsänderung, welche eine DEAD-Box Helikase aufgrund der Substratbindung durchläuft, wie durch Theissen et al. (2008) beschrieben. Konfokale Einzelmolekül-FRET-Messungen waren das geeignete Mittel der Wahl, da hiermit die mit der Substratbindung einhergehende Konformationsänderung der Helikase beobachtet und als Indikator für die Substraterkennung verwendet werden konnte.

Desweiteren wurde die Bedeutung einzelner Motive und Domänen für ATP-Umsatz, Substraterkennung und Entwindung durch gezielte Mutation und Deletion untersucht.

Es zeigte sich, dass der ATP-Umsatz in Gegenwart von poly U RNA, RNase P RNA und rRNA stimuliert wird. Diese Substrate führen auch eine Konformationsänderung der Helikase herbei, wogegen DNAs und tRNAs nicht von Hera erkannt und gebunden werden. Bei den rRNAs handelte es sich hierbei fast ausschliesslich um Fragmente der 23s rRNA aus *B. subtilis*, welche *hairpin* 92 beinhalten. Hera wechselte den Konformationszustand, wenn deren Länge 30 Basen oder mehr betrug. Sequenz oder Länge des *hairpins* und des

angrenzenden *loops* waren allerdings nicht entscheidend. RNase P RNAs führten zu Konformationsänderungen, egal ob sie vom Typ A und B waren, oder ob die Substratbindedomäne oder die katalytische Domäne verwendet wurden.

Wildtypisches Hera war in der Lage, ein RNA-Minimalsubstrat unter ATP-Verbrauch zu entwinden.

Entfernte man die letzten 145 Aminoäuren der C-terminalen Domäne, so verliert die verbleibende Helikasedomäne ihre Fähigkeit zur spezifischen RNA-Bindung und ihre Entwindsaktivität. Die RNA-Bindedomäne von Hera ist also in diesem Teil zu vermuten.

Eine Mutation des vermuteten RNase P RNA-Bindemotivs allerdings beeinträchtigt die RNA-Bindung und Entwindung nicht. Sie ist daher nicht, wie vermutet, ein integraler Bestandteil der RNA-Bindedomäne. Und Konkurrenzexperimente mit Rnpa aus *E. coli* lassen die Schlussfolgerung zu, dass beide Proteine an unterschiedliche Bereiche der RNA binden können.

Mutationen in Motif III, welches in DEAD-box Helikasen eine Kopplung von ATP-Hydrolyse und Entwindungsaktivität herstellt, verlangsamten die Entwindung lediglich, behindern sie aber nicht vollständig. Durch eine Mutation von Motiv I, dem Walker A Motiv, wird die ATPase-Aktivität vollständig eingestellt.

Funktionelle Bereiche von Hera wurden in dieser Arbeit detailliert untersucht, genauso wie die Anforderungen an ein *in vivo* RNA-Substrat. Die hier vorgestellten Experimente und Ergebnisse liefern somit den Grundstein für weitere Untersuchungen dieser Helikase und somit für das Verständnis von DEAD-box Helikasen im Allgemeinen.

## 10. Danksagung

Als Erstes möchte ich meiner Betreuerin Prof. Dagmar Klostermeier danken, für die Vergabe des interessanten Themas, für die zahlreichen Anregungen und ein offenes Ohr, aber auch für die Bereitschaft, mich jederzeit zu fördern und zu unterstützen. Markus Rudolph danke ich für seine Arbeiten an der Kristallstruktur von Hera, die die Interpretation vieler Messungen in dieser Dissertation ungemein erleichterte. Zu besonderem Dank bin ich Roland K. Hartmann und Mitarbeitern verpflichtet, deren Erfahrungen auf dem Gebiet der RNase P Ribozyme und RNA-Synthese wichtige Grundlagen zu den entsprechenden Experimenten mit Hera lieferten, sowie für die zahlreichen RNA-Substrate.

Für ihre engelsgleiche Geduld und hervorragende technische Unterstützung danke ich Ramona Heissmann, Andreas Schmidt, Ines Hertel, Diana Blank, Leo Faletti, Simon Saner, Sandro Scanu, Keith Potter und Therese Schulthess. Für Administration (vor allem aber für das Versenden von FedEx-Paketen) danke ich Corinne Salvisberg.

