Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Biochemische Charakterisierung der siRNA-vermittelten Erkennung und Spaltung von *target* RNA durch humanes Argonaute2 Protein

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Naturwissenschaften –

vorgelegt von
Andrea Deerberg
aus Tübingen

Lübeck, 2011

Erster Berichterstatter : Prof. Dr. Tobias Restle
Zweiter Berichterstatter : Prof. Dr. Thomas Peters

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Januar 2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20. Januar 2012

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung **1**

2 Einleitung **5**

2.1 Über die Bedeutung der Genregulation – Motivation dieser Arbeit 5

2.2 Genregulation durch RNA-Interferenz 6

2.2.1 Historische Entwicklung 6

2.2.2 Mechanismus der RNAi 7

2.3 Die Familie der Argonaute Proteine 11

2.3.1 Das humane Argonaute2 Protein 14

2.3.2 Die N-terminale Domäne 16

2.3.3 Die PIWI Argonaute Zwille (PAZ) Domäne 17

2.3.4 Die *middle* (Mid) Domäne 18

2.3.5 Die *P-element induced wimpy testis* (PIWI) Domäne 19

2.4 Die strukturellen und molekularen Grundlagen der siRNA-vermittelten RNAi . 20

2.4.1 Anforderungen an kleine regulatorische RNAs und *target* RNAs 20

2.4.2 Molekulare Dynamik von Ago während der Erkennung und Spaltung von *target* RNA 22

2.5 Die Kinetik der siRNA-vermittelten RNAi 25

2.5.1 Die kinetische Kontrolle der RNAi 25

2.5.2 Vergleichende Analyse der Katalyse durch RISC 26

2.6 Die Familie der dsRNA-bindenden Proteine 28

2.6.1 Die Proteine TRBP und PACT und ihre Rolle bei der RNAi 29

2.7 Ziel dieser Arbeit 33

3 Material **35**

3.1 Allgemeines 35

3.2 Geräte 36

3.3 Chemikalien 38

3.4 Verbrauchsmaterialien 40

3.5 Säulen und Säulenmaterialien 41

3.6 Lösungen und Puffer 41

3.7 Bakterienkultur . . . 44
3.7.1 Bakterienstämme . . . 44
3.7.2 Nährmedien für die Bakterienkultur . . . 44
3.8 Nukleinsäuren . . . 45
3.8.1 Plasmide . . . 45
3.8.2 Oligonukleotide . . . 46
3.8.3 *In vitro* Transkript . . . 47
3.8.4 Primer . . . 48
3.9 Kits . . . 48
3.10 Enzyme, Proteine und Größenmarker . . . 49
3.11 Antikörper . . . 49
3.12 Programme . . . 50

4 Methoden **51**
4.1 Molekularbiologische Methoden . . . 51
4.1.1 PCR . . . 51
4.1.2 Gewinnung von Plasmid-DNA . . . 51
4.1.3 Gelelektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren . . . 52
4.1.4 Detektion von Nukleinsäuren in Elektrophoresegelen . . . 54
4.1.5 Nukleinsäure-Isolierung aus Agarosegelen . . . 55
4.1.6 Restriktionshydrolyse von DNA . . . 56
4.1.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen . . . 56
4.1.8 Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Oligonukleotiden oder PCR-Produkten . . . 56
4.1.9 Transformation . . . 57
4.1.10 Untersuchung von *E. coli* Kolonien mittels PCR . . . 57
4.1.11 Kryokonservierung von *E. coli* Bakterienstämmen . . . 58
4.1.12 Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA . . . 58
4.2 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren . . . 59
4.2.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren . . . 59
4.2.2 Hybridisierung von Nukleinsäuren . . . 59
4.2.3 *In vitro* Transkription . . . 59
4.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion . . . 60
4.2.5 Präzipitation von Nukleinsäuren . . . 60
4.2.6 Modifikation von Nukleinsäure-5'-Enden . . . 61
4.2.7 Herstellung radioaktiver Nukleinsäure-Größenmarker . . . 62
4.3 Methoden im Umgang mit Proteinen . . . 63
4.3.1 Quantifizierung von Proteinen . . . 63
4.3.2 Fällung von Proteinen . . . 65

4.3.3 Gelelektrophorese zur Analyse von Proteinen . . . 65
4.3.4 Detektion von Proteinen in Elektrophoresegelen und auf PVDF-Membranen . . . 66
4.3.5 Western-Analyse . . . 67
4.3.6 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* Bakterien . . . 69
4.3.7 Fraktionierung von bakteriellem *E. coli* Extrakt . . . 70
4.3.8 Reinigung von rekombinanten Proteinen . . . 70
4.3.9 Konzentrierung von Proteinen in Lösung . . . 75
4.3.10 Untersuchung auf RNase-Kontamination . . . 75
4.4 Techniken zur biochemischen Charakterisierung von rekombinanten Proteinen . 75
4.4.1 siRNA-vermittelte Spaltung von *target* RNA . . . 76
4.4.2 Ermittlung von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten . . . 77
4.4.3 Charakterisierung von Nukleinsäurebindungsreaktionen mittels transienter Fluoreszenzmessungen . . . 79
4.4.4 Gelverzögerungs-Analysen . . . 81
4.4.5 Untersuchung von Protein-Oligomerisierungszuständen . . . 82

5 Ergebnisse **85**
5.1 Vorarbeiten zu diesem Dissertationsprojekt . . . 85
5.2 Strategien zur Gewinnung von rekombinantem hAgo2 für biochemische Studien 85
5.3 Expression von rekombinantem hAgo2 und hTRBP . . . 87
5.3.1 Expression von NHA-hAgo2, hAgo2-His und His-hAgo2 . . . 87
5.3.2 Klonierung von GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His . . . 89
5.3.3 Studien zur Optimierung der Expression von GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His . . . 90
5.3.4 Studien zur Optimierung der Expression von hTRBP-His . . . 91
5.4 Präparation von rekombinantem hAgo2 und hTRBP . . . 93
5.4.1 Studien zur Reinigung von NHA-hAgo2, hAgo2-His und His-hAgo2 . . . 93
5.4.2 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen . . . 99
5.4.3 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für hTRBP-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen . . . 104
5.5 Biochemische Charakterisierung von rekombinantem hAgo2 . . . 105
5.5.1 Untersuchung der Präparationen auf Nuklease-Verunreinigungen . . . 105
5.5.2 Überprüfung der sequenzspezifischen Spaltungsaktivität . . . 106
5.5.3 Einfluss der Temperatur auf die Spaltungsreaktion . . . 108
5.5.4 Einfluss der Mg^{2+}-Konzentration auf die Spaltungsreaktion . . . 108
5.5.5 Studien zum Oligomerisierungsverhalten von hAgo2 . . . 110

5.6 Biochemische Charakterisierung von rekombinantem hTRBP 115
5.6.1 Untersuchung der Präparation auf Nuklease-Verunreinigungen und proteingebundene Nukleinsäuren 115
5.6.2 Überprüfung der Nukleinsäurebindung mittels Gelverzögerungs-Analysen 116
5.6.3 Studien zum Oligomerisierungsverhalten von hTRBP-His 118
5.7 Charakterisierung der siRNA-Bindung durch hAgo2 122
5.7.1 Auswahl geeigneter siRNA-Substrate 122
5.7.2 Affinität von hAgo2 zu verschiedenen siRNA-Substraten 123
5.7.3 Kinetik der Bindungsreaktion von hAgo2 und verschiedenen siRNA-Substraten 126
5.7.4 Zusammenfassung der biochemischen und kinetischen Parameter bei der Bildung eines binären Komplexes 134
5.8 Charakterisierung der *target* RNA-Bindung durch den binären hAgo2/*guide* RNA-Komplex 134
5.8.1 Etablierung eines experimentellen Systems zur Untersuchung der *target* RNA-Erkennung und -Bindung 134
5.8.2 Bestimmung der Affinität des binären Komplexes zur *target* RNA 137
5.8.3 Kinetik der Bindungsreaktion von binärem Komplex und *target* RNA . . 138
5.8.4 Zusammenfassung der biochemischen und kinetischen Parameter bei der Bildung eines ternären Komplexes 144
5.9 Charakterisierung der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 . 144
5.9.1 Untersuchung der *target* RNA-Spaltung auf die Existenz einer *burst* Phase 145
5.9.2 Vergleichende Analyse der *target* RNA-Spaltung bei Verwendung unterschiedlicher siRNA-Substrate 146
5.9.3 Michaelis-Menten-Kinetik der Spaltungsreaktion 148
5.9.4 Untersuchungen zur Bestimmung der Ratenkonstante der Phosphodiesterhydrolyse 149
5.10 Charakterisierung der Produktfreisetzung nach *target* RNA-Spaltung 151
5.10.1 Experimentelles System zur Untersuchung der Freisetzung von Spaltprodukten 151
5.10.2 Kinetik der Spaltproduktfreisetzung 153
5.11 Charakterisierung der siRNA-Bindung durch hTRBP 155
5.11.1 Affinität von hTRBP zu verschiedenen siRNA-Substraten 155
5.11.2 Kinetik der Bindungsreaktion von hTRBP und siRNA 157
5.11.3 Zusammenfassung der biochemischen und kinetischen Parameter bei der Bildung eines hTRBP-His/siRNA-Komplexes 160

5.12 Untersuchung des Einflusses von hTRBP auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung . . . 160

6 Diskussion **165**

6.1 Untersuchung der siRNA-vermittelten RNAi mit Hilfe von rekombinanten Komponenten . . . 166
6.2 Stabilität von rekombinantem hAgo2 und hTRBP . . . 169
6.2.1 Der Oligomerisierungszustand von hAgo2 wird durch RNAs beeinflusst . 169
6.2.2 Der Oligomerisierungszustand von hTRBP ist RNA-unabhängig . . . 170
6.3 Charakterisierung der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 . 171
6.3.1 Die Beladung von hAgo2 mit siRNA ist abhängig von der Beschaffenheit des 5'-Endes des *guide* Stranges . . . 172
6.3.2 Die Erkennung und Bindung der *target* RNA erfolgt durch Wechselwirkungen mit der *guide* RNA . . . 179
6.3.3 hAgo2 besitzt siRNA-Strangtrennungs- und *target* RNA-Spaltungsaktivität . . . 183
6.3.4 Die Freisetzung der Spaltprodukte limitiert die Geschwindigkeit der Reaktion bei multiplem Umsatz . . . 187
6.3.5 Minimales kinetisches Modell der Wirkungsweise von hAgo2 . . . 188
6.4 Charakterisierung der siRNA-Bindung durch hTRBP . . . 189
6.4.1 hTRBP bindet siRNA mit hoher Affinität . . . 189
6.4.2 Die Bindung von siRNA durch hTRBP beruht auf einer schnellen konformationellen Umlagerung . . . 191
6.4.3 Die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT besitzen vermutlich einen entgegengesetzten Einfluss auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 . . . 192
6.5 Modell der minimalen rekombinanten RNA-Interferenz . . . 193
6.6 Ausblick . . . 195

7 Literaturverzeichnis **197**

A Anhang **223**

A.1 Theoretische Grundlagen der biochemischen und biophysikalischen Methoden . 223
A.1.1 Ermittlung von Dissoziationskonstanten durch Fluoreszenztitration unter *steady state* Bedingungen . . . 223
A.1.2 Ermittlung von Dissoziationskonstanten durch Verdrängungstitration unter *steady state* Bedingungen . . . 225
A.1.3 Ermittlung von Molekülgrößen durch Dynamische Lichtstreuung . . . 225
A.2 Abkürzungsverzeichnis . . . 226

A.3 Abbildungsverzeichnis 232
A.4 Tabellenverzeichnis 235
A.5 Danksagung 237
Lebenslauf 239
Publikationsliste 242

1 Zusammenfassung

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein hoch spezifischer posttranskriptioneller Mechanismus zur Genregulation, der in allen höheren Organismen bis hin zum Menschen vorkommt. Dabei kommt es durch den Ribonukleoproteinkomplex *RNA-induced silencing complex* (RISC) zur sequenzabhängigen Erkennung und Bindung einer *target* mRNA, deren Translation daraufhin durch eine endonukleolytische Spaltung oder durch sterische Blockade verhindert wird. Die Schlüsselkomponente des humanen RISC stellt das Argonaute2 Protein (hAgo2) dar, welches mit der Nukleinsäurekomponente, einer *guide* RNA, assoziiert ist. Es setzt sich aus der N-terminalen, Mid, PAZ und PIWI Domäne zusammen. Die Fähigkeit, beliebige *guide* RNAs zu binden, macht hAgo2 zum molekularen Universalwerkzeug der Zelle. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der biochemischen und kinetischen Charakterisierung von rekombinantem hAgo2 durch *in vitro* Studien.

Zunächst wurden für die Gewinnung ausreichender Mengen an enzymatisch aktivem, rekombinantem hAgo2 teilweise parallel fünf verschiedene Expressions- und Reinigungssysteme entworfen und getestet. Die zentralen Probleme stellten die schlechte Löslichkeit sowie die teilweise unvollständige Translation der Fusionsproteine dar. Dennoch gelang u. a. die Gewinnung von hAgo2 mit einer N-terminalen GST-Markierung unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Milligramm-Maßstab mit hoher enzymatischer Aktivität. Alle hAgo2-Konstrukte wiesen die typische sequenzspezifische *target* RNA-Spaltung auf, wobei ein C-terminal modifiziertes Konstrukt einen drastisch verminderten Umsatz zeigte. Dies lässt sich auf eine gestörte Proteinfaltung zurückführen und unterstreicht die ähnliche Domänenstruktur prokaryonter und eukaryonter Ago Proteine. Weiterhin konnten Erkenntnisse über das Mg^{2+}-Optimum sowie das Oligomerisierungsverhalten von hAgo2 gewonnen werden. Es wurde eine Aggregationstendenz festgestellt, die temperaturinduzierbar ist. Diese kann durch Zugabe von RNA fast vollständig inhibiert werden.

Die Dissertation beschäftigte sich zentral mit der biochemischen und kinetischen Charakterisierung der siRNA-vermittelten *target* RNA Spaltung durch hAgo2. Es gelang die Untergliederung des Gesamtprozesses in vier Teilschritte (Beladung von hAgo2 mit siRNA, Erkennung und Bindung der *target* RNA, ihre Spaltung und die Freisetzung der Spaltprodukte) sowie deren individuelle experimentelle Untersuchung. Zunächst wurde die Beladung von hAgo2 analysiert. Zu diesem Zweck konnte ein fluoreszenzbasiertes System entwickelt werden, mit dessen Hilfe die Bindungsreaktion von hAgo2 mit einzelsträngiger und doppelsträngiger siRNA unter *steady state* und *pre-steady state* Bedingungen untersucht wurde. Es konnte erstmalig gezeigt

werden, dass die Programmierung von rekombinantem hAgo2 mit doppelsträngiger siRNA möglich ist. Dies galt bislang als unmöglich. Die Bindungsreaktion setzt sich aus mindestens drei Phasen zusammen, wobei die erste Phase die konzentrationsabhängige Bildung von Kollisionskomplexen repräsentiert. Die zweite Phase beschreibt aller Wahrscheinlichkeit nach die Verankerung des 5'-Endes der *guide* RNA in einer Bindetasche innerhalb der Mid Domäne von hAgo2. Hierfür ist eine 5'-terminale Phosphatgruppe von besonderer Bedeutung, deren Entfernung die Freisetzung des Substrates um das 10-fache beschleunigt. Die dritte Phase entspricht vermutlich der Bindung des 3'-Endes der *guide* RNA innerhalb der PAZ Domäne. Im nächsten Schritt wurde die Erkennung und Bindung der *target* RNA untersucht. Es wurden ebenfalls fluoreszenzbasierte Systeme verwendet, wobei die *target* RNA in einem Fall einen Fluoreszenzlöscher trug. Analog zu den Bindungsstudien von hAgo2 und *guide* RNA wurden Analysen unter *steady state* und *pre-steady state* Bedingungen durchgeführt, bei denen der zuvor gebildete Komplex die *target* RNA bindet, ohne dass es zu einer Spaltung kommt. Bei der Assemblierung ternärer Komplexe konnten drei Reaktionsphasen beobachtet werden. Bei der ersten Phase handelt es sich um die konzentrationsabhängige Bildung von Kollisionskomplexen. Die zweite Phase beruht auf der Komplementarität der beiden Nukleinsäuren und repräsentiert mit großer Wahrscheinlichkeit die sequenzabhängige Paarung von *guide* und *target* RNA im *seed* Bereich. Die dritte Phase stellt vermutlich eine konformationelle Umlagerung des ternären Komplexes dar, bei dem das 3'-Ende des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne freigesetzt wird. Die *target* RNA-Spaltung wurde u. a. mittels Michaelis-Menten-Kinetik und nach Programmierung mit einzel- und doppelsträngigen siRNAs untersucht. Erstmalig gelang *in vitro* die *target* RNA-Spaltung durch mit doppelsträngiger siRNA beladenem rekombinantem hAgo2. Darauf lässt sich zurückführen, dass hAgo2 siRNA-Strangtrennungsaktivität besitzen muss. Die Geschwindigkeit des katalytischen Schrittes konnte nicht ermittelt werden. Abschließend wurde bestätigt, dass es sich bei der Freisetzung der Spaltprodukte um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion bei multiplem Umsatz handelt.

Neben der Charakterisierung von hAgo2 wurde ein Expressions- und Reinigungssystem für hTRBP entwickelt. Hierbei handelt es sich um ein dsRNA-bindendes Protein (dsRBP), welches Teil des *RISC loading complex* (RLC) ist und vermutlich Initiations- und Effektorschritte der RNAi miteinander koppelt. Nach einer initialen Charakterisierung der Nukleinsäurebindungs- und Oligomerisierungseigenschaften wurde die siRNA-Bindung durch hTRBP unter *steady state* und *pre-steady state* Bedingungen untersucht. hTRBP bindet siRNA mit hoher Affinität in einem zweiphasigen Prozess, der auf einer schnellen konformationellen Umlagerung basiert. Diese wird vermutlich in der Region zwischen den beiden dsRNA-bindenden Motiven (dsRBM) vollzogen. Abschließend konnten erste Hinweise gefunden werden, dass hTRBP die Beladung von rekombinantem hAgo2 erleichtert.

Summary

RNA interference (RNAi) is a highly specific mechanism to control gene expression on the posttranscriptional level. It is found in all higher organisms including humans and comprises the sequence-dependent recognition and binding of a target mRNA by the ribonucleoprotein complex *RNA-induced silencing complex* (RISC). Consequently, mRNA translation is blocked either by endonucleolytic cleavage or by steric hindering of the translation machinery. The Argonaute2 protein (hAgo2) is the key component of human RISC and associates with a ribonucleic acid portion, the guide RNA. The enzyme is composed of four domains, namely the N-terminal, PAZ, Mid and PIWI domains. Its ability to bind any given guide RNA makes it a universal molecular tool of cells. The aim of this PhD thesis was the biochemical and kinetic characterisation of recombinant hAgo2 *in vitro*.

The initial goal was to obtain sufficient amounts of enzymatically active recombinant hAgo2. Therefore, five different strategies for the expression and purification were established and tested in parallel. Poor solubility and incomplete translation of the fusion proteins were the major problems encountered. Nevertheless, the isolation of hAgo2 bearing an N-terminal GST-tag under non-denaturing conditions could be achieved. The protein was purified in milligram amounts and showed high enzymatic activity. All tested constructs were able to cleave target RNA in a characteristic, sequence-specific manner, whereas a C-terminally modified construct exhibited a drastic decrease in turnover as compared to proteins with non-modified C-termini. This suggests that the tag disrupts the correct protein folding and emphasizes similarities between the domain structures within prokaryotic and eukaryotic Ago proteins. Furthermore, insight concerning the optimal Mg^{2+} concentration for the cleavage of target RNA as well as the oligomerisation behaviour of hAgo2 could be gained. hAgo2 was found to possess the tendency to aggregate, which can be induced by high temperature. This process can almost completely be abrogated by the addition of RNA.

The main focus of this thesis was the biochemical and kinetic characterisation of the siRNA-mediated target RNA cleavage by recombinant hAgo2. The process could be broken down into four steps (loading of hAgo2 with an siRNA, target RNA recognition and binding, its cleavage and release of the cleaved products). Consequently, these four steps were investigated individually by performing appropriate experiments. In a first set of experiments, hAgo2 loading was analysed. For this matter, a fluorescence-based system was developed and used to observe the binding reaction of hAgo2 with single- and double-stranded siRNA under steady and pre-steady state conditions. It could be shown for the first time, that recombinant hAgo2 is

programmable with a double-stranded siRNA. As of to date, this was believed to be impossible. The binding reaction comprises at least three phases, of which the first phase represents the concentration-dependent formation of collision complexes. The second phase most likely consists of anchoring of the guide RNA's 5'-end within a binding pocket in the Mid domain. The 5'-terminal phosphate group plays a crucial role; its removal leads to a 10-fold accelerated substrate release. The third phase likely involves the binding of the guide RNA's 3'-end within the PAZ domain. In the next step, recognition and binding of a complementary target RNA was investigated. Again, fluorescence-based systems were used which in one case comprised a target RNA coupled to a fluorescence quencher. In analogy to the binding studies of hAgo2 and guide RNA, the analyses were performed under steady and pre-steady state conditions. In the absence of Mg^{2+}, target RNA binding could be observed while its cleavage was abrogated. During the assembly of ternary complexes, three phases could be detected. The first phase consists of the concentration-dependent formation of collision complexes. The second phase is based on the complementarity of the two nucleic acids and presumably involves the sequence-dependent pairing between guide and target RNA in the seed region. The third phase likely represents a conformational rearrangement of the ternary complex during which the guide RNA's 3'-end is released from the PAZ domain which results in the formation of catalytically competent complexes. Target RNA cleavage was characterised using Michaelis-Menten kinetics and comparative studies were performed in which hAgo2 was loaded with single- and double-stranded siRNA. For the first time, cleavage of target RNA by hAgo2 programmed with double-stranded RNA could be shown in an *in vitro* assay. This implies that hAgo2 possesses siRNA strand dissociation activity. The rate constant of the catalytic step could not be determined. Moreover, the release of the cleavage products could be demonstrated to be the rate limiting step of the overall reaction.

Besides the characterisation of hAgo2, an expression and purification system for hTRBP was developed. This protein is able to bind dsRNA and is a component of the *RISC loading complex* (RLC). It is believed to couple RNAi initiation and effector steps. After the initial characterisation of hTRBP's nucleic acid binding and oligomerisation properties, the binding of siRNA was investigated under steady and pre-steady state conditions. hTRBP binds siRNA with high affinity and the reaction comprises two phases the second of which most probably represents a fast conformational rearrangement. This likely occurs in the region between the dsRNA binding motifs (dsRBM). Moreover, first indications could be found that hTRBP facilitates hAgo2 loading with double-stranded siRNA.

2 Einleitung

2.1 Über die Bedeutung der Genregulation – Motivation dieser Arbeit

Die Diversität der Organismen stellt eines der elementarsten Konzepte unseres Planeten dar. Vielfältigkeit ermöglicht die Existenz aller Domänen des Lebens bis hin zu hoch komplexen vielzelligen Organismen wie dem Menschen. Dabei besitzen die Zellen jedes Individuums die identische genetische Ausstattung, unabhängig vom Entwicklungsstand, dem sie umgebenden Gewebeverbund oder ihrem Zellzyklusstatus. Für die Embryonalentwicklung, Zelldifferenzierung und Antwort auf äußere Reize wie Stress oder Infektionen ist es essentiell, Transkriptom und Proteom jeder Zelle zu regulieren. Dies erfolgt über die Aktivierung unterschiedlicher genetischer Programme, woraufhin es zur Bildung spezialisierter Gewebe und Organe kommt und gezielte Reaktionen auf Umwelteinflüsse möglich sind. Die Regulation der Genexpression ist hierfür essentiell.

Die Regulation kann – dem Fluss der Information vom Gen über die mRNA zum Protein folgend – auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationaler oder posttranslationaler Ebene erfolgen. Dabei stellt die mRNA einen probaten Ansatzpunkt für regulatorische Prozesse dar, beispielsweise über die Steuerung der Transkriptmenge. Vor wenigen Jahren wurde ein fundamentaler und äußerst spezifischer Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation entdeckt: die RNA-Interferenz (RNAi). In kurzer Zeit gewann dieser Prozess enorm an Bedeutung, nicht zuletzt dadurch, dass er bei der Regulation praktisch aller zentraler Prozesse in einer Vielzahl von Organismen eine Rolle spielt. Die beteiligten nicht-kodierenden kleinen RNAs machen die RNAi zu einem molekularbiologischen Universalwerkzeug. Trotz der rasanten Entwicklung in den letzten 13 Jahren seit der Veröffentlichung einer Publikation von Andrew Fire und Craig Mello, die als die Grundsteinlegung zur Erforschung der RNAi gilt, bleiben viele Fragen zum genauen Mechanismus unbeantwortet. Diese Arbeit möchte zu deren Klärung einen Beitrag leisten.

In der folgenden Einleitung wird zunächst die historische Entwicklung und der Mechanismus der RNAi beleuchtet (siehe Abschnitt 2.2). In Abschnitt 2.3 wird die zentrale katalytische Komponente, das Argonaute (Ago) Protein in Struktur und Funktion vorgestellt, welches in dieser Arbeit im Detail charakterisiert wird. Der sich anschließende Abschnitt 2.4 beschreibt die molekularen Grundlagen der beiden anderen essentiell an der RNAi beteiligten Komponen-

ten, *guide* und *target* RNA. Weiterhin wird berichtet, mit welcher Dynamik die enzymatische Reaktion abläuft und welche konformationellen Änderungen währenddessen vonstatten gehen. Auf Basis dieser strukturellen Informationen werden die in dieser Arbeit gewonnenen biochemischen Daten interpretiert. Der Abschnitt 2.5 beschäftigt sich mit den Kenntnissen über die Kinetik der katalysierten Reaktion, die durch die eigenen Arbeiten komplementiert werden. Der letzte Abschnitt beschäftigt sich mit denen an der RNAi beteiligten, doppelsträngige (ds)RNA-bindenden Proteinen TRBP und PACT, die teilweise ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurden (siehe Abschnitt 2.6.1).

2.2 Genregulation durch RNA-Interferenz

2.2.1 Historische Entwicklung

Der Grundstein für die Erforschung der Genregulation auf mRNA-Ebene wurde im Jahr 1977 gelegt, als von Paterson *et al.* in einem *in vitro* System die Translation einer mRNA durch Einsatz einer komplementären einzelsträngigen (ss)DNA inhibiert wurde [1]. Die Entdeckung, dass RNA neben der reinen Informationsübertragung vom Gen zum Protein auch katalytische Aktivität besitzt [2, 3], rückte diese Stoffklasse zu Beginn der 1980er Jahre in den Fokus der Forschung. Somit war dem Einsatz von Nukleinsäuren zur sequenzspezifischen Regulation der Genexpression auf mRNA-Ebene der Boden bereitet.

Im Jahr 1990 wurden Experimente durch die Arbeitsgruppe um Napoli durchgeführt, um die violette Blütenfarbe von Petunien zu intensivieren. Dazu wurde das Gen eines zur Anthocyansynthese benötigten Enzyms in die Pflanzen eingebracht. Entgegen der Erwartungen wurden Phänotypen mit schwächerer Blütenfarbe bis hin zu weißen Blüten beobachtet, was sich auf die Hemmung der Anthocyan-Biosynthese auf Grund von bis zu 50 % reduzierter mRNA-Menge, die für die beteiligten Enzyme kodieren, zurückführen ließ [4]. Der Mechanismus des als reversible Kosupression bezeichneten Prozesses konnte derzeit nicht aufgeklärt werden. 1992 wurde durch Romano und Macino von der transienten Inaktivierung bestimmter Gene des roten Schimmelpilzes *Neurospora crassa* berichtet, nachdem homologe Sequenzen eingebracht worden waren. Auch der von ihnen als *quelling* bezeichnete Prozess konnte damals in mechanistischer Hinsicht nicht verstanden werden [5]. Im Jahr 1993 wurde von Lee *et al.* die erste endogen kodierte regulatorische RNA, lin-4, in der Nematode *C. elegans* entdeckt. Diese kleine RNA besitzt mehrere komplementäre Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der lin-14 mRNA und ist in der Lage, die Proteinmenge von lin-14 zu regulieren, ohne die mRNA-Menge zu beeinflussen [6].

Erst im Jahr 1998 wurden bahnbrechende mechanistische Erkenntnisse auf der Grundlage von Experimenten durch Fire und Mello gewonnen. Als Modellorganismus zur Untersuchung des Einflusses einzel- und doppelsträngiger RNA auf die Genexpression diente *C. elegans*. Sie injizierten gonadal einzelsträngige bzw. doppelsträngige RNAs, die entweder komplementär

(*antisense*) zu oder sequenzidentisch (*sense*) mit dem für ein Myofilamentprotein kodierenden Gen *unc-22* waren. Mit den jeweils separat injizierten einzelsträngigen RNAs konnte kein veränderter Phänotyp erzielt werden. Im Gegensatz dazu führte die Injektion von *antisense* und *sense* Strängen gleichzeitig zu einer effizienten, sequenzspezifischen Inhibition der *unc-22* Genexpression. Fire *et al.* sahen die Ursache in der Abnahme der endogenen mRNA-Transkript-Menge des Gens begründet und bezeichneten den Zusammenhang zwischen der Injektion von dsRNA und der Inhibition des komplementären Gens als RNA-Interferenz. Der resultierende Phänotyp war auf die Nachkommen übertragbar [7]. Für die Entdeckung der RNAi wurden Andrew Fire und Craig Mello im Jahr 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

Kurz nach der Entdeckung der RNAi wurde zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen die Existenz verschiedener endogen kodierter regulatorischer RNAs berichtet [8–11]. Auf Grund ihrer geringen Länge wurden sie als *micro*RNAs (miRNAs) bezeichnet. Außerdem gelang mit dem Einsatz synthetischer *small interfering* (si)RNAs der Nachweis, dass RNAi auch in Säugerzellen und beim Mensch existiert [12].

Die Hoffnung auf die Entwicklung therapeutischer Ansätze, die auf der RNAi basieren, wurde 2001 durch die wegweisende Entdeckung bekräftigt, dass synthetische doppelsträngige siRNAs von 19-23 nt Länge die sequenzspezifische Inhibition der Expression eines Zielgens in Säugerzellen ermöglichen, ohne dabei eine Immunantwort auszulösen [12, 13]. Im Jahr 2004 folgte die Entwicklung der ersten siRNA-basierten Therapie für den Menschen gegen die altersbedingte feuchte Makuladegeneration, die sich derzeit in Phase III einer klinischen Studie befindet (Stand Januar 2009). Weitere siRNAs zur Therapie von Hepatitis B, AIDS und anderen Erkrankungen haben mittlerweile Einzug in klinische Studien gehalten [14].

Mittlerweile ist man davon überzeugt, dass mindestens 30 % der humanen Gene durch miRNAs reguliert werden [15, 16], was umso bemerkenswerter erscheint, wenn man bedenkt, dass sie nur 1 – 4 % des humanen Genoms ausmachen [17]. Dadurch übernimmt die RNAi eine zentrale Rolle bei der Steuerung von entscheidenden zellulären Prozessen, wie der Hämatopoese, Embryogenese, der Zelldifferenzierung, -proliferation und dem programmierten Zelltod [18–23]. Außerdem spielen miRNAs eine essentielle Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen [24]. Nach ihrer Entdeckung im Jahr 1998 und der sich anschließenden rasanten Entwicklung des Feldes gilt die RNAi als eines der dynamischsten Arbeitsgebiete in der Biologie. Sie ist als molekularbiologische Standard-Methode für die funktionelle Genanalyse aus den Laboren nicht mehr weg zu denken und gilt in der Medizin als hoffnungsvoller und vielfältiger Ansatz zur Bekämpfung unzähliger Erkrankungen.

2.2.2 Mechanismus der RNAi

Bei der RNAi handelt es sich um einen hoch konservierten Mechanismus, der in Pilzen, Pflanzen, Würmern, Insekten, Säugetieren und dem Menschen vorkommt [25]. Sogar Archaebakte-

rien besitzen mit dem Ago Protein die nötige molekulare Ausstattung der RNA-Interferenz, wobei nicht geklärt ist, ob sie sich dieser tatsächlich bedienen [26–28].

Alle genannten Organismen teilen die Grundzüge des Mechanismus, bei dem zunächst aus langen doppelsträngigen RNA-Vorläufer-Molekülen durch ein Enzym aus der Dicer-Familie etwa 19 - 25 nt kurze dsRNAs generiert werden, die homologe Sequenzen zu den zu regulierenden Genen aufweisen [29]. Bei Dicer handelt es sich um eine Typ III-RNase, die charakteristischerweise Produkte mit Phosphatgruppen am 5'-Ende sowie 2 nt langen Überhängen am 3'-Ende der beiden Einzelstränge und, auf Grund seiner intrinsischen Funktion als molekulares Lineal, von weniger als 30 nt Länge generiert [30–33]. Dicer liegt innerhalb einer Zelle im Komplex mit einer Endonuklease aus der Argonaute Familie sowie einem dsRNA-bindenden Protein vor. In menschlichen Zellen sind dies *TAR RNA binding protein* (TRBP) und/oder *Protein kinase R activator* (PACT). Zusammen bilden sie den *RISC loading complex* (RLC) [34]. Dieser ist verantwortlich für die effektive Übergabe der kleinen regulatorischen dsRNA auf die zentrale, die katalytische Kompetenz bereitstellende Komponente des RISC, ein Protein aus der Argonaute Familie [25, 35]. Für die effektive Programmierung des RISC muss der *passenger* Strang entfernt werden. Dies erfolgt entweder durch das Entwinden des Hybrides oder Spaltung mit anschließender Degradation des *passenger* Stranges [36]. Nach der Erkennung und Bindung der *target* mRNA wird ihre Translation verhindert, indem es entweder zum *slicing*, also der *guide* RNA-vermittelten, sequenzspezifischen Phosphodiesterhydrolyse der *target* RNA mit anschließender Degradation kommt oder alternativ die Bindung des Translationsapparates durch sterische Blockierung verhindert wird. Die zweite Alternative kann durch Deadenylierung und Abbau der *cap* Struktur begleitet werden, was wiederum zur Degradation der mRNA führt [37].

Der genaue Mechanismus hängt neben dem Organismus in erster Linie von der Klasse der kleinen, nicht-kodierenden RNA ab, die die *target* RNA-Erkennung vermittelt (siehe Abbildung 2.1). Im Folgenden werden die beiden wichtigsten Klassen kleiner regulatorischer RNAs und ihre besonderen Merkmale bei der RNAi vorgestellt.

siRNA-vermittelte RNAi siRNAs wurden zunächst in Pflanzen entdeckt [38], später in Fliegenembryonen und Würmern, denen zuvor lange dsRNA injiziert worden war [39] und in Extrakten aus mit langen dsRNAs transfizierten *D. melanogaster* S2 Zellen [40]. Die siRNA-vermittelte RNAi ist vor allem für Pflanzen und Pilze charakteristisch, existiert aber auch in tierischen und menschlichen Zellen. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass *guide* und *passenger* Strang der siRNA perfekt komplementär zueinander sind. Die Quelle der Vorläufer-Moleküle ist im Falle von exogener siRNA häufig transgenen oder viralen Ursprungs bzw. durch Transfektion künstlich in eine Zelle eingebracht [41]. Die seltener vorkommenden endogenen siRNAs wurden zunächst in Pflanzen und *C. elegans* entdeckt [42–44] und werden aus Vorläufer-Molekülen gebildet, die durch Transposons und repetitive genetische Elemente entstehen [45]. Sie können entweder in *cis* oder in *trans* wirken (*cis-acting* (ca)siRNAs und *trans-acting*

(ta)siRNAs). Sie existieren ebenso in *D. melanogaster* [46–51], Mäusen [52, 53] und dem Menschen [54]. Die Funktion der siRNA-vermittelten RNAi ist weniger gut verstanden als diejenige der miRNA-vermittelten RNAi. Neben der Abwehr viraler RNAs und der Degradation von transposablen und repetitiven genetischen Elementen ist nach der Entdeckung von endogenen siRNAs, die homolog zu Protein kodierenden mRNAs sind, eine physiologische Rolle bei der Regulation der Genexpression vorstellbar.

Der Mechanismus der siRNA-vermittelten RNAi ist schematisch in Abbildung 2.1 A dar-

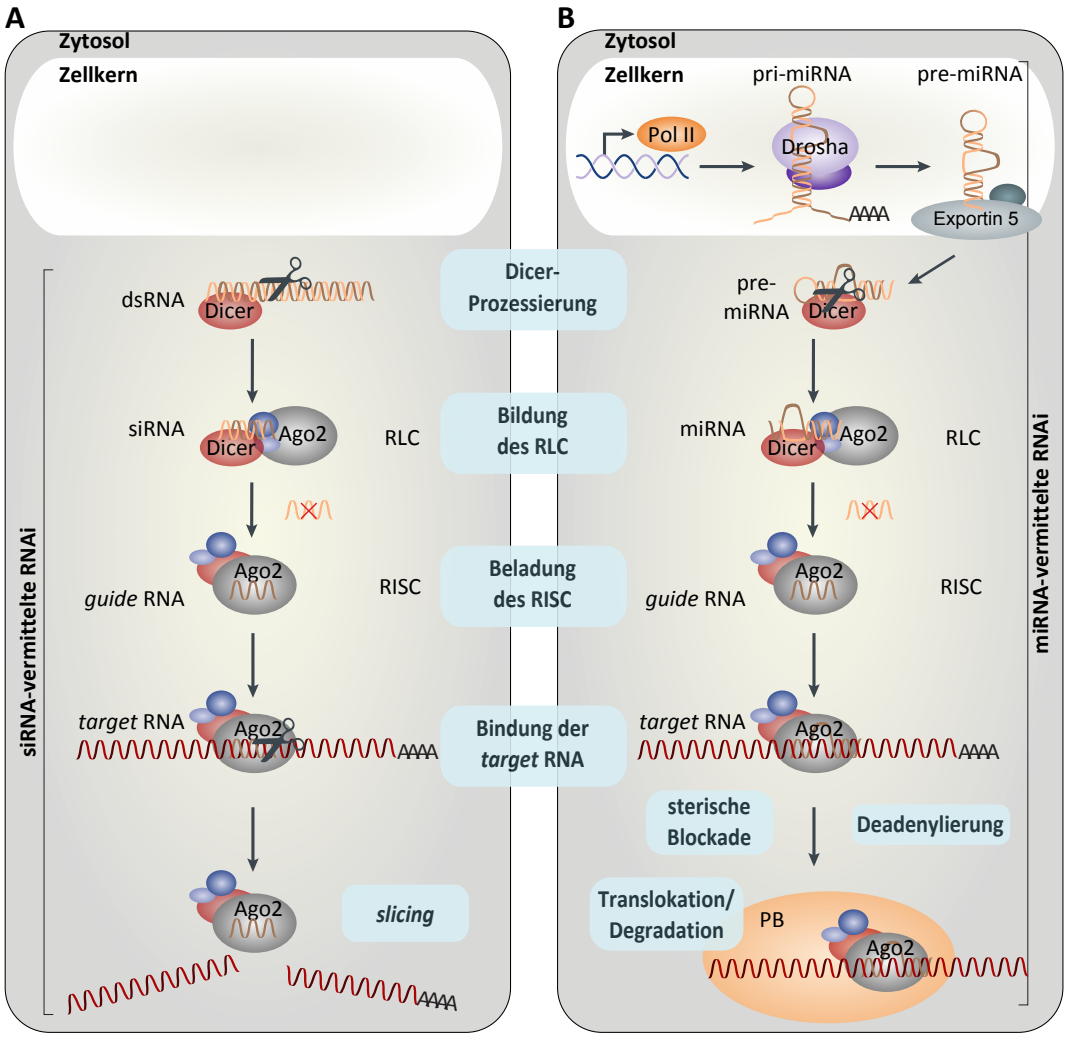


Abbildung 2.1: Wirkmechanismen der siRNA- (A) und miRNA- (B) vermittelten RNAi. Beide Wege teilen die gleichen Grundzüge: Prozessierung langer dsRNA-Vorläufer-Moleküle durch Dicer zu maturen kleinen, regulatorischen RNAs, die Bildung eines RLC für die effektive Beladung des RISC nach Entfernung des *passenger* Stranges, die Erkennung und Bindung der *target* mRNA und die Inhibition ihrer Translation. Unterschiede bestehen in der Beteiligung der Zellkompartimente, der Herkunft und Struktur der Vorläufer-Moleküle sowie im Mechanismus der translationalen Inhibition. PB: Prozessierungskörperchen. Für weitere Details siehe Text. Modifiziert nach Jinek und Doudna [55].

gestellt. Initial werden die langen doppelsträngigen RNA-Vorläufer-Moleküle durch Dicer im Zytosol zu typischerweise 19 – 23 nt langen reifen siRNAs prozessiert [29, 31, 33] und durch den RLC an den RISC übergeben. Für die Aktivierung des RISC muss der *passenger* Strang aus dem Komplex entfernt werden, so dass die katalytische Komponente aus der Argonaute Familie – in menschlichen Zellen handelt es sich hierbei um hAgo2 – durch den *guide* Strang programmiert wird. Vermutlich wird die siRNA in doppelsträngiger Form geladen, der *passenger* Strang durch Argonaute gespalten und aus dem RISC freigesetzt [56–60]. Der RISC ist nun in der Lage, sequenzspezifisch *target* RNAs durch die Homologie von *guide* und *target* RNA zu erkennen und zu binden. Bei perfekter Komplementarität wird die endonukleolytische Spaltung der *target* RNA induziert. Charakteristischerweise erfolgt die Spaltung gegenüber der Phosphatgruppe zwischen dem 10. und 11. Nukleotid des *guide* Stranges, betrachtet von seinem 5'-Terminus [31]. Die Spaltprodukte werden aus dem RISC entfernt, während der *guide* Strang gebunden bleibt. Somit kann RISC multiple Runden von Katalyse durchlaufen [61–63].

miRNA-vermittelte RNAi Die erste miRNA, lin-4, wurde in *C. elegans* entdeckt [64]. Mittlerweile sind unzählige miRNAs in Pflanzen, Algen, Tieren und dem Menschen bekannt [41]. Der miRNA-vermittelte Weg der RNA-Interferenz zeichnet sich dadurch aus, dass *guide* und *target* RNA nur partiell komplementär zueinander sind. Die Erkennungssequenzen liegen sehr oft in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der zu regulierenden mRNA [16]. Anders als die meisten siRNAs sind miRNAs im Genom kodiert, so dass sie eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse spielen [18–23].

Abbildung 2.1 B zeigt schematisch den Mechanismus der miRNA-vermittelten RNAi. Zunächst erfolgt im Zellkern die Transkription der endogen kodierten miRNA-Vorläufer-Moleküle, den *primary* (pri-)miRNAs durch die RNA-Polymerase II [65–68]. Mehrere miRNA-Gene existieren dabei in Gruppen, die vermutlich von einem gemeinsamen pri-miRNA-Transkript stammen [41]. Die pri-miRNAs werden in Säugerzellen durch das Dicer-ähnliche RNase III-Enzym Drosha und seinen dsRNA-Bindepartner *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8) durch das Entfernen 5'- und 3'-terminaler Strukturen zu den etwa 60 – 70 nt langen *precursor* (pre-)miRNAs prozessiert [65, 69–72]. pre-miRNAs besitzen eine Stamm-Schleifen-Struktur (*stem loop*) und die für die RNase III-Produkte typischen 5'-Phosphatgruppe sowie 2 nt lange Überhänge am 3'-Terminus [73]. Anschließend erfolgt der von der GTPase Ran abhängige Transport durch Exportin 5 ins Zytosol [74–77]. Dort folgt die abschließende Prozessierung der pre-miRNA durch Dicer, vermutlich unterstützt durch TRBP, zur maturen miRNA [29, 78, 79]. Die reife miRNA muss analog zum siRNA-vermittelten Weg aufgetrennt werden, damit der *guide* Strang zur effektiven Beladung des RISC dienen kann. Allerdings wird in diesem Fall wahrscheinlich ein spaltungsunabhängiger Prozess angewandt, bei dem die beiden Stränge durch eine noch nicht identifizierte Helikase entwunden werden [25, 36]. Der aktivierte RISC kann nun seine *target* mRNA binden. Dabei ist minimal die perfekte Komplementarität der Nukleotide 2 – 8 des *guide* Stranges ausreichend, um eine Bindung zu

vermitteln. Dieser Bereich wird als *seed* bezeichnet [80–82].

Der Mechanismus, mit dem die miRNA eine translationale Inhibition vermittelt, ist nicht vollständig verstanden. Bei einem sehr hohen Grad an Komplementarität zwischen *guide* und *target* RNA kann es analog zum siRNA-Weg zu einer sequenzspezifischen Spaltung der *target* RNA kommen [83, 84]. Vermutlich finden allerdings zwei alternative Prozesse wesentlich häufiger statt, die kontrovers diskutiert werden. Im einen Fall kommt es durch den aktiven RISC zur sterischen Blockade der Translationsmaschinerie, im anderen Fall kommt es vermutlich zur Deadenylierung, die die Degradation der *target* RNA nach sich ziehen kann [37]. In beiden Fällen wird der an die mRNA gebundene Komplex in Prozessierungskörperchen (PB) transloziert. Es wird diskutiert, ob dies der Speicherung von Transkripten dient oder sie dort sequenzunabhängig degradiert werden [37, 85, 86].

2.3 Die Familie der Argonaute Proteine

Unser Verständnis von der RNA-Interferenz ist eng verknüpft mit den Erkenntnissen über die zentrale katalytische Komponente des RISC, die Proteine der Argonaute Familie. Ihr Name stammt ursprünglich vom Phänotyp einer *A. thaliana* Ago1 Mutante, deren Blätter an den Tintenfisch *Argonauta argo* (Großes Papierboot) erinnerten [87]. Die Bezeichnung des Tieres geht auf die segelartige Verbreiterung seines ersten Armpaares zurück, in Anlehnung an das Schiff der Argonauten aus der griechischen Mythologie, die Argo.

Ago Proteine werden in drei paraloge Gruppen eingeteilt. Die Argonaute-ähnlichen Proteine leiten sich vom *A. thaliana* Ago1 ab, die PIWI-ähnlichen Proteine vom *D. melanogaster* PIWI Protein. Die dritte Gruppe findet sich ausschließlich in *C. elegans* [25]. Da Argonaute-ähnliche und PIWI-ähnliche Proteine in Bakterien, Archaebakterien und Eukaryoten vorkommen, gehen sie vermutlich auf einen gemeinsamen Vorfahr zurück [88]. Die Anzahl verschiedener Argonaute Gene variiert von Organismus zu Organismus (siehe Tabelle 2.1). Im Menschen finden sich deren acht, die für je vier Argonaute- und vier PIWI-ähnliche Proteine kodieren [89]. Pflanzen besitzen ausschließlich Proteine aus der Gruppe der Argonaute-ähnlichen Paraloge, wohingegen Amoebozoa nur für solche aus der PIWI-ähnlichen Gruppe kodieren [25].