Unsere Gruppe hat sich seit unserem Umzug nach Basel mit einer Anfangsstärke von 5 Leuten doch etwas vergrößert. Dank für die gemeinsame Zeit und die Unterstützung geht an: Bettina Theissen, Florian Spreitler, Thomas Göttler, Stefan Jungblut, Airat Gubaev, Bruno Stephanidis, Miriam Steiner, Regula Aregger, Agneyo Ganguly, Martin Lanz, Yoandris Del Toro Duany, Jaqueline Butter und Manuel Hilbert. Besonders möchte ich Anne Karow und Matthias Zwick für das Lektorat, aber vor allem für ihre wunderbare Freundschaft danken.

Meinen Eltern Evi und Hubert Linden, meiner Schwester Sabine und meinem Schwager Markus danke ich für Liebe und ihre fortwährende Unterstützung.

Folgende Menschen haben zwar nicht unmittelbar zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, aber meine Zeit und mein Leben hier in Basel sehr bereichert: Peter Gisler, Sonja Hilbrand, Oliver Schoohf, Irene Rüfenacht, Nina Kluttig und Oliver Müller.

Diese Liste wäre nicht vollständig ohne die Erwähnung eines ganz besonderen Menschen. Bevor ich mich zu einer allzu ausschweifenden Dankesrede hinreissen lasse, welche den Umfang dieser Arbeit definitiv sprengen würde, sage ich einfach nur:

Danke, Katharina.

**11. Lebenslauf (curriculum vitae)****Lebenslauf von Martin Hubert Linden  
(curriculum vitae)**

Name: Martin Hubert Linden

Geboren: 20.04.1979 in München, Deutschland

Eltern: Hubert Herbert Linden (Rentner)  
Evi Margot Linden geb. Berger (Pfarramtssekretärin)

Geschwister: Sabine Evi Illigner, geb. Linden

09/1985-07/1989 Besuch der Grund- und Teilhauptschule Baar-Ebenhausen,  
Pfaffenhofen a.d. Ilm, Deutschland

09/1989-06/1998 Besuch des Reuchlin-Gymnasiums Ingolstadt, Deutschland  
Leistungskurse: Englisch, Biologie  
Abiturnote: 2,5 (gut)

07/1998-04/1999 Wehrdienst bei der deutschen Luftwaffe in Mengen und  
Manching, Deutschland

11/1999-05/2005 Studium der Biologie an der Universität Regensburg,  
Deutschland  
Schwerpunkt: Molekularbiologie, Proteinbiochemie  
Diplomarbeit zum Thema „Rückfaltung und sekretorische  
Coexpression der Bindedomäne Aga2 des Agglutinin-a aus  
*Saccharomyces cerevisiae*“ am Lehrstuhl für Biophysik und  
physikalische Biochemie im Labor von Dr. Gudrun Horn unter  
der Leitung von Prof. Dr. Dr. Kalbitzer  
Diplomnote: 1,5 (sehr gut)

07/2005-12/2005            Beginn der Promotion zum Thema: „Die DEAD-box Helikase Hera aus *Thermus thermophilus*: Untersuchung der Wechselwirkung mit Nukleinsäuren und der Helikaseaktivität“ an der Universität Bayreuth am Lehrstuhl für Experimentelle Physik IV in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dagmar Klostermeier

Seit 01/2006                Umzug der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klostermeier nach Basel, Schweiz. Fortführung der Promotion zum Thema: „Die DEAD-box Helikase Hera aus *Thermus thermophilus*: Untersuchung der Wechselwirkung mit Nukleinsäuren und der Helikaseaktivität“ am Biozentrum

Sonstige Tätigkeiten:

Während der Schulzeit: Bürotätigkeiten in der Diakonie Ingolstadt, Deutschland

Lagerarbeiter im EDEKA-Hauptlager Gaimersheim, Deutschland

Juni-September 1999: Lagerarbeiter bei der AUDI-AG Ingolstadt, Deutschland

Während des Studiums: Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg, Deutschland unter Leitung von Prof. Dr. Thomm (September 2003)