Die verschiedenen Ago-Varianten eines Organismus sind eventuell durch Genduplikation entstanden. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit der Spezialisierung auf zelluläre Funktionen, wie es bei *C. elegans* der Fall ist. Die Nematode exprimiert 27 verschiedene Ago Proteine [90].

Computergestützte Analysen haben ergeben, dass der letzte gemeinsame Vorfahr der Eukaryoten bereits mindestens zwei verschiedene RNAi-Wege verwendete [88]. Das ursprüngliche Protein vom PIWI-Typ war vermutlich im Zellkern lokalisiert und vermittelte transkriptionelle Genregulation wie das Ausschalten von Transposons. Der Argonaute-ähnliche Paraloge könnte für die Regulation der Translation im Zytoplasma verantwortlich gewesen sein [25].

Argonaute Protein	Molekulare Funktion	Referenz
N. crassa		
QDE-2	*quelling*	[91, 92]
SMS-2	Ausschalten ungepaarter DNA in der Meiose	[93]
A. thaliana		
Ago1	miRNA-vermittelte RNAi, tasiRNA	[94, 95]
Ago4, Ago6	rasiRNA, Stilllegung von Heterochromatin	[44, 96]
Ago7	tasiRNA, Heteroblastie, Blattentwicklung	[44, 96]
C. elegans		
RDE-1	exogene siRNA-vermittelte RNAi	[90, 97]
ALG-1, ALG-2	miRNA-vermittelte RNAi, TGS	[98, 99]
ERGO-1	endogene siRNA-vermittelte RNAi	[90]
CSR-1	Chromosomensegregation, siRNA-vermittelte RNAi	[90]
SAGO-1, SAGO-2, PPW-1, PPW-2, F58G1.1, C16C10.3	endogene und exogene siRNA-vermittelte RNAi	[90, 100]
PRG-1	Keimbahnkontrolle	[101]
D. melanogaster		
Ago1	miRNA-vermittelte RNAi	[102]
Ago2	siRNA-vermittelte RNAi	[102, 103]
Ago3	piRNA, Transposonkontrolle	[104, 105]
PIWI	piRNA, Transposonkontrolle, Stammzellkontrolle in der Keimbahn	[104–106]
Aubergine	piRNA, Transposonkontrolle	[104, 105, 107]
H. sapiens		
Ago1	Heterochromatinkontrolle	[108, 109]
Ago2	miRNA- und siRNA-vermittelte RNAi, Heterochromatinkontrolle	[35, 108, 110]
Ago3, Ago4	unbekannt	[111]
Hiwi1, Hiwi2, Hiwi3, Hili	unbekannt	[111]

Tabelle 2.1: Argonaute-ähnliche und PIWI-ähnliche Proteine und ihre Funktion in verschiedenen Organismen. Sechs weitere Argonaute-ähnliche Proteine von *A. thaliana* sowie 15 weitere Ago Proteine von *C. elegans* ohne bekannte Funktion sind nicht aufgeführt. Modifiziert nach Hutvagner *et al.* [25].

Neben der in Abschnitt 2.2.2 erläuterten Rolle in der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi besitzen Ago Proteine weitere, zum Teil weniger gut verstandene Funktionen. In der Spalthefe *S. pombe* assoziiert Ago1 mit kurzen RNAs, die von im Zentromer angesiedelten repetitiven Sequenzen transkribiert werden, sogenannten *repeat-associated* (ra)siRNAs. Der Protein-Nukleinsäure-Komplex wird als *RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing* (RITS) Komplex bezeichnet. Er rekrutiert Methyltransferasen zu spezifischen genomischen Regionen, um dort durch die Methylierung von Lysin 9 des Histons H3 die Bildung von Heterochromatin zu induzieren [112]. Ähnliche Formen des *transcriptional gene silencing* (TGS) sind auch in Pflanzen und *C. elegans* bekannt. In *D. melanogaster* werden PIWI und Aubergine benötigt, um das Heterochromatin-spezifische HP1 in heterochromatischen Bereichen zu binden [113, 114]. Zusammen mit Ago3 sind sie weiterhin verantwortlich für die Kontrolle transposabler Elemente und die piRNA-abhängige Genregulation [105, 107, 115, 116]. Mittlerweile ist auch bekannt, dass Ago Proteine an der Biogenese kurzer regulatorischer RNAs beteiligt sind und somit einen Umgehungsmechanismus zur Prozessierung von Vorläufer-Molekülen durch Dicer darstellen. Im Zebrafisch *D. rerio* wird die pre-miRNA-451 durch Ago2 prozessiert, was vermutlich von der Sekundärstruktur der pre-miRNA abhängig ist. Defekte führen zu einer verlangsamten Erythropoese [117]. Mäuse, die homozygot für defekte Ago2-Allele sind, sterben nach der Geburt an Anämie und weisen keine mature miRNA-451 auf [118].

Wie bei vielen anderen Proteinen auch, stehen bei Ago Proteinen Struktur und Funktion in enger Beziehung. Obwohl in den letzten Jahren die Röntgen- und NMR-Strukturen einiger Ago Proteine publiziert wurden, stehen bisher strukturelle Daten für Homologe in voller Länge nur für drei Vertreter aus Archaebakterien bzw. Eubakterien zur Verfügung [26–28, 119, 120]. Im Unterschied zu den bekannten Argonauten aus höheren Organismen präferieren sie DNA als *guide* Stränge. Ihnen ist gemein, dass sie sich aus vier Domänen zusammensetzen: N-terminale Domäne, PAZ, Mid und PIWI. Diese verteilen sich auf zwei Lappen und werden durch eine basische Furche voneinander getrennt.

Weitere strukturelle Erkenntnisse stammen von einzelnen Domänen eukaryonter Ago Proteine: Die Röntgenkristallstrukturen der PAZ Domäne von *D. melanogaster* Ago1 und Ago2 sowie des humanen Ago1 und Hiwi1 und des murinen Proteins Miwi sind gelöst [121–127], ebenso wie die der Mid Domäne des humanen Ago2 und derjenigen des *N. crassa* Proteins QDE-2 allein [128, 129] sowie zusammen mit der PIWI Domäne [130]. All diese Studien zeigen, dass trotz geringer Sequenzhomologie einzelner Domänen und Proteine der verschiedenen Organismen die räumliche Anordnung ihrer Aminosäuren gut übereinstimmt. Aus diesem Grund lassen sich vergleichende Schlüsse zur humanen Familie der Argonaute-ähnlichen Proteine hAgo1 – 4 ziehen.

Im Folgenden werden die zur Verfügung stehenden strukturellen Informationen von homologen Proteinen in Kombination mit biochemischen und mutationsbasierten Analysen herange-

zogen, um die humanen Vertreter der Argonaute-ähnlichen Gruppe vorzustellen. Dabei wird besonderes Augenmerk auf hAgo2 gelegt. Anschließend werden Struktur und Funktion der vier Ago Domänen im Detail vorgestellt.

2.3.1 Das humane Argonaute2 Protein

Die Proteine hAgo1 – 4 besitzen mit ca. 860 Aminosäuren eine Größe von etwa 100 kDa (mit Ausnahme einer durch Translation ab einem alternativen Startcodon N-terminal verkürzten Variante von hAgo3, deren Molekulargewicht nur 71 kDa beträgt) und sind untereinander zu 77 – 84 % identisch. Im Gegensatz zur PIWI-Subfamilie, die hauptsächlich in den Hoden auftritt, werden sie ubiquitär exprimiert [89, 131, 132]. Liu *et al.* konnten anhand von immunpräzipitiertem myc-hAgo in 293T-Zellen zeigen, dass alle humanen Vertreter in der Lage sind, siRNAs zu binden. Allerdings besitzt nur hAgo2 endonukleolytische Aktivität [35]. Diese wird durch die katalytische Triade DDH innerhalb der PIWI Domäne vermittelt [62]. Zwar besitzt auch hAgo3 diese katalytische Triade, ist aber nicht zum *slicing* befähigt [35, 110]. Aus diesem Grund wird einzig hAgo2 eine Rolle in der siRNA-vermittelten RNAi zugesprochen. Die anderen drei Proteine übernehmen vermutlich Aufgaben bei der miRNA-vermittelten RNAi, allerdings ist ihre genaue Funktion nicht bekannt. Anders als bei *D. melanogaster* scheint es beim Menschen keine strikte Beschränkung einzelner Ago Proteine auf eine zelluläre Funktion zu geben.

hAgo2 wurde ursprünglich als eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2C2 (EIF2C2) entdeckt und ist auf Chromosom 8 kodiert [132]. Die intrazelluläre Lokalisation wird hauptsächlich als zytoplasmatisch beschrieben, wobei hAgo2 auch im Nukleus zu finden ist [136, 137]. Vermutlich sind die Lokalisation von hAgo2 und die Aktivität des RISC miteinander korreliert. hAgo2 konnte sowohl mit dem 80S Translationskomplex als auch den ribosomalen Proteinen L3 und L11 kogereinigt werden [138], womit RISC und die mRNA-Translation räumlich verknüpft werden können. Weiterhin wurde die Kolokalisation von hAgo2 mit Markerproteinen von Prozessierungskörperchen (*processing bodies*, PB) wie GW182 und Dcp 1/2 fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen [139]. PB sind mit mRNA-Deadenylierung und -Degradation assoziierte zytosolische Strukturen [140]. hAgo2 wurde in einer weiteren zytoplasmatischen Struktur, den Stressgranula (SG), identifiziert. Diese enthalten aus mRNAs, kleinen ribosomalen Untereinheiten und verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren bestehende blockierte Translationsinitiationskomplexe [141, 142]. Die Translokation von hAgo2 in SG ist vermutlich abhängig vom Hitzeschock-Protein 90 (Hsp90) und kann durch oxidativen und translationalen Stress induziert werden [143–145].

Die Lokalisation von hAgo2 in subzellulären Strukturen scheint durch posttranslationale Modifikationen und den daran beteiligten Signalkaskaden streng reguliert zu sein. Die Hydroxylierung von hAgo2 an Prolin-700 durch die Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase führt zu seiner Akkumulation in PB, ist verantwortlich für die Proteinstabilität und wirkt sich auf die Effi-

zienz der siRNA-vermittelten Gensuppression aus [135]. Die Phosphorylierung von Serin-387 durch den p38/MAPK-Signalweg erleichtert ebenfalls die Akkumulation von hAgo2 in PB [134].

Um seine vielfältigen Funktionen auszuführen, wird hAgo2 vermutlich durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen moduliert. Bislang ist die direkte Assoziation von hAgo2 mit einer Vielzahl an Faktoren nachgewiesen. Hierzu zählen neben den an der RNAi beteiligten Komponenten Dicer, TRBP und PACT [79, 146–148] die GW182-Paraloge TNRC6A und B [147, 149, 150], DCP1a und 2 [85], TTP [151], die Methyltransferase PRMT5 [147], der Translationsinitiationsfaktor eIF4E sowie Rck/p54 [152]. Die Details und Funktion dieser Interaktion sind bislang nicht ausreichend geklärt.

In Abbildung 2.2 A ist die Domänenstruktur von hAgo2 gezeigt und wichtige Aminosäuren sowie ihre Funktion sind gekennzeichnet. Abbildung 2.2 B zeigt in Ermangelung einer Röntgenkristallstruktur von hAgo2 die Struktur des *T. thermophilus* Ago Proteins im ternären Komplex mit einer 21nt langen *guide* DNA und einer 20 nt langen *target* RNA.

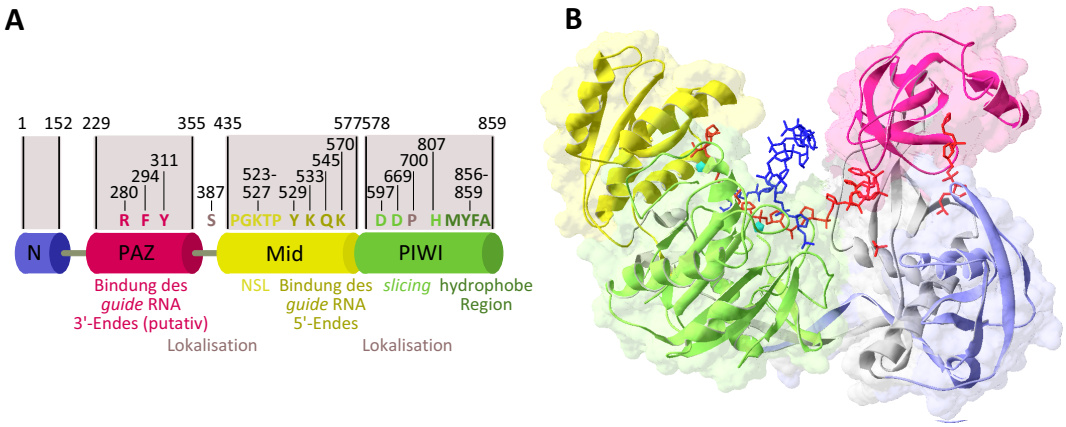


Abbildung 2.2: Struktur eines Argonaute Proteins. (A) Domänenstruktur von hAgo2. Die N-terminale, PAZ, Mid und PIWI Domäne umfassenden Aminosäuren sind angegeben [28]. Die PAZ Domäne beinhaltet drei Aminosäuren, die vermutlich an der Bindung des *guide* Strang-3'-Endes beteiligt sind [27]. In der Mid Domäne sind der *nucleotide specificity loop* (NSL) sowie für die Bindung des *guide* RNA-5'-Endes verantwortliche Aminosäuren lokalisiert [128, 130, 133]. Die katalytische Triade DDH liegt in der PIWI Domäne [62], ebenso wie der hydrophobe C-Terminus [130]. Die für die Translokation von hAgo2 modifizierten Aminosäuren sind in der Linker-Region zwischen PAZ und Mid sowie in der PIWI Domäne angesiedelt [134, 135]. Linker-Regionen sind als graue Stäbe dargestellt. (B) Röntgenkristallstruktur des *T. thermophilus* Argonaute Proteins im Komplex mit einer 21 nt langen *guide* DNA (rot) sowie einer 20 nt langen *target* RNA (blau), die am 10. und 11. Nukleotid nicht komplementär zueinander sind (PDB 3F73). Die Domänen sind analog zu (A) eingefärbt. Die lappenartige Anordnung von N-terminaler und PAZ Domäne sowie Mid und PIWI Domäne lässt Raum für eine basische Furche im Zentrum des Proteins, in der der Nukleinsäure-Hybrid gebunden wird. Die Mg^{2+}-Ionen innerhalb der Mid und PIWI Domäne sind als cyanfarbene Kugeln erkennbar.

2.3.2 Die N-terminale Domäne

Die N-terminale Domäne von hAgo2 umspannt die Aminosäuren 1 – 152 und ist durch eine Linker-Region mit der PAZ Domäne verbunden [28]. Sie ist die am wenigsten konservierte Domäne und besitzt demnach die größte Varianz zu den anderen drei hAgo-Proteinen. In Abbildung 2.3 ist stellvertretend die N-terminale Domäne des *T. thermophilus* Ago gezeigt. Neben zwei kurzen α-Helices werden sechs β-Faltblätter ausgebildet (siehe Abbildung 2.3 A). Vermutlich wird das erste Faltblatt β1 durch die PIWI Domäne stabilisiert.

Die Funktion der N-terminalen Domäne ist bislang unklar. Erste Hinweise ergeben sich aus einem ternären Komplex, bestehend aus *T. thermophilus* Ago, einem 21 nt langem *guide* Strang und einer 19 nt langen *target* RNA (siehe Abbildung 2.3 B). Der Hybrid aus *guide* und *target* bildet eine A-Form Helix, die allerdings – trotz perfekter Komplementarität – nur bis zur Position 16 reicht. Eine weitere Hybridisierung wird auf Grund der sterischen Hinderung durch die N-terminale Domäne inhibiert. Zwar können die folgenden Nukleotide auf Grund fehlender Elektronendichte nicht dargestellt werden, aber vermutlich kommt es an dieser Stelle zu einer Strangtrennung, so dass beide Stränge auf einer unterschiedlichen Seite der N-terminalen Domäne weiter geführt werden, ähnlich einem sich öffnenden Reißverschluss. In diesem Fall würde die N-terminale Domäne vermutlich die Freisetzung von Spaltprodukten erleichtern. Innerhalb der beteiligten α-Helix vermitteln Y43 und P44 den Kontakt zum Hybrid. Beide sind nicht konserviert [120, 153].

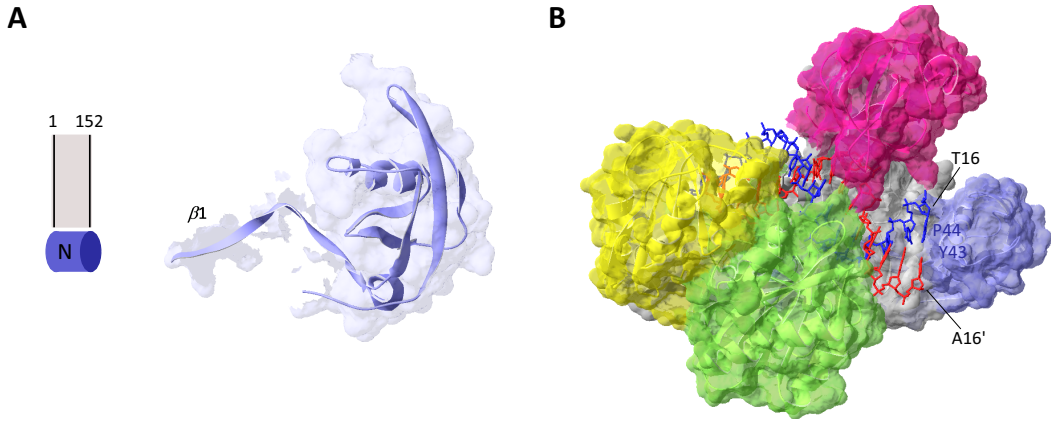


Abbildung 2.3: Die N-terminale Domäne. (A) Röntgenkristallstruktur der isolierten N-terminalen Domäne aus einem ternären Komplex von *T. thermophilus* Argonaute, einer 21 nt langen *guide* DNA sowie einer 20 nt langen *target* RNA (PDB 3F73). Das Faltblatt β1 bildet einen Kontakt zur PIWI Domäne. (B) Röntgenkristallstruktur des *T. thermophilus* Argonaute Proteins im Komplex mit einer 21 nt langen *guide* DNA (rot) sowie einer 19 nt langen *target* RNA (blau) (PDB 3HK2). Watson-Crick-Basenpaarungen werden nur bis Position 16 (T16 – A16') gebildet, darüber hinaus sind die Nukleotide ungeordnet. Der Kontakt mit dem Protein wird über Y43 und P44 in einer α-Helix vermittelt. Blau: N-terminale Domäne. Magenta: PAZ Domäne. Gelb: Mid Domäne. Grün: PIWI Domäne.

2.3.3 Die PIWI Argonaute Zwille (PAZ) Domäne

PAZ Domänen finden sich in den drei Proteinfamilien PIWI, Argonaute und Zwille, wonach sich ihr Name begründet. Außerdem tragen Proteine der Dicer Familie eine PAZ Domäne. Die PAZ Domäne der Ago Proteine wurde initial durch phylogenetische Sequenzanalysen entdeckt [154]. Sie nimmt eine Oligonukleotid/Oligosaccharid-Bindung (OB)-ähnliche Faltung ein [121, 123, 124] (siehe Abbildung 2.4 A). Dieses Motiv ist in der Lage, die 2 nt langen Überhänge zu binden, die für miRNAs und siRNAs charakteristisch und Folge der Prozessierung ihrer Vorläufer-Moleküle durch Dicer sind (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Bindung findet mit geringer Affinität und unabhängig von der Nukleotidsequenz statt [121–123, 125].

Obwohl strukturelle Informationen über eine Reihe von PAZ Domänen zur Verfügung stehen, sind die Arbeiten von Ma *et al.* über hAgo1 am relevantesten für die Informationsgewinnung über die hAgo2 PAZ Domäne einzuschätzen, da beide zu über 88 % identisch sind. Es gelang die Kokristallisation der hAgo1 PAZ Domäne im Komplex mit einem siRNA-ähnlichen 9-mer [125]. Die Arbeit zeigt, dass die PAZ Domäne eine Tasche beinhaltet, die mit aromatischen Aminosäureresten ausgekleidet ist und den 2 nt langen Überhang des 9-mer Hybrides bindet (siehe Abbildung 2.4 B). Zwar werden keine sequenzspezifischen Kontakte gebildet, allerdings stößt das terminale Nukleotid U9 gegen den konservierten aromatischen Ring von F292. Diese Aminosäure ist ebenso wie Y309, F310 und K311 in den PAZ Domänen von hAgo1 und hAgo2 identisch.

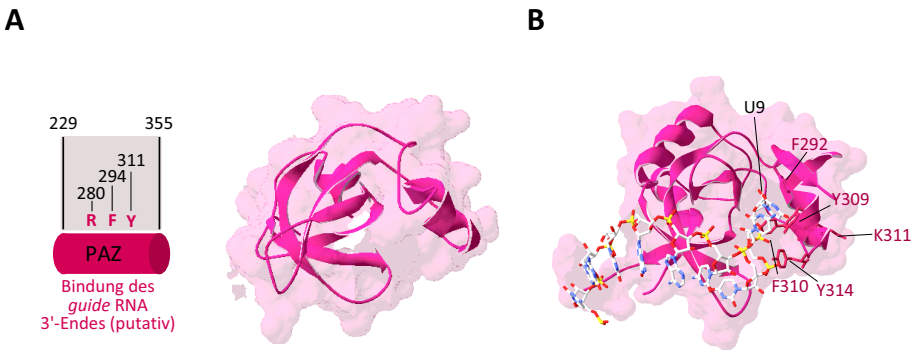


Abbildung 2.4: Die PAZ Domäne. (A) Röntgenkristallstruktur der isolierten PAZ Domäne aus einem ternären Komplex von *T. thermophilus* Argonaute, einer 21 nt langen *guide* DNA sowie einer 20 nt langen *target* RNA (PDB 3F73). Die hervorgehobenen Aminosäuren R280, F294 und Y311 wurden durch einen Vergleich mit strukturellen Daten des *A. aeolicus* Ago als möglicherweise an der Bindung des *guide* RNA-3'-Endes vorhergesagt [27]. (B) Röntgenkristallstruktur der hAgo1 PAZ Domäne im Komplex mit einem siRNA-ähnlichen RNA 9-mer (PDB 1SI3). Die Aminosäuren F292, Y309, F310, K311 und Y314 kleiden die Bindetasche für das 3'-Ende der *guide* RNA aus. Das terminale U9 bildet einen Kontakt zum aromatischen Ring des konservierten F292 aus. Phosphate sind gelb, Sauerstoff rot, Stickstoff blau und Kohlenstoff weiß gefärbt.

Es wird diskutiert, dass der initiale Kontakt von siRNA bzw. miRNA und Ago durch die PAZ Domäne vermittelt wird. Die Bindung des *guide* Strang-3'-Endes könnte der Unterscheidung zwischen einem funktionellen siRNA-Substrat und degradierter RNA dienen [25].

2.3.4 Die *middle* (Mid) Domäne

Die erste Röntgenkristallstruktur des *P. furiosus* Ago zeigte, dass dasjenige Sequenzmotiv, das ursprünglich als PIWI Domäne definiert worden war [154], tatsächlich zwei Domänen enthielt (Mid und PIWI), die teilweise über eine hydrophobe Kontaktfläche miteinander verbunden sind [26]. Diese Fläche wird partiell durch den hydrophoben C-Terminus des Proteins gebildet. Dabei koordiniert im *T. thermophilus* Ago die terminale Aminosäure V685 ein Mg^{2+}-Ion, welches an der Verankerung des 1. und 3. Nukleotides des *guide* Stranges beteiligt ist (siehe Abbildung 2.5 B) [28]. Die Mid Domäne nimmt eine Rossman-ähnliche Faltung ein, bei der ein aus vier Strängen bestehendes zentrales β-Faltblatt von zwei α-Helices flankiert wird (siehe Abbildung 2.5 A) [128, 129].

Die Mid Domäne beinhaltet eine stark basische Tasche, in der das 5'-terminale Nukleotid des *guide* Stranges verankert wird. Die Kontakte werden über die 5'-Phosphatgruppe vermittelt [28, 119, 128, 129, 133, 155]. Durch die Bindung wird das erste Nukleotid des *guide* Stranges aus dem Hybrid mit dem *passenger* Strang gelöst sowie am Phosphatrückgrat geknickt (siehe Abbildung 2.5 B) [133, 155]. Diese strukturellen Informationen decken sich mit Analysen,

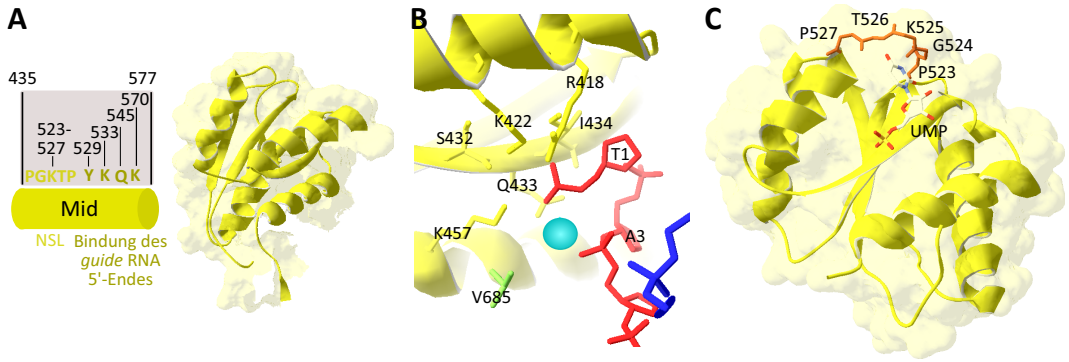


Abbildung 2.5: Die Mid Domäne. (A) Röntgenkristallstruktur der isolierten Mid Domäne aus einem ternären Komplex von *T. thermophilus* Argonaute, einer 21 nt langen *guide* DNA sowie einer 20 nt langen *target* RNA (PDB 3F73). Die Aminosäuren P523 – P527 bilden den *nucleotide specificity loop* (NLS) [128]. Die Aminosäuren Y529, K533, Q545 und K570 wurden durch einen Vergleich mit strukturellen Daten der hAgo1 Mid Domäne als vermutlich an der Bindung des *guide* RNA-5'-Endes vorhergesagt [133]. (B) Vergrößerungsausschnitt der Mid Bindetasche im Komplex mit dem 5'-Ende der *guide* DNA (rot) sowie der *target* RNA (blau) aus (A). Diejenigen Aminosäuren, die die Bindetasche auskleiden, sind hervorgehoben (ebenso V685, das zur PIWI Domäne gerechnet wird, grün). Das Mg^{2+}-Ion (cyanfarben) koordiniert die Phosphatgruppe des 1. (T1) und 3. (A3) *guide* Strang-Nukleotides. (C) Röntgenkristallstruktur der hAgo2 Mid Domäne im Komplex mit einem UMP (PDB 3LUJ). Die Aminosäuren des NSL sind dargestellt und ihr Peptidrückgrat in orange hervorgehoben. Phosphate sind gelb, Sauerstoff rot, Stickstoff blau und Kohlenstoff weiß gefärbt.

in denen das erste Nukleotid des *guide* Stranges in die Erkennung und Bindung der *target* RNA nicht involviert ist [63, 82, 156]. Durch die Verankerung des *guide* Stranges und die Bildung von Watson-Crick-Basenpaarungen mit der *target* mRNA wird diese an definierter Stelle gespalten. Die Mid Domäne ist also Teil des intrinsischen molekularen Lineals von Ago Proteinen.

In *N. crassa* QDE-2 wurde eine zweite Tasche identifiziert, die putativ an ein allosterisch wirkendes Nukleotid binden kann [129]. Allosterische Regulation der RNA-Bindung wurde bereits früher beobachtet [157] und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Strukturelle Analysen der Mid Domäne von hAgo2 haben ergeben, dass über den rigiden *nucleotide specificity loop* (NSL) mittels des Peptidrückgrates zwischen den vier möglichen Nukleotiden am 5'-Ende des *guide* Stranges diskriminiert wird (siehe Abbildung 2.5 C). Dieses Motiv ist bei QDE-2, dem homologen Protein aus *N. crassa*, um eine Aminosäure verlängert und trägt nicht zur Substratselektivität bei [128, 129, 158]. In *A. thaliana* werden bestimmte kleine regulatorische RNAs auf Grund ihrer verschiedenen 5'-Nukleotide auf distinkte Ago Proteine geladen [159, 160]. Die Diskriminierung zwischen verschiedenen Substraten eröffnet die Möglichkeit zur Spezialisierung eines oder mehrerer Ago Proteine innerhalb des Organismus.

Über die Mid Domäne werden einige vom *slicing* unabhängige Funktionen vermittelt. In *S. pombe* bildet das im RITS Komplex enthaltene Protein Tas3 den „Ago Haken", mit dem es an die Mid Domäne bindet, was zum effektiven TGS führt. Die verantwortlichen Aminosäuren sind im Menschen konserviert [161]. Außerdem enthält die Mid Domäne einen konservierten Bereich, der Homologie zum m^7G *cap* Bindemotiv von eIF4E aufweist. Es wird diskutiert, ob Ago um die mRNA-Bindung mit eIF4E in Kompetition treten und dadurch sequenzspezifisch die Translation hemmen kann [55, 158, 162].

2.3.5 Die *P-element induced wimpy testis* (PIWI) Domäne

Die C-terminale PIWI Domäne (siehe Abbildung 2.6 A) vermittelt die katalytische Funktion von hAgo2. Ihre Faltung erinnert an die RNase H [26, 27, 62, 164], eine zelluläre Endonuklease, die DNA-RNA-Hybride erkennt und die RNA-Komponente spaltet [165]. Wie bei der RNase H bilden drei distinkte Aminosäuren die Katalytische Triade: D597, D669, H807 [26, 62]. Außerdem sind beide Enzyme von Mg^{2+} abhängig und generieren typische Spaltprodukte mit 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Termini (siehe Abbildung 2.6 B) [163, 166–168].

Der hydrophobe C-Terminus des Proteins ist an der Kontaktfläche von Mid und PIWI Domäne lokalisiert. Er trägt zur Bindung des 5'-Endes des *guide* Stranges bei (siehe Abschnitt 2.3.4). Die kürzlich publizierte Röntgenkristallstruktur des die Mid und PIWI Domäne enthaltenden Lappens von QDE-2 aus *N. crassa* enthüllte die Existenz zweier α-Helices innerhalb der PIWI Domäne, die in prokaryoten Agos bisher nicht entdeckt worden waren. Sie umfassen die Aminosäuren K901 – G925. Es wird diskutiert, ob diese C-terminale Insertion bei bestimmten Proteinkonformationen Kontakt zur PAZ Domäne herstellen und dadurch als Sensor für

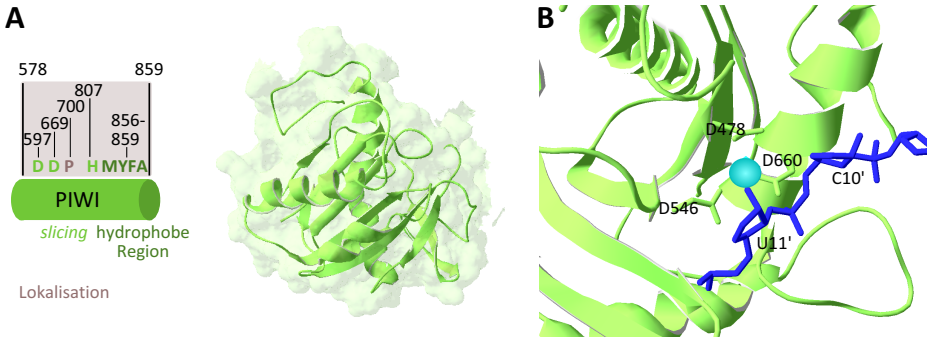


Abbildung 2.6: Die PIWI Domäne. (A) Röntgenkristallstruktur der isolierten PIWI Domäne aus einem ternären Komplex von *T. thermophilus* Argonaute, einer 21 nt langen *guide* DNA sowie einer 20 nt langen *target* RNA (PDB 3F73). Die hervorgehobenen Aminosäuren D597, D669 und H807 bilden die Katalytische Triade von hAgo2 [62]. P700 ist an der zellulären Lokalisation von hAgo2 beteiligt [135]. Der hydrophobe C-Terminus bildet einen Teil der Kontaktfläche zur Mid Domäne und ist vermutlich an der Bindung des *guide* RNA-5'-Endes beteiligt [130]. (B) Vergrößerungsausschnitt des aktiven Zentrums innerhalb der PIWI Domäne aus (A). Die *target* RNA (blau) wird zwischen C10' und U11' in räumliche Nähe zur Katalytischen Triade gebracht, die im *T. thermophilus* Ago aus D478, D546 und D660 besteht. Das Mg^{2+}-Ion (cyanfarben) ist essentiell für die endonukleolytische Spaltung [163].

den funktionellen Status von Ago dienen kann [130]. Weiterhin enthält die PIWI Domäne die Aminosäure P700, die eine Rolle bei der Lokalisation von hAgo2 in PB spielt (siehe Abschnitt 2.3.1).

Neben der katalytischen Aktivität könnte die PIWI Domäne auch eine Rolle bei der *target* Erkennung spielen. Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass es in *C. elegans* nach der Bindung der *guide* RNA durch ein Ago Protein zum Arrangement des *seed* Bereiches kommt, so dass die Basen gut zugänglich werden für eine Interaktion mit der *target* RNA [169]. Für *T. thermophilus* Ago im Komplex mit einer 21 nt langen *guide* DNA und einer 20 nt langen *target* RNA konnten Wang *et al.* zeigen, dass die Aminosäuren R580, T613, R615, R651, H657, R661 und V685 innerhalb der PIWI Domäne an der Koordination des Phosphatrückgrates der *guide* DNA beteiligt sind [119].

2.4 Die strukturellen und molekularen Grundlagen der siRNA-vermittelten RNAi

2.4.1 Anforderungen an kleine regulatorische RNAs und *target* RNAs

Neben dem Ago Protein spielt die kleine regulatorische RNA, mit der das Effektorenzym programmiert wird, innerhalb des RISC eine entscheidende Rolle. Dabei müssen siRNAs und miRNAs eine Reihe von Kriterien erfüllen.

Zunächst ist es im zellulären Kontext unabdingbar, dass regulatorische RNAs – vor al-

lem exogene – nicht als pathogen erkannt werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass siRNAs weder eine Interferonantwort noch die Aktivierung des Immunsystems über den *Toll-like* Rezeptor (TLR) 3 auslösen [12, 13]. Dadurch unterscheiden sie sich von langen doppelsträngigen RNA-Molekülen. Ihre charakteristischen 2 nt langen Überhänge an beiden Enden machen siRNAs und miRNAs weiter unterscheidbar zu dsRNA-Fragmenten, die durch Degradation entstehen und sorgen durch ihre Assoziation mit der PAZ Domäne für eine zielgerichtete Programmierung des RISC [25].

Die 5'-Phosphatgruppe von siRNAs und miRNAs, die durch ihre Biogenese bedingt bzw. im Falle von exogenen siRNAs Folge von Phosphorylierung im Zellinneren sind, ist eminent wichtig für einen effektiven Einbau in den RISC [30, 32, 35, 170]. Darüber hinaus wird die Phosphatgruppe für die Genauigkeit des *target* RNA *slicing* benötigt, da die Position der Spaltstelle von der sicheren Verankerung des *guide* Stranges abhängig ist [12, 32, 62]. Die Maskierung des 5'-Endes eines *guide* Stranges führt zu einer signifikant reduzierten Genregulation, wohingegen die Modifikation des *passenger* Strang-5'-Endes keinen Effekt auf die RNAi besitzt. Hingegen werden Modifikationen des 3'-Endes beider Stränge gut toleriert [170–173]. Klassischerweise tragen die 3'-Enden von siRNAs und miRNAs eine OH-Gruppe, während piRNAs 2'-O-Methyl-Gruppen präferieren [174–176].

Im Gegensatz zu den prokaryoten Homologen, deren *guide* Stränge aus DNA bestehen, verwenden eukaryote Ago Proteine *guide* RNAs. Der wichtigste Grund hierfür liegt vermutlich in den strukturellen Unterschieden der beiden Nukleinsäureklassen begründet. RNA-Helices nehmen eine rechtsgängige A-Form Helix mit 11 bp pro Drehung und einem Durchmesser von 23 Å ein. Dagegen bilden DNA-Duplexe eine rechtsgängige Helix in B-Form, die mit 10 bp pro Umdrehung und 20 Å Durchmesser kleiner ist. Weiterhin besitzt die Ribose der A-Form Helix eine C3'-Endo-, diejenige der B-Form Helix eine C2'-Endo-Konformation. Dies führt zu einer kompakteren Packung der A-Form Helix, und obwohl in einer Umdrehung ein Nukleotid mehr untergebracht ist, ist die Länge der Umdrehung entlang der Achse mit 28 Å kürzer als bei der B-Form Helix mit 34 Å. Die dichte Packung führt zu einer engen und tiefen großen Furche, in der funktionelle Gruppen für Proteininteraktionen schlecht zugänglich sind [22, 170, 177].

Die regulatorischen RNAs liegen in der Zelle in doppelsträngiger Form vor, der aktive RISC enthält jedoch nur den *guide* Strang. Für die Auswahl des einzubauenden Stranges gilt die Instabilitätsregel: Es wird derjenige Strang als *guide* in Ago geladen, dessen 5'-Ende die größere thermodynamische Instabilität aufweist [178, 179]. In *D. melanogaster* bestimmt der Grad an Fehlpaarung zwischen *guide* und *passenger* RNA in siRNAs und miRNAs, ob der *guide* Strang mit Ago1 oder Ago2 assoziiert [180, 181].

Die letzte wichtige Komponente ist die zu regulierende *target* mRNA. Auch sie besitzt gewisse charakteristische Merkmale. So muss sie eine oder mehrere Erkennungssequenzen besitzen, die teilweise oder perfekt komplementär zum im RISC geladenen *guide* Strang sind. Diese Sequenzen liegen häufig im 3'-UTR der mRNA [16]. Die *target* RNA kann nur dann effektiv

reguliert werden, wenn die Erkennungssequenz zugänglich und nicht durch Sekundärstrukturen oder mit der mRNA assoziierten Proteinen blockiert ist [182–185].

Für effizientes *slicing* der *target* RNA spielt die Ausbildung einer A-Form Helix zwischen *guide* und *target* Strang eine übergeordnete Rolle [63, 170, 186]. Es werden nur solche Fehlpaarungen oder Modifikationen innerhalb von siRNAs toleriert, die die A-Form Geometrie zwischen *guide* und *target* RNA nicht unterbinden [22]. Wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, sind auch miRNAs in der Lage, in siRNA-ähnlicher Weise die Spaltung von *target* RNAs zu vermitteln [61, 84, 187]. Analog dazu führt die Störung der A-Form Helix zwischen einer siRNA-abgeleiteten *guide* RNA und ihrem *target* zu einer von Spaltung unabhängigen Gensuppression [188, 189].

2.4.2 Molekulare Dynamik von Ago während der Erkennung und Spaltung von *target* RNA

Die Erkennung und Spaltung von *target* RNA ist ein Prozess, der sich minimal in folgende Schritte unterteilen lässt: (i) Die Bildung eines aus Ago und *guide* Strang bestehenden binären Komplexes, (ii) die Erkennung und Bindung der komplementären *target* RNA mit der verbundenen Assoziation des ternären Komplexes, (iii) die sequenzspezifische Endonukleolyse der *target* RNA und (iv) die Freisetzung der Spaltprodukte aus dem Komplex (siehe Abbildung 2.7). Während dieses Prozesses muss Ago an verschiedene Partner binden und einen katalytischen Schritt ausführen. Dafür bedarf es eines hohen Maßes an Flexibilität. Ming *et al.* konnten auf Basis der *P. furiosus* und *A. aeolicus* Ago Strukturen mit Hilfe computergestützter Analysen zeigen, dass die vier Domänen Vibrations-, Rotations- und Translationsbewegungen ausführen, um beispielsweise das Volumen der Bindungsfurche zu verändern [190]. Die Röntgenkristall-

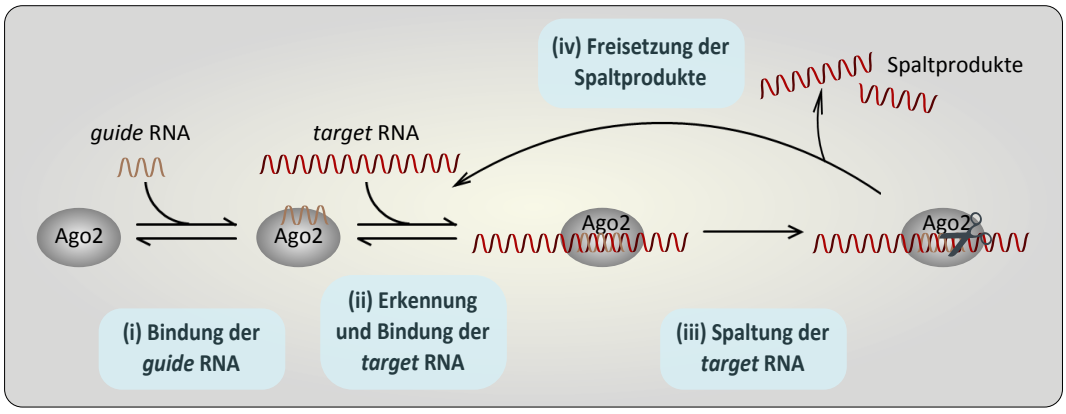


Abbildung 2.7: Schema des minimalen RNAi-Prozesses. Initial kommt es zur Bildung eines binären Komplexes aus Ago und einer *guide* RNA (i). Danach erfolgt die Erkennung und Bindung der komplementären *target* RNA und somit zur Assemblierung des ternären Komplexes (ii). Die *target* RNA wird gespalten (iii) und die Spaltprodukte freigesetzt (iv), wodurch der binäre Komplex regeneriert wird und erneut eine *target* RNA binden kann.

strukturen des *T. thermophilus* Ago im Komplex mit verschiedenen Nukleinsäuren geben nun detaillierten Einblick in die strukturellen Voraussetzungen für die molekulare Dynamik eines Argonaute Proteins an Schlüsselstellen der siRNA-vermittelten RNAi [153].

Das Apo-Enzym wird am ehesten durch *T. thermophilus* Ago repräsentiert, das an einen 10-mer *guide* Strang gebunden vorliegt, da eine Röntgenstruktur von *T. thermophilus* Ago in Abwesenheit einer Nukleinsäure nicht existiert (siehe Abbildung 2.8 A) [28].

Der binäre Komplex entspricht dem mit einer 21 nt langen *guide* DNA komplexierten Protein (siehe Abbildung 2.8 B). Apo-Enzym und binärer Komplex unterscheiden sich in ihrer Konformation, wie die Überlagerung beider Komplexe zeigt. Im Verhältnis zur PIWI Domäne kommt es auf Grund der *guide* Strang-Bindung zu einer Rotation der Mid Domäne um 22 °, was zu einer Verlängerung der basischen Bindungsfurche zwischen den beiden Lappen um 8 Å führt. Weiterhin dreht sich die PAZ Domäne relativ zur PIWI Domäne um 25 ° und verengt dadurch die Bindungsfurche, resultierend in einem festen Kontakt zur *guide* DNA, die für eine *target* RNA-Interaktion ausgerichtet ist. Unerwarteterweise führt die räumliche Ausrichtung von R548 dazu, dass sich die 10. und 11. Base der *guide* DNA orthogonal anordnen. Für eine korrekte Positionierung der *target* RNA muss also zuvor eine konformationelle Änderung durchlaufen werden, um die räumliche Nähe des zu spaltenden Phosphates zum aktiven Zentrum zu gewährleisten [28].

Der ternäre Komplex wird durch drei molekulare Bilder beschrieben [153]. Im ersten Fall liegt der binäre Komplex an eine 12 nt lange *target* RNA gebunden vor. Der Komplex beschreibt den Prozess der *target* RNA-Erkennung, bei dem zunächst Watson-Crick-Basenpaarungen im *seed* Bereich gebildet werden (siehe Abbildung 2.8 C). Beim Übergang vom binären zum im *seed* Bereich gepaarten ternären Komplex kommt es zu einer konformationellen Änderung des Proteins, bei dem R548 verlagert wird. Gleichzeitig verschiebt sich der die N-terminale und PAZ Domäne enthaltende Lappen für eine Öffnung der basischen Bindungsfurche. Somit wird eine lineare Ausrichtung der *guide* DNA und die effektive Bindung der *target* RNA ermöglicht. Im zweiten Fall beinhaltet der ternäre Komplex ein 15-mer, repräsentativ für die folgende Hybridisierung zwischen *guide* und *target* über den *seed* Bereich hinaus (siehe Abbildung 2.8 D). Die Ausbildung dreier zusätzlicher Basenpaare führt zu einer Rotation der PAZ Domäne und der Erweiterung der Bindungsfurche zwischen N-terminaler und PIWI Domäne, was durch konformationelle Änderungen von Bereichen der PIWI Domäne stabilisiert wird. Gleichzeitig kann das 3'-Ende der *guide* DNA seine Bindetasche in der PAZ Domäne nicht länger erreichen und wird aus dieser entlassen. Das dritte molekulare Bild, ein 19-mer als *target* RNA im ternären Komplex, repräsentiert den katalytisch kompetenten Status (siehe Abbildung 2.8 E). Beim Übergang zu diesem Komplex kommt es nur zu geringen konformationellen Änderungen [120].

Die strukturellen Daten unterstützen das ursprünglich von Tomari und Zamore postulierte *two state* Modell, nach dem das 3'-Ende des *guide* Stranges während des RNAi-Zyklus dyna-

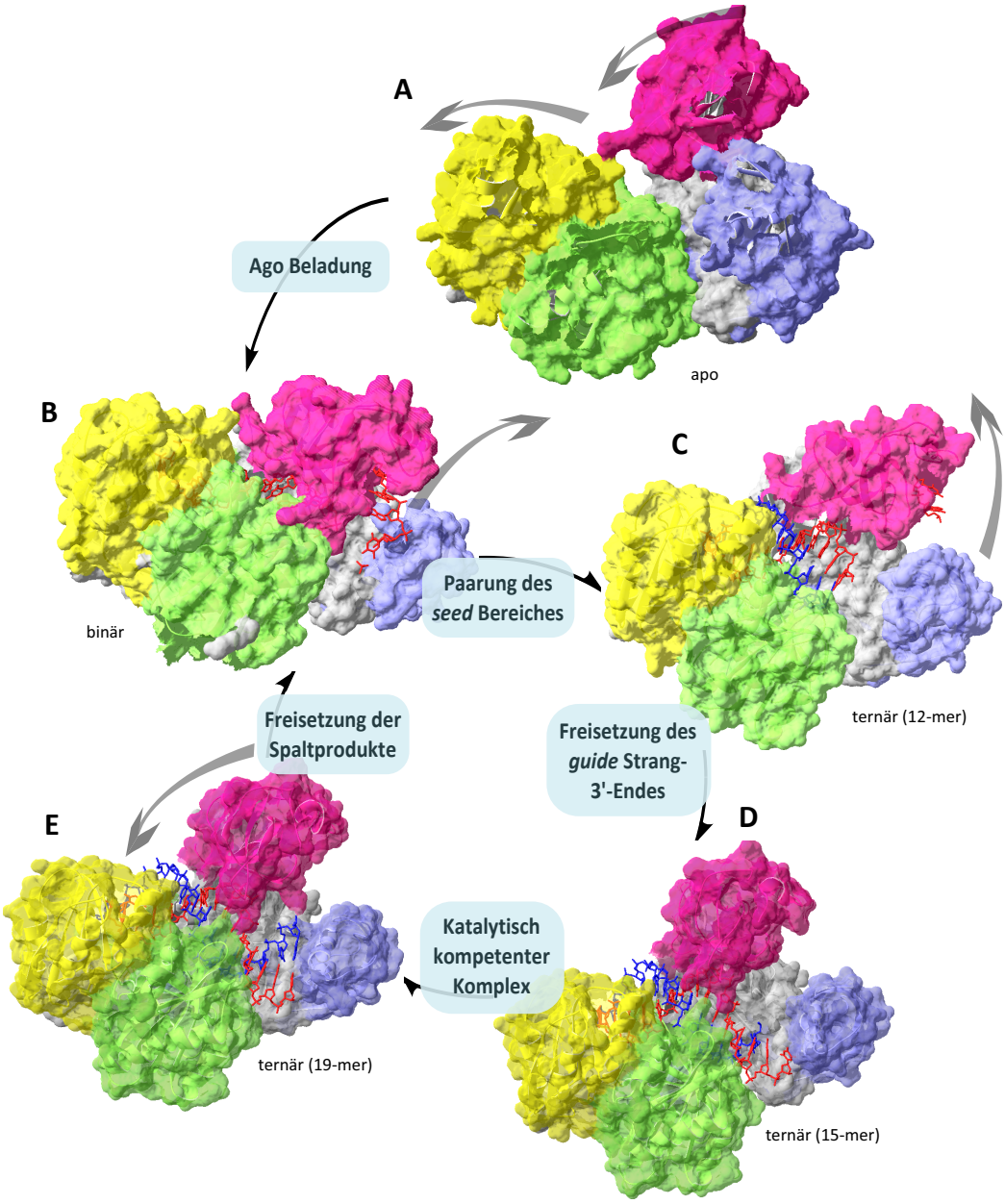


Abbildung 2.8: Strukturelle Momentaufnahmen des *T. thermophilus* Ago Proteins während der RNAi. Es sind die Röntgenkristallstrukturen der Komplexe gezeigt, die die Schlüsselschritte der RNAi am ehesten repräsentieren. Große konformationelle Änderungen einzelner Domänen sind durch Blockpfeile angezeigt. (A) Apo-Enzym (apo), dargestellt durch den Komplex von Ago und einer 10-mer DNA (PDB 3DLB). (B) Binärer Komplex (binär), dargestellt durch den Komplex von Ago und einer 21-mer *guide* DNA (PDB 3DLH). (C) Ternärer Komplex (ternär (12-mer)), dargestellt durch den Komplex von Ago, einer 21-mer *guide* DNA und einer 12 nt langen *target* RNA (PDB 3HO1). (D) Ternärer Komplex (ternär (15-mer)), dargestellt durch den Komplex von Ago, einer 21-mer *guide* DNA und einer 15 nt langen *target* RNA (PDB 3HJF). (E) Ternärer Komplex (ternär (19-mer)), dargestellt durch den Komplex von Ago, einer 21-mer *guide* DNA und einer 19 nt langen *target* RNA (PDB 3HK2). Blau: N-terminale Domäne. Magenta: PAZ Domäne. Gelb: Mid Domäne. Grün: PIWI Domäne. Rot: *guide* DNA. Dunkelblau: *target*. Abbildung modifiziert nach Parker [153].

misch durch die PAZ Domäne gebunden und freigesetzt wird, während das 5'-Ende in der Mid Domäne verankert bleibt [191]. Es erklärt die initiale Assoziation der *target* RNA mit dem *seed* Bereich des *guide* Stranges im Zustand, in dem beide Enden fest gebunden sind und die anschließende Hybridisierung beider Stränge, für die freie Beweglichkeit eine Voraussetzung ist. Abbildung 2.8 zeigt beide Zustände: im binären Komplex (B) und im das 12-mer enthaltenden ternären Komplex (C) ist das 3'-Ende des *guide* Stranges verankert. In den beiden anderen ternären Komplexen (D und E) ist das 3'-Ende nicht länger durch Ago gebunden [153]. Bei Fehlpaarungen zwischen dem 10. und 11. Nukleotid des *guide* Stranges und der *target* RNA wird das 3'-Ende nicht aus der PAZ Domäne entlassen (siehe Abbildung 2.2 B). Dieser Zustand spiegelt vermutlich einen miRNA-enthaltenden RISC wider und entspricht dem *fixed-end* Modell [119, 153].

2.5 Die Kinetik der siRNA-vermittelten RNAi

2.5.1 Die kinetische Kontrolle der RNAi

Es sind seit der Entdeckung der RNAi im Jahr 1998 unzählige Publikationen erschienen, die das Wissen um diesen fundamentalen Genregulationsprozess vergrößert haben wie in kaum einem anderen Feld der Biologie. Dennoch bleibt das Verständnis des Effektorschrittes – also die Erkennung der *target* RNA durch einen binären Ago/*guide* RNA-Komplex und dessen Spaltung mit anschließender Regenerierung des binären Komplexes – aus biochemischen und kinetischen Gesichtspunkten bislang lückenhaft. Rana unterteilte vereinfachend die Beladung und Funktion des RISC in zwei katalytisch kontrollierte Schritte mit jeweiligem Kontrollpunkt: zum Einen die Beladung des RISC und zum Anderen die Bindung der *target* RNA, ihre Spaltung und die Freisetzung der Spaltprodukte. Er schloss jedoch nicht aus, dass diese Schritte in weitere katalytisch kontrollierte Prozesse untergliedert sein können [22].

Der erste Schritt umfasst die Beladung des RISC mit einer doppelsträngigen siRNA, gefolgt von der Spaltung und Freisetzung des *passenger* Stranges, was zum Einbau des *guide* Stranges in Ago führt (siehe Abbildung 2.9 A). Der zweite Schritt beinhaltet die Erkennung und Bindung der *target* RNA, ihre Spaltung und die Freisetzung der Produkte (siehe Abbildung 2.9 B). In beiden Fällen bestehen die Teilprozesse aus einer Bindungsreaktion, gefolgt von einem katalytischen Schritt, der durch die Wechselzahl k_{cat} charakterisiert wird.

Bislang ist für beide Schritte nicht eindeutig geklärt, welcher Teilprozess den limitierenden Faktor darstellt. Allerdings kann der erste Schritt beschleunigt werden, indem thermodynamisch instabile siRNAs für die RISC-Beladung eingesetzt werden [178, 179, 186, 192–197]. Wäre dies der einzige limitierende Faktor, müssten alle Komplexe, die mit unterschiedlicher siRNA programmiert sind, ihre *target* RNA mit der gleichen Effizienz spalten, was nicht der Fall ist. Daher postulierte Rana, dass die katalytische Kontrolle des zweiten Schrittes einen kritischen Parameter für eine effiziente RNAi unter physiologischen Bedingungen darstellt.

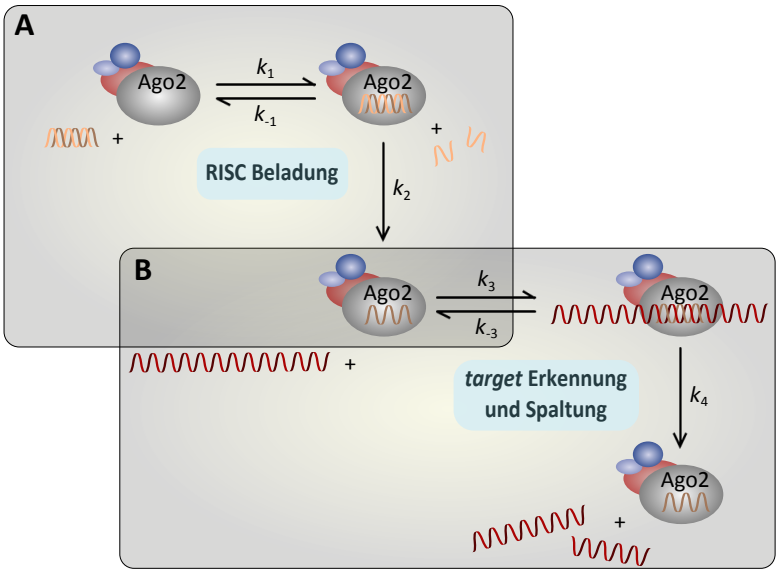


Abbildung 2.9: Kinetische Kontrollpunkte der Assemblierung und Funktion des RISC. Vereinfachende Darstellung der RNAi in zwei kinetisch kontrollierten Schritten, die jeweils einem Kontrollpunkt unterliegen. (A) Assemblierung des RISC mit einer doppelsträngigen siRNA und Spaltung des *passenger* Stranges. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt kann durch die thermodynamischen Eigenschaften der siRNA beeinflusst werden [178, 179, 186, 192–197]. (B) Bindung der *target* RNA und ihre Spaltung. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt kann durch verschiedene Faktoren wie die Sekundärstruktur der *target* RNA oder die Produktfreisetzung beeinflusst werden [183–185]. Abbildung modifiziert nach Rana [22].

Hierbei sind zwei Szenarien vorstellbar: Die Zugänglichkeit der Erkennungssequenz innerhalb der *target* RNA und somit ihre Bindung oder die *target* RNA-Spaltung und Freisetzung der Produkte können limitierend sein [22].

2.5.2 Vergleichende Analyse der Katalyse durch RISC

Erste Untersuchungen zur Beladung eines rekombinanten Ago Proteins wurden durch Rashid *et al.* durchgeführt. Dabei verwendeten sie das bakterielle *A. aeolicus* Ago in Kombination mit einzelsträngigen DNAs verschiedener Länge (9 nt, 15 nt und 21 nt). Sie beobachteten einen zweiphasigen Verlauf der Bindungsreaktion ohne Abhängigkeit von der *guide* DNA-Länge [198]. Lima *et al.* untersuchten neben der Affinität von in *D. melanogaster* Sf9 Zellen rekombinant exprimiertem, affinitätsgereinigtem GST-hAgo2 zu verschiedenen siRNA-Substraten die Kinetik der Bindungsreaktion. Für eine 19 nt lange *guide* RNA mit 5'-Phosphatgruppe ermittelten sie einen einphasigen Verlauf mit $k_1 = 1{,}2 \times 10^5\,\mathrm{M^{-1}s^{-1}}$ und $k_{-1} = 6{,}8 \times 10^{-3}\,\mathrm{s^{-1}}$. Für das gleiche Substrat ohne Phosphatgruppe am 5'-Ende betrugen $k_1 = 3{,}1 \times 10^5\,\mathrm{M^{-1}s^{-1}}$ und $k_{-1} = 9{,}9 \times 10^{-2}\,\mathrm{s^{-1}}$. Die Abwesenheit der kritischen Phosphatgruppe führte also zu einer Beschleunigung der Dissoziation um das 15-fache [199].

Bei der Bestimmung biochemischer Parameter der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spal-

tung können Abweichungen leicht durch die Verwendung verschiedener Systeme entstehen. Brown *et al.* bedienten sich eines Komplexes in HeLa-Zellextrakt, den sie zuvor *in vivo* durch Transfektion mit siRNA beluden. Dieser Komplex wurde als „Holo-RISC“ bezeichnet [185]. Analog dazu verwendeten Haley und Zamore *in vivo* beladenen RISC im Lysat von *D. melanogaster* Embryonen [63]. Martinez und Tuschl benutzten einen „minimalen RISC“ aus HeLa-Zellextrakt, der mit Hilfe von Biotin-markierter siRNA affinitätsgereinigt worden war [168]. Mit dem gleichen System arbeiteten Ameres *et al.* [200]. Die Gruppe um Rivas verwendete in *E. coli* Zellen rekombinant exprimiertes, affinitätsgereinigtes GST-hAgo2 in Kombination mit einzelsträngiger siRNA in einem reinen *in vitro* System. Dies bezeichneten sie als „rekombinanten RISC“ [62]. Bei den verschiedenen Systemen ist zu beachten, dass der jeweilige RISC mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine unterschiedliche Zusammensetzung besitzt. Bei Arbeiten mit Zellextrakten muss davon ausgegangen werden, dass sich neben Ago weitere Komponenten wie Dicer oder dsRNA-bindende Proteine, z. B. TRBP oder PACT, im Reaktionsansatz befinden. Auch bei Arbeiten mit immunopräzipitiertem oder affinitätsgereinigtem Ago aus Säuger- oder Insektenzellen ist die Wahrscheinlichkeit der Koisolierung anderer Komponenten neben Ago sehr groß. Dies ist dadurch bedingt, dass hAgo2 mit einer Vielzahl an Proteinen in direkte Wechselwirkung treten kann [85, 146–152, 201, 202].

Martinez und Tuschl identifizierten die Freisetzung der Spaltprodukte sowie konformationelle Umlagerungen des RISC als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt [168]. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass für die Spaltproduktfreisetzung entweder ein Faktor für die Entwindung der Stränge nötig ist, wie beispielsweise eine Helikase. Andererseits ist es vorstellbar, dass Ago selbst in der Lage ist, die Spaltprodukte zu entlassen. Diese Betrachtungen berücksichtigen allerdings nicht mögliche Effekte der *target* RNA-Zugänglichkeit [22]. Brown *et al.* untersuchten den Einfluss von An- bzw. Abwesenheit der spezifischen *target* RNA innerhalb der Zelle. Sie konnten weder einen signifikanten Einfluss auf die kinetischen Parameter des RISC noch die Menge aktiver Komplexe in HeLa-Zellen beobachten. Weiterhin konnten sie zeigen, dass ein programmierter RISC eine Halbwertszeit von zwei bis vier Tagen besitzt [185]. Die Gruppe um Ameres zeigte, dass bei geringer Zugänglichkeit der Erkennungssequenz innerhalb der *target* RNA unter *multiple turnover* Bedingungen die Spaltungsreaktion einen biphasischen Verlauf nimmt. Die beobachtete *burst* Phase wird auf den Umsatz von *target* RNA innerhalb präassemblierter Komplexe zurückgeführt (initiale *single turnover* Reaktion). Die folgende Phase besitzt eine deutlich langsamere Rate und repräsentiert vermutlich die Reaktion unter Gleichgewichtsbedingungen, deren limitierender Schritt die Freisetzung der Spaltprodukte aus dem RISC darstellt [200].

RISC	K_m (nM)	V_{max} (nMs^{-1})	[RISC] (nM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($nM^{-1}s^{-1}$)	Referenz
Holo-hRISC-CDK9	15,42	$3{,}47 \times 10^{-3}$	2,5	$1{,}39 \times 10^{-3}$	$9{,}0 \times 10^{-5}$	[185]
Holo-hRISC-GFP	14,32	$3{,}52 \times 10^{-3}$	3,0	$1{,}17 \times 10^{-3}$	$8{,}2 \times 10^{-5}$	[185]
minimaler hRISC	2,3	$7{,}1 \times 10^{-3}$	0,4	$17{,}9 \times 10^{-3}$	$7{,}8 \times 10^{-3}$	[168]
rekombinanter hRISC	1,4	$1{,}3 \times 10^{-3}$	0,15	$8{,}7 \times 10^{-3}$	$6{,}2 \times 10^{-3}$	[62]
Holo-DmRISC	8,4	$7{,}1 \times 10^{-3}$	1,0	$7{,}1 \times 10^{-3}$	$8{,}4 \times 10^{-4}$	[63]
hRNase H1	38	n. p.	-	$5{,}0 \times 10^{-2}$	$1{,}3 \times 10^{-3}$	[203]

Tabelle 2.2: Kinetische Parameter der Katalyse durch RISC in verschiedenen experimentellen Systemen. h: human. Dm: *D. melanogaster*. CDK9: Cyclin-abhängige Kinase 9. GFP: Grün Fluoreszierendes Protein. n. p.: nicht publiziert. Modifiziert nach Rana [22].

Die in Tabelle 2.2 aufgeführten kinetischen Parameter spiegeln wider, dass mit den verschiedenen Systemen unterschiedliche Komplexe betrachtet werden. Minimaler und rekombinanter hRISC weisen untereinander ähnliche K_m und k_{cat} Werte auf, besitzen aber einen niedrigeren K_m und einen höheren k_{cat}/K_m Wert im Vergleich zum Holo-hRISC. Es gibt zwei mögliche mechanistische Erklärungen hierfür. Entweder sind der minimale und der rekombinante hRISC effizienter in der Freisetzung ihrer Spaltprodukte oder flexibler in der Einnahme einer katalytisch kompetenten Konformation als der Holo-hRISC. Möglicherweise spielt auch eine unterschiedliche Zusammensetzung der RISC-Proteine eine Rolle [22].

Trotz aller hier aufgeführten Untersuchungen gibt es bislang keine Studie, die eine umfassende und detaillierte Analyse von isolierten Schritten der siRNA-vermittelten Erkennung und Spaltung von *target* RNA beschreibt. Außerdem ist es bislang nicht gelungen, die Geschwindigkeitskonstante des katalytischen Schrittes zu ermitteln. Es wird nötig sein, hierfür experimentelle Bedingungen zu etablieren, um hAgo2 nur die Ausführung eines einzigen katalytischen Schrittes zu erlauben (*single turnover*).

2.6 Die Familie der dsRNA-bindenden Proteine

Die Familie der dsRNA-bindenden Proteine (dsRBPs) umfasst eine große Anzahl eukaryoter, prokaryoter und viraler Vertreter. Sie haben ein etwa 65 – 68 Aminosäuren langes, strukturell hoch konserviertes Motiv gemeinsam, mit dem sie in der Lage sind, sequenzunspezifisch die A-Form Helix doppelsträngiger RNA zu erkennen (dsRNA-bindendes Motiv, dsRBM) [204]. Dieses Motiv wurde 1992 in zwei Proteinen, Staufen aus *D. melanogaster* und Xlrbpa von *X. laevis*, entdeckt [205]. Eukaryote dsRBPs enthalten bis zu fünf der konservierten Motive, virale Proteine hingegen besitzen üblicherweise eines [206]. Da die Mehrheit aller zellulär vorkommenden RNAs doppelsträngige Bereiche, wie beispielsweise Stamm-Schleifen-Strukturen besitzt, kommen sie vermutlich auch in mindestens einem Stadium ihrer Existenz mit dsRBPs

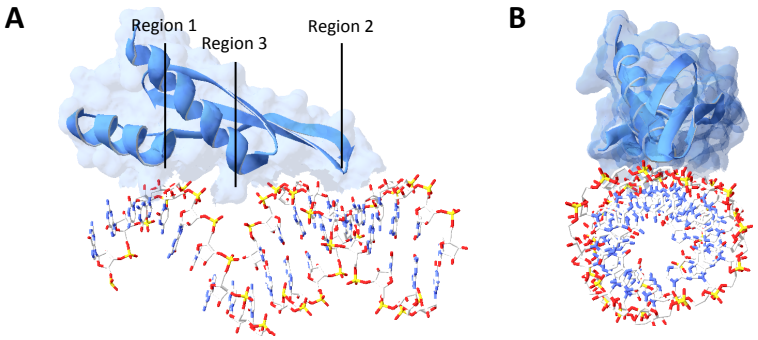


Abbildung 2.10: Struktur des dsRBM und Interaktion mit dsRNA. Röntgenkristallstruktur von Xlrbpa aus *X. laevis* im Komplex mit einer 10 nt langen dsRNA mit repetitiv überlappender Sequenz (PDB 1DI2) in seitlicher (A) und frontaler (B) Ansicht. Die Kontakte werden in zwei kleinen Furchen (Region 1 und 2) vor allem durch 2'-OH-Gruppen der Ribose und in einer großen Furche (Region 3) hauptsächlich durch Phosphatgruppen vermittelt [210]. Phosphate sind gelb, Sauerstoff rot, Stickstoff blau und Kohlenstoff weiß gefärbt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Tian *et al.* [208].

in Kontakt [207]. Ihre Funktionen sind vielfältig und reichen von anti-viraler Verteidigung und Antwort auf zellulären Stress (PKR) über eine Rolle bei der Translation (TRBP, PACT, NF90) und mRNA Lokalisation (Staufen, NF90) bis zur Prozessierung von RNA (RNase III, Drosha, Dicer) [207, 208].

Ein Bindemotiv umfasst 11 – 16 nt einer dsRNA, misst also etwa 28 Å in der Länge und bildet Kontakt zu ein bis eineinhalb Umdrehungen der Helix [209]. Das Sekundärstrukturmotiv $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ bildet eine kompakte Einheit, in der die α-Helices die Oberfläche eines hydrophoben antiparallelen β-Faltblattes bilden. Der Kontakt zur dsRNA wird sequenzunabhängig über zwei aufeinander folgende kleine und eine große Furche der A-Form Helix vermittelt (siehe Abbildung 2.10 A) [210]. Interaktionen bestehen nur an einer Seite der dsRNA an einer Fläche von 1600 – 1800 Å^2 [208]. Die Mutation hoch konservierter Reste innerhalb des dsRBM führt zu einer verminderten Bindung doppelsträngiger RNA oder verhindert sie vollständig [211, 212]. NMR-Studien zeigen, dass die die einzelnen Domänen verbindenden Bereiche die modularen Proteine sehr flexibel machen [213].

2.6.1 Die Proteine TRBP und PACT und ihre Rolle bei der RNAi

TRBP Beim Versuch, zelluläre Proteine zu identifizieren, die in der Lage sind, mit *transactivating response* (TAR) RNA zu interagieren, wurde das *TAR RNA binding protein* (TRBP) identifiziert [214]. Es beinhaltet drei dsRBMs, von denen die beiden N-terminal gelegenen die dsRNA-Bindung vermitteln. Sie unterscheiden sich durch ein KR-Helix-Motiv [215] sowie in ihrer Thermostabilität [204]. Das C-terminale dsRBM ist an der Bindung von Nukleinsäuren nicht beteiligt, jedoch wird es für die Protein/Protein-Interaktion mit Dicer und PACT benötigt und als Medipal Domäne bezeichnet (siehe Abbildung 2.11 A) [216, 217].

TRBP ist in HeLa-Zellen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert, wo es im

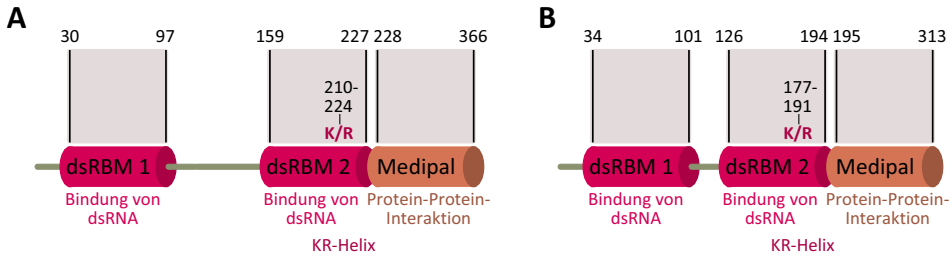


Abbildung 2.11: Domänenorganisation von TRBP Isoform 2 (A) und PACT (B). Beide Proteine enthalten je zwei homologe dsRBMs, die die Bindung der dsRNA vermitteln, und eine Medipal Domäne, die für die Protein/Protein-Wechselwirkung verantwortlich ist. Ein konserviertes KR-Helix-Motiv ist in dsRBM 2 lokalisiert. Abbildung modifiziert nach Laraki *et al.* [217].

besonderen im perinukleären Raum und mit Ribosomen sowie dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist [217, 218]. Es gibt die Isoformen 1 und 2 des humanen TRBP, die beide auf Chromosom 12 kodiert sind und durch alternatives *splicing* entstehen [219–222]. Die Molekulargewichte betragen 40 bzw. 43 kDa. Der Grund für die Existenz zweier Isoformen ist nicht bekannt. TRBP kann durch die extrazellulär regulierte Kinase (Erk) an S142, S152, S283 und S286 posttranslational phosphoryliert werden, was zu einer Stabilisierung der Assoziation mit Dicer führt [223].

TRBP werden sowohl eine Rolle bei der Aktivierung von HIV-1 als auch der Translationsregulation durch die Modulation der PKR zugeschrieben [214]. Es kann – vermutlich durch kompetitive Effekte bei der Bindung von dsRNA – die Autophosphorylierung der PKR inhibieren [224]. Außerdem bindet TRBP die PKR RNA-unabhängig und beeinflusst dadurch die wachstumsregulierenden Eigenschaften der Kinase [224–226]. Sowohl das humane TRBP als auch das homologe PRBP aus der Maus, die zu 93 % identisch sind, spielen eine wichtige Rolle bei der Spermatogenese [227, 228]. PRBP-defiziente Mäuse sterben entweder zur Zeit der Entwöhnung oder sind oligospermisch bzw. steril, was eine wichtige Funktion des Proteins über die Spermatogenese hinaus impliziert [229].

PACT Dieses Protein wurde bei der Suche nach Interaktionspartnern der PKR identifiziert, wonach sich sein Name *protein kinase R activator* begründet. Es besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa und hohe Sequenzhomologie zu TRBP – beide Proteine sind zu 42 % identisch. Analog besitzt es drei dsRBMs (siehe Abbildung 2.11 B). Die ersten beiden Domänen sind für die Interaktion mit dsRNA sowie der PKR verantwortlich. Die dritte Domäne scheint nicht an der Nukleinsäurewechselwirkung beteiligt zu sein, ist aber essentiell für die Aktivierung der PKR [230]. PACT ist diffus im perinukleären Zytoplasma lokalisiert, kann jedoch nach viraler Infektion der Zelle mit Strukturen assoziieren, in denen vermutlich Virusreplikation abläuft [217, 231].

Die transiente Überexpression von PACT in Hefe und Säugerzellen im Zusammenspiel mit

zellulärem Stress kann die Autophosphorylierung der PKR sowie die Phosphorylierung von eIF2α induzieren [232]. Durch Serumentzug und Arsenitbehandlung kommt es zur Phosphorylierung von PACT, was in einer erhöhten Affinität zur PKR und verstärkter Phosphorylierung von eIF2α resultiert und zur Apoptose führen kann [233].

Funktion bei der RNAi Eine ganze Reihe von Proteinen mit dsRBM spielen eine wichtige Rolle bei der RNAi, beispielsweise Drosha und DGCR8 im Zellkern, Exportin sowie Dicer [29–33, 65, 69–72, 74–77]. Auch wenn die anderen Fähigkeiten dieser Proteine wie Endonuklease- oder Translokationsaktivität prominenter erscheinen mögen, basieren sie doch auf der Fähigkeit, initial dsRNA zu binden. TRBP und PACT besitzen neben ihren drei dsRBM keine weiteren Domänen und gelten deshalb nicht als klassische Enzyme. Dennoch scheint es mittlerweile sicher, dass beide wichtige Aufgaben bei der RNAi erfüllen.

Für TRBP und PACT werden derzeit Funktionen bei drei Teilprozessen der RNAi diskutiert. Zunächst scheinen sie an der Prozessierung von Vorläufer-Molekülen kleiner regulatorischer RNAs beteiligt zu sein. Haase *et al.* konnten zeigen, dass TRBP für die optimale Genregulation durch siRNAs und endogene miRNAs in HEK293T-Zellen nötig ist. Dies führten sie u. a. auf eine gehemmte Prozessierung von pre-let7 in TRBP-depletierten Zellen zurück [216]. Kok *et al.* beobachteten einen signifikanten Rückgang der Genregulation nach Einbringen von *short hairpin* RNA, die als siRNA-Vorläufer-Molekül fungiert, in TRBP- und PACT-defizienten Zellen. Außerdem konnten sie die direkte Protein/Protein-Interaktion von PACT und TRBP sowie deren Assoziation mit Dicer *in vitro* und *in vivo* nachweisen [234]. Chendrimada *et al.* gelang der Nachweis, dass die Herunterregulation von TRBP in HeLa-Zellen zu einer Destabilisierung von Dicer und einer geringeren miRNA-Vorläufer-Prozessierung führt [79]. Für PACT konnten Lee *et al.* ähnliche Ergebnisse zeigen. Seine Depletion führte zu verminderter Akkumulation reifer miRNAs in HeLa-Zellen [148]. Die Wichtigkeit von TRBP für die Dicer-Funktion wird durch Ergebnisse von Daniels *et al.* unterstrichen. Bei Deletion der die Interaktion mit Dicer vermittelnden C-terminalen Domäne von TRBP wiesen sie verminderte RNAi in murinen Fibroblasten nach [235]. Die Interaktion von TRBP und Dicer wird durch die posttranslationale Phosphorylierung von TRBP stabilisiert und resultiert außerdem in einer verstärkten miRNA-Biogenese [223].

In *D. melanogaster* konnte bereits für das TRBP-homologe Protein R2D2 eine Rolle bei der Detektion thermodynamischer Asymmetrie innerhalb von siRNAs nachgewiesen werden [236]. Neuere Arbeiten von Gredell *et al.* bewiesen nun, dass auch TRBP an der Auswahl eines Endes der siRNA basierend auf dessen höherer thermodynamischer Stabilität beteiligt ist. Dadurch kann es als Biosensor für die Auswahl des *guide* Stranges dienen [237].

Die Aufgaben bei der Prozessierung von Vorläufer-Molekülen und die damit verbundene Assoziation mit Dicer sowie die Auswahl eines der beiden siRNA-Stränge als *guide* RNA gibt Hinweise darauf, dass TRBP und PACT Initiations- und Effektorschritte der RNAi miteinander koppeln. Die Tatsache, dass TRBP eine Komponente des RLC darstellt sowie das PACT,

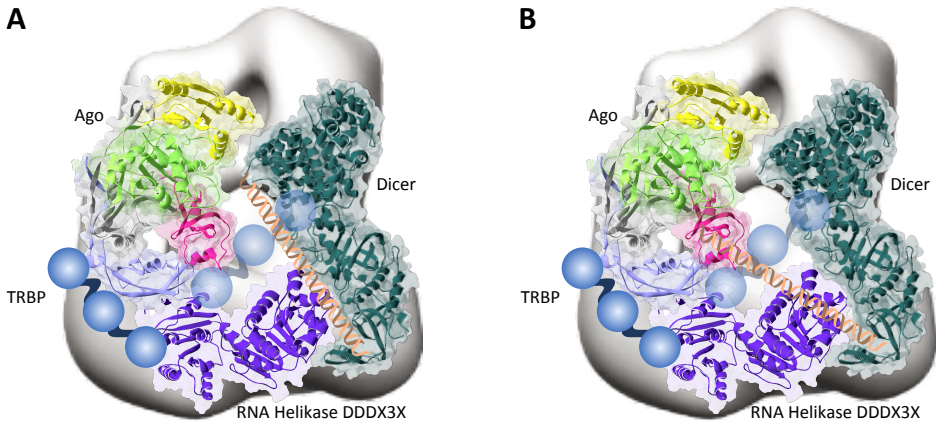


Abbildung 2.12: Strukturmodell des RLC. Dreidimensionale Darstellung der Einzelmolekül-Elektronenmikroskopie des humanen RLC mit eingepassten Röntgenkristallstrukturen des *T. thermophilus* Ago (blau: N-terminale Domäne; magenta: PAZ Domäne; gelb: Mid Domäne; grün: PIWI Domäne), *G. intestinalis* Dicer (dunkelgrün) und der humanen RNA Helikase DDD3X3 (violett). TRBP ist schematisch dargestellt (blau). Experimentelle Daten zeigen einen möglichen Bewegungsradius für TRBP, der durch die beiden alternativen Positionen dargestellt ist [238]. (A) Mögliche Positionierung der siRNA zwischen Ago und Dicer, repräsentativ für das Stadium der Vorläufer-Molekül-Prozessierung. (B) Mögliche Positionierung der siRNA während der Übergabe von Dicer an Ago, mit dem 3'-Überhang des *passenger* Stranges an die Dicer PAZ Domäne gebunden und dem 3'-Überhang des *guide* Stranges in der PAZ Domäne von Ago verankert. Ocker: *guide* RNA. Braun: *passenger* RNA. Abbildung modifiziert nach Wang *et al.* [238].

TRBP und Dicer physisch miteinander interagieren [34, 234], bildet für diese Annahme eine plausible Voraussetzung. Es konnte gezeigt werden, dass TRBP für die Rekrutierung von hAgo2 zur an Dicer gebundenen siRNA nötig ist [79] und dadurch eine Plattform für die RISC-Assemblierung darstellt. Außerdem stabilisiert TRBP die Assoziation von hAgo2 und Dicer [238]. Die Gruppe um Wang stellte auf Grund struktureller Daten [238, 239] ein Modell der RISC-Beladung auf. Mittels Einzelmolekül-Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallstrukturen des *T. thermophilus* Agos, Dicer aus *G. intestinalis* und der humanen DEAD-box RNA Helikase DDDX3X modulierten sie eine dreidimensionale Rekonstruktion des RLC, in die sie TRBP schematisch einpassten (siehe Abbildung 2.12) [238].

Die Studien zeigen, dass TRBP flexibel mit der Helikase-Domäne von Dicer interagiert, während Ago sich zwischen TRBP und dem langen Arm des L-förmigen Dicer erstreckt [238, 239]. Eventuell wird diese Interaktion von Seiten des Ago Proteins durch die PIWI Domäne vermittelt, während die RNase IIIa Domäne von Dicer den Kontakt herstellt [240]. Für die Position einer doppelsträngigen, 22 nt langen siRNA sind zwei Möglichkeiten denkbar. Zum Einen bildet der Spalt zwischen Ago und Dicer genügend Platz, um eine Duplex zu beherbergen (siehe Abbildung 2.12 A). Zum anderen ist es denkbar, dass die PAZ Domänen von Ago und Dicer simultan an die jeweiligen 3'-Überhänge der siRNA binden (siehe Abbildung 2.12 B). TRBP kann auf Grund seiner Flexibilität möglicherweise die Ago PAZ Domäne erreichen und nach

der Freisetzung der reifen siRNA durch Dicer diese bei der Übergabe an Ago stabilisieren und korrekt positionieren [238, 241]. Die Funktion von TRBP als Biosensor für die unterschiedliche thermodynamische Stabilität der beiden siRNA-Enden verschafft ihm eine mögliche Rolle als Prüfer für den Einbau des korrekten Stranges als *guide* RNA in Ago [79, 238, 241].

2.7 Ziel dieser Arbeit

Die detaillierte Kenntnis der Wirkungsweise von hAgo2, der zentralen Komponente des humanen RISC bei der RNAi, ist von besonderer Bedeutung. Die Charakterisierung von rekombinanten Proteinen in *in vitro* Studien eröffnet die Möglichkeit, beobachtete Effekte auf genau definierte Komponenten der RNAi-Maschinerie zurückzuführen. Im Gegensatz dazu ist bei Experimenten mit Zellextrakten oder immunpräzipitiertem Protein, das an unbekannte Faktoren gebunden vorliegen kann, diese eindeutige Zuordnung nicht möglich. Durch Auftrennen der siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten Spaltung von *target* RNA in Teilreaktionen (Bindung des *guide* Stranges, Bindung der *target* RNA, ihre Spaltung und Freisetzung der gespaltenen Fragmente aus dem RISC) können diese Schritte im Detail charakterisiert werden. Da für hAgo2 in seiner gesamten Länge bisher keine Kristallstruktur gelöst werden konnte, können biochemische Daten wertvolle Hinweise nicht nur auf die Funktion des Proteins liefern, sondern auch die von prokaryoten Homologen sowie einzelnen Domänen des hAgo2 abgeleiteten Strukturinformationen komplementieren. Aus diesen Gründen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit den im Folgenden beschriebenen Abschnitten.

Zunächst bestand die Notwendigkeit, ein Expressionssystem für rekombinantes hAgo2 zu etablieren und mit Hilfe einer geeigneten Reinigungsstrategie in ausreichender Menge und Qualität zu isolieren. Weiterhin sollten adäquate Lagerbedingungen gefunden sowie die Handhabung des Proteins für den experimentellen Einsatz erprobt werden. Zentrales Ziel des Projektes war die Durchführung von quantitativen biochemischen Analysen. Es sollte die Substratbindung durch hAgo2 bezüglich Affinität und Kinetik charakterisiert werden. Außerdem sollte eine Charakterisierung der sequenzspezifischen *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 durchgeführt werden. Mit Hilfe der experimentell ermittelten Parameter sollte ein minimales kinetisches Modell der siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten *target* RNA-Spaltung etabliert werden.

Neben hAgo2 sollte mit hTRBP eine weitere Komponente des RISC untersucht werden. Ziel war es, ein geeignetes Expressions- und Reinigungssystem zu entwickeln, um rekombinantes hTRBP für *in vitro* Studien zu gewinnen. Nach einer Charakterisierung bezüglich Nukleinsäurebindungseigenschaften und Oligomerisierungsverhalten sollte der Einfluss von hTRBP auf die Bindung von siRNA bzw. Spaltung von *target* RNA durch hAgo2 untersucht werden.

3 Material

3.1 Allgemeines

Im Folgenden sind die Firmensitze der Materialhersteller aufgelistet und werden im weiteren Verlauf nicht mehr angegeben, um Mehrfachnennungen zu vermeiden:

abcam (Cambridge, UK), Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland), Applied Biosystems (Freiburg, Deutschland), AppliedPhotophysics (Leatherhead, UK), Ascenion GmbH (München, Deutschland), Bandelin (Berlin, Deutschland), B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland), Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Biomers (Ulm, Deutschland), Biometra (Göttingen, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Biotec-Fischer (Reiskirchen, Deutschland), Biosciences (St. Louis, MO, USA), Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland), Brand (Wertheim, Deutschland), Canon (Krefeld, Deutschland), Cambrex (East Rutherford, NJ, USA), DakoCytomation (Hamburg, Deutschland), DNAStar Lasergene (Madison, WI, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Erithacus Software (Surrey, UK), Feather (Osaka, Japan), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschalnd), Finnzymes (Espoo, Finnland), Fluka (Buchs, Deutschland), Forma Scientific (Marietta, OH, USA), Fuji (Düsseldorf, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), Gerhardt (Königswinter, Deutschland), Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Gilson (Bad Camberg, Deutschland), Greiner (Frickenhausen, Deutschland), H + P Labortechnik (Oberschließheim, Deutschland), Hartmann (Braunschweig, Deutschland), Heidolph (Schwalbach, Deutschland), Hellma (Jena, Deutschland), Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland), Hettich (Tuttlingen, Deutschland), Hirschmann (Eberstadt, Deutschland), Hoefer (San Francisco, CA, USA), Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, Deutschland), IBA (Göttingen, Deutschland), Infors (Bottmingen, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK), Jahnke & Kunkel (Staufen, Deutschland), Jena Bioscience (Jena, Deutschland), Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland), KnF Neuberger (Freiburg, Deutschland), Kodak (Rochester NY, USA), Liebherr (Ochsenhausen, Deutschland), LKB (Bromma, Schweden), Macherey & Nagel (Düren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Micromath (St. Louis, MO, USA), Millipore (Schwalbach, Deutschland), Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland), Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA, USA), New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Perkin-Elmer (Boston, MA, USA), Phase (Lübeck, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Renner GmbH (Dannstadt,

Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Sartorius (Göttingen, Deutschland), Savant (Midland, MI, USA), ScalTec (Göttingen, Deutschland), Sci Ed Central (Cary, NC, USA), Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland), Schmidt + Haench & Co. (Berlin, Deutschland), Schott (Darmstadt, Deutschland), Scotsman (Vernon Hills, IL, USA), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhof, Deutschland), Sörk-Tronik (Medingen, Deutschland), Spectrum (Breda, Niederlande), Systec (Wettenberg, Deutschland), Takara Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA), Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland), Waters (Eschborn, Deutschland), Werner Hassa GmbH (Lübeck, Deutschland), Whatman (Dassel, Deutschland), Wyatt Technology (Santa Barbara, CA, USA).

3.2 Geräte

Name	Hersteller
Bioreaktor BioFlo 110	New Brunswick Scientific
Blotapparatur Hoefer® SemiPhor™	Hoefer
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments
Chemilumineszenz-sensitive Kamera Fusion-SL	Vilber Lourmat
Dampfsterilisator 3850 ELV	Systec
Dampfsterilisator Varioklav®	H + P Labortechnik
Diagrammschreiber LKB Rec 102	GE Healthcare
DLS DynaPro MS/X	Wyatt Technology
Elektroporationsapparatur Gene Amp II	Biorad
Feinwaage ALJ 220-5 DNM	Kern & Sohn GmbH
Flockeneismaschine AF 100	Scotsman
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409	Perkin-Elmer
Fluoreszenzküvetten (70 μl, 400 μl, 700 μl)	Hellma
Fluoreszenzspektrometer FluoroMax®-3	Horiba Jobin Yvon
FPLC-Anlage Advanced Protein Purification System 650E	Waters
Fraktionssammler GradiFrac	GE Healthcare
Gefrierschrank $-20\,°C$	Liebherr
Gefrierschrank $-80\,°C$	Forma Scientific
Geldokumentationsanlage Variocam	Phase
Gelkammer für Agarosegele Sub-Cell® GT	Biorad
Gelkammer für Polyacrylamidgele (42 cm × 39 cm)	Biometra
Gelkammer für SDS-Gele (10 cm × 10,5 cm)	Hoefer
Gelkammer für Sequenziergele Sequi-Gen® GT	Biorad

Geltrocknungsanlage 583	Biorad
Geltrocknungsanlage Phero-Temp	Biotec-Fischer
Gradientengießer SG30	Hoefer
Heizblock Techne DRI-Block® DB 2D	Werner Hassa GmbH
HPLC-Anlage 510	Waters
Kühlschrank $4\,°C$	Bosch
Laborzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Laborzentrifuge Microfuge® R	Beckman Coulter
Magnetrührer IKAMAG® RCT	Jahnke & Kunkel
Mikrowelle	Bosch
Multiwellenlängendetektor 486	Waters
Multiwellenlängendetektor 490E	Waters
Netzgerät Electrophoresis Power Supply - EPS 600/3500	Amersham Pharmacia
Netzgerät Power Pac 300	Biorad
Netzgerät Power Pac HV	Biorad
PCR-Block UNO II	Biometra
Peristaltik-Pumpe Minipuls 3	Gilson
pH-Meter Lab 850	Schott
PhosphorImager Typhoon™ 8600	Amersham Pharmacia
Pipette ($1-10\,\mu$l)	Eppendorf
Pipettensatz ($0{,}5-1000\,\mu$l)	Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann
Refraktometer nach Abbe	Schmidt + Haench & Co.
Reinstwassersystem	Millipore
Scanner CanoScan N670U	Canon
Schüttelinkubator HT	Infors AG
Schüttelinkubator Thermoshake	Gerhardt
Schüttler Celloshaker Variospeed	Renner GmbH
Spektralphotometer DU® 640	Beckmann Coulter
Spektrophotometer Nanodrop	Peqlab
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus Instruments
Stopped flow Anlage SX20	AppliedPhotophysics
Storage Phosphor Screen	Fuji
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex super RK510	Bandelin
Ultraschallhomogenisator Sonopuls UW/GM 70	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima L-70	Beckman Coulter

UV-Quarzküvetten (70 µl, 1000 µl)	Hellma
Vakuum-Dialyseeinheit	Schleicher & Schüll
Vakuum-Pumpe Laboport®	KnF Neuberger
Vakuum-Zentrifuge Speed Vac® Plus SC100A	Savant
Vortexer Vibrofix VF1 Electronic	Jahnke & Kunkel
Waage SBA 41	ScalTec
Waage 2354	Sartorius
Wasserbad W22	Sörk-Tronik
Wipper Polymax 1040	Heidolph
Zentrifuge Rotixa 120 R	Hettich
Zentrifuge Avanti™ J-25	Beckman Coulter

3.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen, falls nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad *pro analysi*. Die nicht aufgeführten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

Name	Hersteller
3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure (CAPS)	Fluka
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1 v/v)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1 v/v)	Roth
Agar	Sigma-Aldrich
Agarose	Cambrex
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$)	Roth
Ampicillin	Roth
AntiFoam A	Sigma-Aldrich
Bactotrypton	Roth
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
dNTPs	Jena Bioscience
Entwicklerlösung	Kodak
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck

Ethidiumbromid (EtBr)	Gibco
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ficoll® 400	Fluka
Fixierlösung	Kodak
Formamid (entionisiert)	Sigma-Aldrich
Glutathion (reduziert)	Thermo Fisher Scientific
Glycin	Roth
Glycogen	Fermentas
Glyzerin	Sigma-Aldrich
Harnstoff	Roth
Hefextrakt	Roth
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kanamycin	Roth
L-Arginin	Merck
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumacetat ($NaCH_3COOH$)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat ($Na_3C_6H_5O_7$)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Nonidet P40 (NP40)	LKB
NTP Set ($4 \times 25\,\mu$mol)	Fermentas
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Merck
Sigmacote®	Sigma-Aldrich

Stains-All	Sigma-Aldrich
SYBR® Gold	Invitrogen
Szintillationslösung	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
tRNA aus Hefe (10 mg/μl)	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Xylencyanol (XC)	Sigma-Aldrich
α, α, α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris)	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
[γ-^{32}P]-ATP (6000 Ci/mmol)	Hartmann

3.4 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Dialyseschläuche Spectra/Por (MWCO 30 kDa, 100 kDa)	Spectrum
Einmalinjektionskanülen	B. Braun Melsungen AG
Einmalküvetten (1,5 ml)	Brand
Einmalpipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner
Einmalreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Einmalreaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner
Einmalspitzen (10 μl, 200 μl, 1000 μl)	Sarstedt
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml)	Becton Dickinson
Elektroporationsküvetten (2 mm)	Biorad
Filterpapier GB003 (3 mm)	Whatman
Filtermembran (0,2 μm, 0,45 μm)	Whatman
Filtrationseinheit zur Sterilisation von Lösungen (0,2 μm)	Thermo Fisher Scientific
Hyperfilm™ ECL	Amersham Pharmacia
Immobilon-P PVDF-Membran (0,45 μm)	Millipore
Kryo-Röhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Greiner
Petrischalen (⌀ 10 cm)	Sarstedt
Polypropylen Zentrifugenbecher (50 ml, 500 ml)	Beckman Coulter
Skalpell	Feather
Szintillationsgefäße (3 ml, 5 ml)	Perkin-Elmer
Ultrafiltrationseinheiten Amicon Ultra-15, Centricon (MWCO 30 kDa, 100 kDa)	Millipore
Ultrahülsen für die Vakuum-Dialyse (MWCO 100 kDa)	Schleicher & Schüll

3.5 Säulen und Säulenmaterialien

Name	Hersteller
Einmalgelfiltrationssäulen Sephadex-G50	GE Healthcare
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare
Glutathion Sepharose High Performance	GE Healthcare
Ni^{2+}-NTA Sephadex Superflow	Qiagen
Superdex 200 HR10/30	GE Healthcare
TALON Superflow	Takara Clontech
Trimethylaminoethyl (TMAE) Sepharose Source 15	GE Healthcare
Säule Econo-Column 737-4021	Biorad
Säule Superformance 50-10	Merck
Säule XK 16/20 column	GE Healthcare

3.6 Lösungen und Puffer

Für die Zubereitung aller Lösungen und Puffer wurde hochreines Milli-Q-Wasser verwendet, das mit Hilfe einer Ionenaustauschkartusche (Millipore) aufbereitet wurde und somit der Qualität *aqua bidestillata* entsprach. Im Folgenden wird es als H_2O bezeichnet.

Die Nährmedien für Bakterienkultur sind unter 3.7.2 aufgeführt. Zugunsten besserer Übersichtlichkeit finden sich die Lösungen und Puffer für die Proteinreinigung in Abschnitt 4.3.8.

Name	Bestandteile	
Ago2-Bindungspuffer (1×)	100 mM	KCl
	10 mM	Tris (pH 7,5)
Ago2-Spaltungspuffer (1×)	100 mM	KCl
	10 mM	Tris (pH 7,5)
	2 mM	$MgCl_2$
Blockpuffer I (1×)	10% (w/v)	Milchpulver in 1× TBS-T
Blockpuffer II (1×)	5% (w/v)	Milchpulver in 1× TBS-T
Blockpuffer III (1×)	3% (w/v)	BSA in 1× TBS
Blockpuffer IV (1×)	10% (w/v)	Milchpulver in 1× TBS

Coomassie-Entfärbelösung (1×)	40% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Coomassie-Färbelösung (1×)	40% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	0,1% (w/v)	Commassie brillant blue R-250
Elektrophoresepuffer für Agarosegele (1×)	1×	TAE (pH 8,5)
Elektrophoresepuffer für PAA-Gele (1×)	1×	TBE (pH 8,3)
Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE (1×)	25 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	192 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
GF-Puffer (1×)	50 mM	Tris (pH 8,0)
	100 mM	$(NH_4)_2SO_4$
Glutathionlösung (reduziert, 5×)	100 mM	red. Glutathion
	0,1 mM	EDTA
	100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
Hybridisierungspuffer für DNA (1×)	100 mM	KCH_3COOH
	2 mM	$MgCH_3COOH$
	30 mM	HEPES (pH 7,4)
Hybridisierungspuffer für siRNA (5×)	50 mM	KCH_3COOH
	1 mM	$MgCH_3COOH$
	15 mM	HEPES (pH 7,4)
Ladepuffer für Agarosegele (6×)	25 % (w/v)	Ficoll®400
	0,1 % (w/v)	BPB
	0,05 % (w/v)	XC
	0,0025 ‰(w/v)	Ethidiumbromid in 1× TAE (pH 8,5)
Ladepuffer für denaturierende PAA-Gele (2×)	95 %	Formamid (entionisiert)
	0,025 % (w/v)	SDS
	0,025 % (w/v)	BPB
	0,025 % (w/v)	XC
	0,5 mM	EDTA

Ladepuffer für native PAA-Gele (6×)	25 % (w/v)	Ficoll® 400
	0,1 % (w/v)	BPB
	0,05 % (w/v)	XC
		in 1× TAE (pH 8,5)
Ladepuffer für SDS-PAGE (6×)	300 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	12 % (w/v)	SDS
	60 % (w/v)	Glyzerin
	600 mM	DTT
	0,06 % (w/v)	BPB
Phosphat-gepufferte Saline (PBS, 1×, pH 7,4)	0,14 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na_2HPO_4
	2 mM	KH_2PO_4
PMSF-Lösung	100 mM	PMSF
		in Isopropanol
Ponceau S-Färbelösung	0,1 % (w/v)	Ponceau S
	5% (v/v)	Essigsäure
RNA-Sequenzierungspuffer (1×)	20 mM	Natriumcitrat
		(pH 5,0)
	1 mM	EDTA
	7 M	Harnstoff
Sammelgelpuffer (8×)	0,5 M	Tris-HCl (pH 6,8)
Stains-All-Färbelösung (1×)	15 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
	0,005 % (w/v)	Stains-All
	5 % (v/v)	Formamid
	25 % (v/v)	Isopropanol
Stripping Puffer für PVDF-Membranen (1×)	200 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
	1 % (v/v)	Tween 20
		(pH 2,2)
SYBR® Gold-Färbelösung (1×)	0,1 % (v/v)	SYBR® Gold
		in 1× TAE
Transferpuffer (1×)	1×	Elektrophoresepuf-
		fer für SDS-PAGE
	15 % (v/v)	Methanol

Trenngelpuffer (4×)	1,5 M	Tris (pH 8,8)
Tris-Acetat-EDTA (TAE, 50×)	2 M	Tris-HCl (pH 8,5)
	2 M	Essigsäure
	50 mM	EDTA
Tris-Borat-EDTA (TBE, 10×)	890 mM	Tris (pH 8,3)
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
Tris-gepufferte Saline (TBS, 1×)	100 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM	NaCl
Tris-gepufferte Saline mit Tween 20 (TBS-T, 1×)	100 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM	NaCl
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Tris-EDTA (TE, 1×)	10 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	1 mM	EDTA

3.7 Bakterienkultur

3.7.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
E. coli BL21(DE3)	F$^-$ *ompT hsdS$_B$* ($r^-_B m^-_B$) *gal dcm rne 131* (DE3)
E. coli DH5α	F$^-$ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17($r^-_K m^+_K$), λ–

3.7.2 Nährmedien für die Bakterienkultur

Alle Medien wurden zur Sterilisation für 20 min bei 121 °*C* autoklaviert. Für die selektive Anzucht von Bakterienstämmen mit Antibiotikaresistenzgen-enthaltenden Plasmiden wurden Selektionsmedien nach dem Autoklavieren mit 30 μg/ml Kanamycin, 50 μg/ml Kanamycin oder 50 μg/ml Ampicillin sowie Kombinationen aus Kanamycin und Ampicillin versetzt. Für die Präparation von Agar-Platten wurde dem jeweiligen Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar beigemischt und vor dem Aushärten in sterile Petrischalen gegossen.

Name	Bestandteile	
Phosphatpuffer (10×, pH 7,3)	720 mM	K_2HPO_4
	170 mM	KH_2PO_4

TFB-Medium (1×, pH 7,3)	1,2% (w/v)	Bactotrypton
	2,4 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,4 % (v/v)	Glyzerin
	1×	Phosphatpuffer (pH 7,3)
LB-Medium (1×, pH 7,4)	1 % (w/v)	Bactotrypton
	1 % (w/v)	NaCl
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt

3.8 Nukleinsäuren

3.8.1 Plasmide

pET24a(+)-NHA-hAgo2

Eigenschaften:	$Kana^r$, kodiert für hAgo2ΔN7 mit N-HA-Markierung am N-Terminus.
Vektor:	pET24a(+) (Merck)
Herkunft:	C. Geist (Institut für Moleuklare Medizin, Universität zu Lübeck)

pET41b(+)-hAgo2-His und pET41b-hTRBP-His

Eigenschaften:	$Kana^r$, kodiert für hAgo2 mit His_8-Markierung am C-Terminus bzw. für hTRBP (Isoform 1) mit His_8-Markierung am C-Terminus.
Vektor:	pET41b(+) (Merck)
Herkunft:	Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far (Institut für Moleuklare Medizin, Universität zu Lübeck)

pET41b(+)-GST-hAgo2-His und pET41b(+)-GST-hAgo2

Eigenschaften:	$Kana^r$, beinhaltet eine modifizierte *multiple cloning site* (MCS), kodiert für hAgo2 mit GST-Markierung und Erkennungssequenz der TEV Protease am N-Terminus sowie Erkennungssequenz für Thrombin und His_6-Markierung am C-Terminus (GST-hAgo2-His) bzw. für hAgo2 mit GST-Markierung und Erkennungssequenz der TEV Protease am N-Terminus (GST-hAgo2).
Vektor:	pET41b(+)_modifiziert (im Rahmen dieser Arbeit generiert, siehe Abschnitt 5.3.2)
Herkunft:	im Rahmen dieser Arbeit generiert

pQE-T7-His-hAgo2

Eigenschaften:	Kana^r, kodiert für hAgo2ΔN1 mit His_6-Markierung am N-Terminus, hAgo2-Gen optimiert für die Expression in *E. coli*.
Vektor:	pQE-T7 (Qiagen)
Herkunft:	im Rahmen dieser Arbeit kommerziell erworben

pG-si2B(+)

Eigenschaften:	Amp^r, T7 Promotor, kodiert für den Teil des ICAM-1 Gens, der die komplementäre Sequenz zu as2B enthält sowie eine NotI-Schnittstelle für die Linearisierung des Plasmids zur Terminierung der *in vitro* Transkription.
Vektor:	pGEM-T (Promega)
Herkunft:	C. Geist

3.8.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Nukleinsäuren wurden von den Firmen Biomers oder IBA synthetisiert und mittels HPLC oder PAGE gereinigt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Reinheit überprüft (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Integrität wurde mittels denaturierender PAGE kontrolliert (siehe Abschnitt 4.1.3). Ribonukleotide sind als Kleinbuchstaben dargestellt (acgu), Desoxyribonukleotide als Großbuchstaben (ACGT).

DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
TEV pET41b fwd	CTA GTG AAA ACC TGT ACT TCC AGG GTC TTA AGG GAG GTC ATA TGG GAG GTG TCG ACA AGC TTC TCG AGG GAG GTA CCG GTC TGG TTC CGC GTG GTT CTC ACC ACC ACC ACC ACC ACT AAG C
TEV pET41b rev	TCA GCT TAG TGG TGG TGG TGG TGG TGA GAA CCA CGC GGA ACC AGA CCG GTA CCT CCC TCG AGA AGC TTG TCG ACA CCT CCC ATA TGA CCT CCC TTA AGA CCC TGG AAG TAC AGG TTT TCA

RNA-Oligonukleotide und siRNAs

Name	Sequenz (5' → 3')		Ziel-mRNA
as2B	*guide*	uag agg uac gug cug agg cTT	ICAM-1 [182]
s2B	*passenger*	gcc uca gca cgu acc ucu aTT	ICAM-1 [182]

si2B	*passenger*	gcc uca gca cgu acc ucu aTT	ICAM-1 [182]
	guide	uag agg uac gug cug agg cTT	
asLam	*guide*	ugu ucu ucu gga agu cca gTT	Lamin A/C [242]
sLam	*passenger*	cug gac uuc cag aag aac aTT	Lamin A/C [242]
siLam	*passenger*	cug gac uuc cag aag aac aTT	Lamin A/C [242]
	guide	ugu ucu ucu gga agu cca gTT	
asGL3	*guide*	ucg aag uac uca gcg uaa gTT	GL3 [243]
as2B-FAM	*guide*	uag agg uac gug c$\underline{\text{T}}^{*}$g agg cTT	ICAM-1 [182]
s2B-BHQ	*passenger*	gcc $\underline{\underline{\text{T}}}^{*}$ca gca cgu acc ucu aTT	ICAM-1 [182]
si2B-FAM	*passenger*	gcc uca gca cgu acc ucu aTT	ICAM-1 [182]
	guide	uag agg uac gug c$\underline{\text{T}}^{*}$g agg cTT	
sLam-Alexa488	*passenger*	cug gac uuc cag aag aac aTT*	Lamin A/C [242]
FAM-asLam	*guide*	*ugu ucu ucu gga agu cca gTT	Lamin A/C [242]
FAM-siLam	*passenger*	cug gac uuc cag aag aac aTT	Lamin A/C [242]
	guide	*ugu ucu ucu gga agu cca gTT	
19mer-FAM		ugu ua*u aau uau ugu aua c	

* Position des Fluorophors oder Fluoreszenzlöschers

$\underline{\text{T}}$ Substitution des u durch ein mit einem C_6-gekoppelten 5/6-FAM-Thymidin

$\underline{\underline{\text{T}}}$ Substitution des u durch ein BHQ1-Thymidin

3.8.3 *In vitro* Transkript

Name	Templat	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)
ICAM-1-IVT	pG-si2B(+)-NotI	ggg cga auu ggg ccc gac guc gca ugc ucc cgg ccg cca ugg ccg cgg gau uag ccg cag uca uaa ugg gca cug cag gcc uca gca cgu acc ucu aua acc gcc agc gga aga uca aga aau aaa uca cua gug cgg cc	140

Erkennungssequenz der as2B ist unterstrichen

3.8.4 Primer

Name	Sequenz (5' → 3')
Ago2 fwd AflII	TGA CTA GCT TAA GAT GTA CTC GGG AGC CGG CC
Ago2 rev AgeI	TCA GTC AAC CGG TAG CAA AGT ACA TGG TGC GCA GAG
Ago2 rev AgeI Stopp	TCA GTC AAC CGG TTC AAG CAA AGT ACA TGG TGC GCA GAG
pET41b fwd	CCA GCA ACC GCA CCT GTG
pET41b BlpI rev	GGG TTA TGC TAG TTA TTG CTC AGC
972 rev	AGA GGG TTA GAG CAG CCT T
1233 fwd	GGC AGA TGA AGA GGA AGT AC
1411 fwd	GGA GCA GAA ACA CAC CTA C
1506 rev	CTA GCA GTC GCT CTG ATC A
2316 fwd	ACC GGC AGG AGA TCA TAC A
2519 rev	GCA CCA CGA TGA AGG TGA T
pET41b rev T7 term	TGC TAG TTA TTG CTC AGC GGT

3.9 Kits

Name	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Bradford Assay Kit	Biorad
ECL™ Western Blotting Reagent	Thermo Fisher Scientific
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
Non-Interfering™ Protein Assay	Biosciences
Nucleobond Xtra Maxi Kit	Macherey & Nagel
Phusion High Fidelity Polymerase Kit	Finnzymes
Silver Stain Kit	Biorad
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit	Promega

3.10 Enzyme, Proteine und Größenmarker

Name	Hersteller
AflII (BspTI)	Fermentas
AgeI (BshTI)	Fermentas
Alkalische Phosphatase (1 u/μl)	Roche
BlpI	New England Biolabs
DNaseI (10 u/μl)	Roche
Gelfiltrationsstandard (1,35 – 670 kDa)	Biorad
Gene Ruler™ DNA Ladder 1 kb Plus	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder High Range	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Low Range	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Ultra Low Range	Fermentas
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 u/μl)	Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
RNasin® Plus RNase Inhibitor (40 u/μl)	Promega
RNase A (10 mg/ml)	Fermentas
RNase T1 (1000 u/ml)	Fermentas
SpeI	New England Biolabs
T4 DNA Ligase (1 u/μl)	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase (10 u/μl)	Fermentas
T7 RNA Polymerase (20 u/μl)	Fermentas
Taq DNA Polymerase (5 u/μl)	New England Biolabs

3.11 Antikörper

Name	Hersteller
Anti-Ago2 (11A9) (monoklonaler Ratten-IgG)	Ascenion GmbH
Anti-GST-HRP (monoklonaler Maus-IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HA-HRP (monoklonaler Maus-IgG)	Miltenyi
Anti-Kaninchen-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	DakoCytomation
Anti-Maus-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	DakoCytomation
Anti-Penta-His (monoklonaler Maus-IgG)	Qiagen
Anti-Ratte-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	Jackson ImmunoResearch
Anti-RGS-His (monoklonaler Maus-IgG)	Qiagen

Anti-Tetra-His (monoklonaler Maus-IgG)	Qiagen
Anti-TRBP (polyklonaler Kaninchen-IgG)	abcam

3.12 Programme

Name	Hersteller/Referenz
AutoDimer v1.0	P. M. Vallone [244]
Clone Manager 7.04	Sci Ed Central
DataMax 2.20	Horiba Jobin Yvon
DynaPro Dynamics 6.7.3	Wyatt Technology
Fusion 15.09	Vilber Lourmat
GraFit 5.0.6	Erithacus Software
Image Quant 5.2	Molecular Dynamics
mFold	mFold Web Server [245, 246]
Pro-Data SX 2.0.3	AppliedPhotophysics
Pro-Data Viewer 4.0.17	AppliedPhotophysics
ProtParam	Swiss Institute of Bioinformatics [247]
Scientist	Micromath
SeqMan 7.0.0	DNAStar Lasergene
Swiss PDB Viewer v4.0.1	Swiss Institute of Bioinformatics [247]

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine PCR mit Hilfe des Phusion PCR Kits durchgeführt. Ein Ansatz enthielt in 1 × HF-Puffer neben 10 ng pET41b(+)-hAgo2-His (siehe Abschnitt 3.8.1) als Vorlage je 0,5 μM vorwärts (fwd) bzw. rückwärts (rev) gerichteten Primer, 200 μM pro dNTP und 0,02 u/μl Phusion Polymerase. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer sowie Temperaturprofile. Im Anschluss wurden die Amplifikate mit Hilfe einer TAE-Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.1.3) analysiert.

Primer	Temperaturprofil	Amplikonlänge (bp)
Klonierung GST-hAgo2-His		
Ago2 fwd AflII	98 °C für 30 s	2602
Ago2 rev AgeI	30 Zyklen	
	98 °C für 10 s	
	72 °C für 60 s	
	72 °C für 600 s	
	4 °C, ∞	
Klonierung GST-hAgo2		
Ago2 fwd AflII	98 °C für 30 s	2605
Ago2 rev AgeI Stopp	30 Zyklen	
	98 °C für 10 s	
	72 °C für 60 s	
	72 °C für 600 s	
	4 °C, ∞	

Tabelle 4.1: Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendete Primer sowie Temperaturprofile.

4.1.2 Gewinnung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* Zellen in Abhängigkeit der gewünschten Ausbeute mit Hilfe zweier Kits isoliert.

Mini-Präparation (kleiner Maßstab)

Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde eine *E. coli* Kolonie von einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum entnommen und in 4 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium überführt. Die Kultur wurde für 16 h bei 37 °*C* und 200 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers. Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurden wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben bestimmt.

Maxi-Präparation (großer Maßstab)

Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde eine *E. coli* Kolonie von einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum entnommen und in 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium überführt. Die Vorkultur wurde für ca. 8 h bei 37 °*C* und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 300 μl der Vorkultur verwendet, um 300 ml LB-Medium anzuimpfen. Die Hauptkultur wurde für ca. 16 h bei 37 °*C* und 200 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Nucleobond® Xtra Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers. Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurden wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben bestimmt.

4.1.3 Gelelektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren

Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von langkettigen Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese mit 1 × TAE (siehe Abschnitt 3.6) als Laufpuffer eingesetzt. Die Prozentigkeit der Gele wurde dabei in Abhängigkeit von der Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren mit 1 × TAE eingestellt (siehe Tabelle 4.2).

Agarosekonzentration (%, w/v)	Nukleinsäurelänge (bp)
0,5	1.000 – 30.000
0,7	800 – 12.000
1,0	500 – 10.000
1,2	400 – 7.000
1,5	200 – 3.000
3,0	10 – 1.000

Tabelle 4.2: Agarosekonzentrationen für die Agarose-Gelelektrophorese in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge.

Die Proben wurden mit Ladepuffer für Agarosegele (siehe Abschnitt 3.6) eingestellt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Menge der zu trennenden Nukleinsäuren unter Verwendung von analytischen bzw. präparativen Kämmen in einer horizontalen Gelkammer bei 10 V/cm Gellänge für 30 – 60 min. Zum Nachweis der Bandengröße wurde ein adäquater

Größenmarker (siehe Abschnitt 3.10) eingesetzt. Die Visualisierung der getrennten Nukleinsäuren erfolgte wie unter Abschnitt 4.1.4 beschrieben. Bei präparativen Ansätzen wurden die gewünschten Banden wie unter Abschnitt 4.1.5 beschrieben aus dem Gel isoliert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Kurzkettige Nukleinsäuren wurden durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit 1 × TBE (siehe Abschnitt 3.6) als Laufpuffer aufgetrennt. Die für die PAGE verwendeten Lösungen wurden zuvor durch eine Membran mit 0,2 μm Porengröße filtriert und entweder im Ultraschallbad oder durch Anlegen eines Vakuums für etwa 15 min entgast. Zum Nachweis der Bandengröße wurde ein adäquater Größenmarker (siehe Abschnitt 3.10) eingesetzt. Die Visualisierung der getrennten Nukleinsäuren erfolgte wie unter Abschnitt 4.1.4 beschrieben.

Zur Analyse doppelsträngiger Nukleinsäuren wurde die PAGE unter **nicht-denaturierenden** Bedingungen durchgeführt (nPAGE). Je nach Länge der Nukleinsäuren wurde die Prozentigkeit der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Vernetzungsgrad 19:1, v/v) mit 1 × TBE eingestellt (siehe Tabelle 4.3).

Acrylamidkonzentration (%, v/v)	Nukleinsäurelänge (bp)
3,5	100 – 2.000
5,0	75 – 500
8,0	50 – 400
12,0	35 – 250
15,0	20 – 150
20,0	5 – 100

Tabelle 4.3: Acrylamidkonzentrationen für die nicht-denaturierende PAGE in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge.

Zur Polymerisation wurden der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 0,1 % (w/v) APS sowie 0,1 % (v/v) TEMED zugesetzt. Die Proben wurden mit Ladepuffer für nicht-denaturierende PAA-Gele (siehe Abschnitt 3.6) eingestellt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei 0,7 mA/cm Gellänge für 1 – 4 h bei 4 °C, um eine Denaturierung der Nukleinsäuren durch zu hohe Temperaturen zu verhindern.

Zur Analyse einzelsträngiger Nukleinsäuren wurde die PAGE unter **denaturierenden** Bedingungen in Anwesenheit von 7 M Harnstoff durchgeführt (dPAGE). Je nach Länge der Nukleinsäuren wurde die Prozentigkeit der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Vernetzungsgrad 19:1, v/v) mit 1 × TBE eingestellt (siehe Tabelle 4.4).

Acrylamidkonzentration (%, v/v)	Nukleinsäurelänge (nt)
4,0	100 – 500
5,0	70 – 300
6,0	45 – 70
8,0	35 – 45
10,0	25 – 35
20,0	8 – 25

Tabelle 4.4: Acrylamidkonzentrationen für die denaturierende PAGE in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge.

Zur Polymerisation wurden der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung inklusive 7 M Harnstoff 0,1 % (w/v) APS sowie 0,1 % (v/v) TEMED zugesetzt. Die Proben wurden mit Ladepuffer für denaturierende PAA-Gele (siehe Abschnitt 3.6) eingestellt und vor dem Auftrag auf das Gel für 3 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei 0,7 mA/cm Gellänge für 30 – 90 min. Um denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Gel durch eine Vorelektrophorese auf ca. 50 °C erwärmt und diese Temperatur während der Elektrophorese konstant gehalten.

Für die **nukleotidgenaue Auftrennung** einzelsträngiger Nukleinsäuren wurde als Sonderform der dPAGE ein Sequenziergelsystem verwendet. Die Sequenziergele wurden in einer Größe von 0,4 mm × 20 cm × 40 cm hergestellt. Zur besseren Ablösung des Gels wurden die Glasplatten zuvor mit einer Silikonlösung (Sigmacote®, siehe Abschnitt 3.3) beschichtet. Die in Ladepuffer für denaturierende PAA-Gele aufgenommenen Proben wurden für 3 min bei 95 °C denaturiert und nach gründlichem Spülen der Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 52 °C und 70 W für 1 – 2 h.

4.1.4 Detektion von Nukleinsäuren in Elektrophoresegelen

Ethidiumbromid-Färbung

Die Visualisierung von Nukleinsäuren in Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid. Dafür wurde dem jeweiligen Ladepuffer 0,00025 % (w/v) Ethidiumbromid zugesetzt. Weiterhin enthielt die Gellösung 0,0004 % (w/v) Ethidiumbromid. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm bestrahlt und zu Dokumentationszwecken fotografiert. Die Nachweisgrenze für DNA und RNA liegt bei ca. 5 ng pro Bande.

Stains-All-Färbung

Die Visualisierung von Nukleinsäuren in PAA-Gelen erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Stains-All. Außer DNA (blau, Maximum 620 nm) und RNA (blau-violett, Maximum 600 nm) können damit auch Proteine (rot, Maximum ca. 515 nm) und Polysaccharide (verschiedene Farben, Maxima 600 – 640 nm) gefärbt werden. Nach der Elektrophorese wurden PAA-Gele für 1 – 24 h in der Stains-All-Färbelösung (siehe Abschnitt 3.6) geschwenkt und im Anschluss zu Dokumentationszwecken digitalisiert. Um eine mögliche Überlagerung der gefärbten Banden mit Bromphenolblau und Xylencyanol zu verhindern, wurde Probenpuffer ohne Farbstoffe verwendet. Die Nachweisgrenze für DNA und RNA liegt bei ca. 10 ng pro Bande.

SYBR® Gold-Färbung

Die Visualisierung von Nukleinsäuren ohne gleichzeitige Visualisierung von Proteinen in PAA-Gelen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Gold. Nach der Elektrophorese wurden PAA-Gele für ca. 30 min in der SYBR® Gold-Färbelösung (siehe Abschnitt 3.6) geschwenkt. Mit Hilfe des PhosphorImagers Typhoon™ 8600 wurden die Nukleinsäuren-Farbstoff-Komplexe bei einer Wellenlänge von 495 nm angeregt und das emittierte Licht detektiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Image Quant 5.2. Um eine mögliche Überlagerung der fluoreszierenden Banden mit Bromphenolblau und Xylencyanol zu verhindern, wurde Probenpuffer ohne Farbstoffe verwendet. Die Nachweisgrenze für DNA und RNA liegt bei ca. 1 ng pro Bande.

Autoradiographie

Als Autoradiographie bezeichnet man die Sichtbarmachung von chemischen Stoffen durch radioaktive Isotope, die eine Schwärzung auf einem Film hinterlassen oder deren Strahlung mit Hilfe eines Strahlungsdetektors visualisiert werden kann. Dieses Verfahren wurde angewendet, um mit [^{32}P] radioaktiv markierte RNA in PAA-Gelen (siehe Abschnitt 4.1.3) zu visualisieren. Sequenziergele wurden vor der Exposition für 1 h bei 80 $°C$ getrocknet. Die Gele wurden für bis zu 72 h auf einer [^{32}P]-sensitiven Bildplatte (*Storage Phosphor Screen*) exponiert, die anschließend mittels PhosphorImager Typhoon™ 8600 eingescannt wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Image Quant 5.2.

4.1.5 Nukleinsäure-Isolierung aus Agarosegelen

Für die weitere Verwendung von mittels präparativer TAE-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren mussten diese isoliert werden. Dazu wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kits nach Herstellerangaben extrahiert.

4.1.6 Restriktionshydrolyse von DNA

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die eine spezifische Nukleotidsequenz erkennen und DNA an definierten Stellen hydrolysieren können. Sie wurden eingesetzt, um Plasmid-DNA anhand eines Schnittmusters zu analysieren bzw. zu linearisieren oder zueinander kompatible Enden von DNA-Fragmenten, wie PCR-Produkten, zu generieren und somit für eine Ligation vorzubereiten. Je nach Sequenzkontext wurden adäquate Restriktionsenzyme eingesetzt und die Hydrolyse bei 37 °*C* nach Herstellerangaben im jeweils passenden Puffersystem durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.1.3) aufgetrennt, die Banden unter UV-Licht visualisiert (siehe Abschnitt 4.1.4) und ggf. für die weitere Verwendung extrahiert (siehe Abschnitt 4.1.5).

4.1.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für das Einbringen von Plasmid-DNA durch Elektroporation in verschiedene *E. coli* Stämme mussten diese von Salzen befreit und ihre Membran durch Waschen mit einem Wasser/Glyzeringemisch destabilisiert werden. Dazu wurde 1 l LB-Medium mit 15 ml einer Übernachtkultur des entsprechenden *E. coli* Stammes auf eine initiale OD_{600} von ca. 0,05 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,8 bei 37 °*C* schüttelnd inkubiert. Die folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °*C* und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt, um eine maximale Transformationsrate zu erreichen. Zur Sedimentation der Zellen wurden diese für 20 min bei 5.000 × g und 4 °*C* zentrifugiert und anschließend 2 × in je 250 ml H_2O gewaschen. Anschließend wurden sie in 20 ml 10 % (v/v) Glyzerin resuspendiert und für 30 min bei 5.000 × g und 4 °*C* pelletiert. Zuletzt wurden die Zellen in 1 ml 10 % (v/v) Glyzerin resuspendiert, in Aliquots von 90 µl portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung elektrokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte bei −80 °*C*.

4.1.8 Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Oligonukleotiden oder PCR-Produkten

Mit Hilfe der T4 DNA Ligase wurden DNA-Fragmente mit zueinander kompatiblen Enden (siehe Abschnitt 4.1.6) verknüpft und somit Gene von Interesse in ein transformierbares Plasmid eingebracht. Hierfür wurden in einem Ansatz 1 × Ligationspuffer 100 ng eines linearisierten, aus einem Agarosegel isolierten Plasmids (siehe Abschnitt 4.1.5) entweder mit äquimolaren Mengen oder einem dreifachen Überschuss von Insert sowie 0,1 u T4 DNA Ligase gemischt und für 6 h bei 22 °*C* inkubiert. Anschließend wurde die Ligase durch eine Inkubation für 10 min bei 65 °*C* inaktiviert.

Um die Menge an religiertem Plasmid ohne Insert zu ermitteln, wurde in einem weiteren Ansatz linearisiertes Plasmid allein wie beschrieben behandelt.

4.1.9 Transformation

Für die Einschleusung von Plasmiden in *E. coli* Stämme wurden sie einer Elektroporation unterzogen. Dabei wird für einige Millisekunden ein elektrisches Feld an eine Zellsuspension angelegt, um so die Zellwände zu permeabilisieren und die Aufnahme von Plasmiden zu ermöglichen.

Es wurde 1/10 eines Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 4.1.8) oder 10 ng Plasmid-DNA mit 40 μl elektrokompetenter *E. coli* Zellen (siehe Abschnitt 4.1.7) gemischt und in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Spalt überführt. Der Elektroporator wurde auf 2,5 kV, 200 Ω und 25 μF eingestellt und das elektrische Feld angelegt. Es wurde 1 ml auf 37 $^{\circ}C$ temperiertes LB-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37 $^{\circ}C$ und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert, um Einzelkolonien transformierter *E. coli* Bakterien zu erhalten. Es folgte eine Inkubation für ca. 16 h bei 37 $^{\circ}C$. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels PCR analysiert (siehe Abschnitt 4.1.10).

4.1.10 Untersuchung von *E. coli* Kolonien mittels PCR

Um zu verifizieren, ob die nach einer Elektroporation (siehe Abschnitt 4.1.9) gewachsenen Bakterienkolonien Plasmide in sich trugen, wurden sie mittels PCR analysiert. Im Falle einer erfolgreichen Elektroporation war die Bindung der Primer an das Plasmid und die Amplifikation der entsprechenden Sequenz zu erwarten. Die Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in einen PCR-Ansatz überführt (siehe Abschnitt 4.1.1), der statt der Phusion Polymerase 0,1 u/μl Taq Polymerase und den entsprechenden 1 $\times$ Puffer enthielt. Tabelle 4.5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer sowie das Temperaturprofil. Im Anschluss wurden die Amplifikate mit Hilfe einer TAE-Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.1.3) analysiert.

Primer	Temperaturprofil	Amplikonlänge (bp)
pET41b fwd	94 $^{\circ}C$ für 600 s	982
pET41b BlpI rev	25 Zyklen	
	94 $^{\circ}C$ für 15 s	
	65 $^{\circ}C$ für 15 s	
	72 $^{\circ}C$ für 60 s	
	72 $^{\circ}C$ für 600 s	
	4 $^{\circ}C$, ∞	

Tabelle 4.5: Für die Analyse von Bakterienkolonien mittels PCR verwendete Primer sowie das Temperaturprofil.

4.1.11 Kryokonservierung von *E. coli* Bakterienstämmen

E.coli Stämme wurden für die Lagerung über längere Zeiträume als Glyzerinkulturen konserviert. Dazu wurde eine Einzelkolonie des gewünschten Stammes für ca. 16 h bei 37 °*C* und 200 rpm in LB- oder TFB-Medium inkubiert. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit sterilem 87 % (v/v) Glyzerin gemischt, aliquotiert und bei – 80 °*C* gelagert.

4.1.12 Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA

Für die Sequenzierung von Plasmidabschnitten wurde zunächst Plasmid-DNA aus *E. coli* Stämmen gewonnen (siehe Abschnitt 4.1.2). Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger [248]. Ähnlich wie bei der PCR wird hierbei DNA an einer einzelsträngigen Vorlage neu synthetisiert. Zusätzlich zu den dNTPs sind in dem Ansatz noch Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) enthalten, welche zufällig eingebaut werden und zum Kettenabbruch führen. Die vier ddNTPs sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die jeweils ein anderes Fluoreszenzmaximum aufweisen und dadurch unterscheidbar sind.

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Für die Sequenzier-Reaktion wurden in 20 µl-Ansätzen ca. 1 µg Plasmid-DNA als Vorlage mit 3 µl 5 × Puffer, 2 µl BigDye und 1 µM Primer gemischt. Die Zielsequenz wurde im Thermocycler vervielfältigt (siehe Tabelle 4.6) und anschließend auf 100 µl mit H_2O expandiert. Die DNA wurde mit Hilfe von Ethanol präzipitiert (siehe Abschnitt 4.2.5) und getrocknet. Die weitere Verarbeitung erfolgte außerhalb des Instituts für Molekulare Medizin durch Mitarbeiter der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm SeqMan 7.0.0.

Primer	Temperaturprofil
pET41b fwd	96 °*C* für 180 s
972 rev	24 Zyklen
1233 fwd	96 °*C* für 20 s
1411 fwd	50 °*C* für 20 s
1506 rev	60 °*C* für 240 s
2316 fwd	4 °*C*, ∞
2519 rev	
pET41b rev T7 term	
pET41b BlpI rev	

Tabelle 4.6: Für die Sequenzierung von Klonen verwendete Primer sowie das Temperaturprofil.

4.2 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

4.2.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde photometrisch ermittelt. Die Absorption bei 260 nm wurde mit den Spektrophotometern Nanodrop oder DU-640 gemessen. Daraus wurde durch das Lambert-Beer'sche Gesetz die Konzentration (c) berechnet:

$$A_{260\ \mathrm{nm}} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A_{260\ \mathrm{nm}}}{\varepsilon \cdot d} \tag{4.1}$$

mit $A_{260\ \mathrm{nm}}$ = Absorption, ε = molarer Extinktionskoeffizient ($\mathrm{cm^{-1}\ M^{-1}}$) und d = Schichtdicke (cm). Für Oligonukleotide mit bekannter Sequenz wurde der molare Extinktionskoeffizient aus der Summe der molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen berechnet. Für Nukleinsäuren mit unbekannter Sequenz wurde folgende Näherung verwendet:

$A_{260\ \mathrm{nm}} = 1$ entspricht 50 μg/ml dsDNA
$A_{260\ \mathrm{nm}} = 1$ entspricht 33 μg/ml ssDNA
$A_{260\ \mathrm{nm}} = 1$ entspricht 40 μg/ml RNA

Zusätzlich wurde das Verhältnis $A_{260\ \mathrm{nm}}/A_{280\ \mathrm{nm}}$ berechnet, um die Reinheit der Präparation zu überprüfen. RNA wurde bei einem Verhältnis von 1,9 – 2,1, DNA bei einem Verhältnis von 1,8 – 2,0 als ausreichend rein befunden.

4.2.2 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Für die Generierung von doppelsträngiger siRNA wurden *guide* und *passenger* Strang miteinander hybridisiert. Für die Modifikation des Vektors pET41b (siehe Abschnitt 3.8.1) wurden zwei komplementäre 120 nt lange DNA-Fragmente hybridisiert.

Es wurden äquimolare Mengen beider zu hybridisierender Nukleinsäure-Stränge für 5 min bei 90 °C und anschließend für 1 h bei 37 °C im jeweiligen 1 × Hybridisierungspuffer (siehe Abschnitt 3.6) inkubiert. Die Überprüfung auf vollständige Hybridisierung erfolgte mittels nPAGE (siehe Abschnitt 4.1.3).

4.2.3 *In vitro* Transkription

Die bei Spaltungsassays (siehe Abschnitt 4.4.1) verwendete *target* RNA ICAM-1-IVT wurde mittels *in vitro* Transkription hergestellt. Dabei diente das mit dem Restriktionsenzym NotI linearisierte Plasmid pG-si2B(+) (siehe Abschnitt 4.1.6) als Vorlage für die T7 RNA Polymerase zur Synthese eines 140 nt umfassenden Abschnitts des ICAM-1 Gens. Das Fragment beinhaltet die zum *guide* Strang der siRNA si2B komplementäre Erkennungssequenz (siehe 3.8.3). Durch die Linearisierung erfolgte die Transkription durch die T7 RNA Polymerase vom Promotor bis zur NotI-Schnittstelle.

Die *in vitro* Transkription wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Ein Standard-Reaktionsansatz setzte sich aus 1 × Transkriptionspuffer, 1 μg linearisiertem Plasmid, 2 mM pro NTP, 0,8 u/μl RiboLock RNase Inhibitor und 0,2 u/μl T7 RNA Polymerase zusammen. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend um 0,2 u/μl DNaseI ergänzt. Nach einer weiteren Inkubation für 15 min bei 37 °C wurden nicht inkorporierte NTPs durch Gelfiltration mit einer Sephadex-G-50 Säule nach Herstellerangaben abgetrennt. Das *in vitro* Transkript wurde durch Phenol/Chloroform extrahiert (siehe Abschnitt 4.2.4), mit Ethanol gefällt (siehe Abschnitt 4.2.5) und das Präzipitat in H_2O aufgenommen. Es folgte eine Überprüfung der Transkriptlänge mittels Agarose-Gelelektrophorese oder dPAGE (siehe Abschnitt 4.1.3) und die Quantifizierung sowie Bestimmung des Reinheitsgrades (siehe Abschnitt 4.2.1). Bis zu seiner weiteren Verwendung wurde das *in vitro* Transkript bei −20 °C gelagert.

4.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Durch die Phenol/Chloroform-Extraktion können Nukleinsäuren aus proteinhaltigen wässrigen Lösungen isoliert werden. Proteine werden durch Phenol denaturiert und sammeln sich in der Interphase zwischen der hydrophoben Phenol- und der wässrigen Phase. Phenolreste werden durch Waschen mit Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch entfernt. Für die Extraktion von DNA wurde Phenol mit einem pH-Wert von 7,5 – 8,0 verwendet, für RNA lag der pH-Wert zwischen 4,5 – 5,0.

Die zu isolierende Nukleinsäure wurde mit gleichem Volumen eines Gemisches aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v) versetzt, kräftig geschüttelt und für 1 min bei 20.000 × g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, 2 × mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) gewaschen und je 2 min bei 20.000 × g und Raumtemperatur bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde die Nukleinsäure enthaltende wässrige Phase einer Ethanolpräzipitation unterzogen (siehe Abschnitt 4.2.5).

4.2.5 Präzipitation von Nukleinsäuren

Ethanolpräzipitation

In Gegenwart monovalenter Kationen und im leicht sauren pH-Bereich bilden Nukleinsäuren in Ethanol einen nicht löslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert werden kann.

Eine wässrige Nukleinsäure-Lösung wurde mit 300 mM $NaCH_3COOH$ pH 4,8 – 5,2 angesäuert und in Anwesenheit von 0,05 mg/ml Glycogen als Fällhilfe mit dem 2,5 – 3 × Volumen 100 % (v/v) Ethanol versetzt. Es folgte eine Inkubation für 1 – 24 h bei −20 °C oder −80 °C. Die präzipitierte Nukleinsäure wurde durch Zentrifugation für 1 h bei 20.000 × g und 4 °C sedimentiert, 2 × mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in einem beliebigen Volumen H_2O oder 10 mM Tris pH 7,5 aufgenommen. Die Konzen-

tration wurde wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben bestimmt.

Isopropanolpräzipitation

Zur Fällung von Plasmid-DNA nach einer Maxi-Präparation (siehe Abschnitt 4.1.2) wurde eine Präzipitation mit Hilfe von Isopropanol eingesetzt. Dafür wurde die Nukleinsäure-Lösung mit dem 0,7 – 1 × Volumen Isopropanol versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierte Nukleinsäure wurde durch Zentrifugation für 45 min bei 12.000 × g und 4 °*C* sedimentiert, 2 × mit 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in einem beliebigen Volumen H_2O aufgenommen. Die Konzentration wurde wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben bestimmt.

4.2.6 Modifikation von Nukleinsäure-5'-Enden

Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Dephosphorylierung erfolgte durch die Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen mittels Alkalischer Phosphatase (AP) und wurde als Vorbereitung für eine effektive radioaktive 5'-Endmarkierung von *target* RNA eingesetzt.

20 pmol *in vitro* Transkript (siehe Abschnitt 4.2.3) wurden unter RNase-freien Bedingungen in 1 × Dephosphorylierungspuffer mit 0,4 u/μl RiboLock RNase Inhibitor und 0,1 u/μl AP für 2 h bei 50 °*C* inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 4.2.4) und eine Ethanolpräzipitation (siehe Abschnitt 4.2.5). Die Integrität des *in vitro* Transkriptes wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.1.3) überprüft. Bis zu seiner weiteren Verwendung wurde das dephosphorylierte *in vitro* Transkript bei −20°*C* gelagert.

Phosphorylierung von 5'-Enden

Die Phosphorylierung erfolgte mit Hilfe des Enzyms T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK), die den Transfer einer ATP-Phosphatgruppe auf das hydroxylierte 5'-Ende eines Nukleinsäurestranges katalysiert.

500 pmol Nukleinsäure wurden in 1 × PNK-Puffer A mit 1 mM ATP und 1 u/μl T4 PNK für 1 h bei 37 °*C* und anschließend für 10 min bei 75 °*C* inkubiert. Das nicht inkorporierte ATP wurde durch Gelfiltration mit einer Sephadex-G-50 Säule nach Herstellerangaben abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 4.2.4) und eine Ethanolpräzipitation (siehe Abschnitt 4.2.5).

Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren

Für die spätere Detektion mittels Autoradiographie (siehe Abschnitt 4.1.4) wurde *target* RNA analog zur 5'-Phosphorylierung von Nukleinsäuren mit [γ-^{32}P]-ATP radioaktiv markiert. Die

5'-Endmarkierung wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Es wurden 10 pmol Nukleinsäure in 1 × PNK-Puffer A mit 1 u/μl RiboLock RNase Inhibitor, 10 pmol [γ-^{32}P]-ATP (6000 Ci/mmol) und 0,5 u/μl T4 PNK für 1 h bei 37 °C und anschließend für 10 min bei 75 °C inkubiert. Das nicht inkorporierte ATP wurde durch Gelfiltration mit einer Sephadex-G-50 Säule nach Herstellerangaben abgetrennt. Die radioaktiv markierte *target* RNA wurde in 400 μl H_2O eluiert und die Effizienz der Reaktion mittels Messung der Flüssigszintillation im β-Zähler in Dreifachbestimmung ermittelt.

4.2.7 Herstellung radioaktiver Nukleinsäure-Größenmarker

Für die Abschätzung der Größen von Nukleinsäure-Banden wurde auf Sequenziergelen (siehe Abschnitt 4.1.3) ein radioaktiver Größenmarker aufgetragen, der durch den Verdau einer radioaktiv 5'-endmarkierten *target* RNA (siehe Abschnitt 4.2.6) durch RNase T1 hergestellt wurde. Bei dem Enzym RNase T1 handelt es sich um eine Endonuklease, die die Spaltung einzelsträngiger RNA auf der 3'-Seite von Guanin-Nukleotiden katalysiert.

200 fmol der radioaktiv markierten *target* RNA wurden mit 1 μg nicht markierter RNA versetzt, deren Überschuss eine quantitative Spaltung der *target* RNA verhindert. Die Nukleinsäure wurde für 1 h in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 9 μl RSB-Puffer (siehe Abschnitt 3.6) aufgenommen. Es folgte die Spaltung mit 1 – 100 u/μl RNase T1 für 15 min bei 50 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ladepuffer für denaturierende PAA-Gele gestoppt. Tabelle 4.7 gibt die Länge der radioaktiven Spaltprodukte an.

Länge der Spaltprodukte (nt)		
ICAM-1-IVT		s2B
140	89	21
138	85	11
137	79	7
135	78	1
133	75	
119	70	
113	69	
110	68	
109	60	
107	57	
103	54	

Tabelle 4.7: Länge der Banden der radioaktiven Nukleinsäure-Größenmarker.

4.3 Methoden im Umgang mit Proteinen

4.3.1 Quantifizierung von Proteinen

Für die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung wurden verschiedene Verfahren verwendet. Die Wahl des Verfahrens hing dabei beispielsweise von der Anzahl der aromatischen Aminosäuren und somit vom molaren Extinktionskoeffizienten ab, oder von einer möglichen Verunreinigung durch Nukleinsäuren. Dabei ist es üblich, dass die mit unterschiedlichen Methoden ermittelten Werte voneinander abweichen. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Art der Proteinbestimmung mit der entsprechenden Konzentration angegeben.

Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptionsmessung beruht auf der Tatsache, dass Proteine bei bestimmten Wellenlängen Licht absorbieren. Die aromatische Aminosäure Tryptophan besitzt ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Auch Tyrosin und Phenylalanin absorbieren Licht dieser Wellenlänge. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung von Proteinen besitzt jedes einen charakteristischen molaren Extinktionskoeffizienten, der anhand der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms *ProtParam* berechnet wurde [249]. Nach Messung der **Absorption bei 280 nm** (A_{280}) mit den Spektrophotometern Nanodrop oder DU-640 und Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten wurde unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (siehe Abschnitt 4.2.1) die Konzentration berechnet.

Bei Proteinen, die keine oder wenige aromatische Aminosäuren enthalten bzw. die eventuell mit Nukleinsäuren kontaminiert waren, wurde das Verfahren nach **Ehresmann** [250] angewendet. Es wurden die Absorptionen bei 228,5 nm und 234,5 nm gemessen und die Konzentration wie folgt berechnet:

$$c = \frac{A_{228\,\mathrm{nm}} - A_{234\,\mathrm{nm}}}{3,1} \tag{4.2}$$

mit $c =$ Konzentration (mg/ml) und $A_{228\,\mathrm{nm}/234\,\mathrm{nm}} =$ jeweilige Absorption.

Bei Proteinlösungen, die bis zu 20% (w/v) Nukleinsäuren oder Nukleotide enthielten, wurde die Berechnung nach **Warburg** [251] eingesetzt. Es wurden die Absorptionen bei 280 nm und 260 nm gemessen und die Konzentration wie folgt berechnet:

$$c = 1,55 \cdot A_{280\,\mathrm{nm}} - 0,76 \cdot A_{260\,\mathrm{nm}} \tag{4.3}$$

mit $c =$ Konzentration (mg/ml) und $A_{280\,\mathrm{nm}/260\,\mathrm{nm}} =$ jeweilige Absorption.

Um die Proteinkonzentration weitgehend unabhängig von ihren aromatischen Aminosäuren zu ermitteln, wurde das Verfahren nach **Scopes** [252] angewendet. Hierbei wird die Tatsache genutzt, dass die π-Elektronen der Peptidbindungen im Proteinrückgrat Licht der Wellenlänge 205 nm absorbieren. Da die aromatischen Aminosäuren ebenfalls bei dieser Wellenlänge eine

schwache Absorption aufweisen, wird dies bei der Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten bei 205 nm berücksichtigt:

$$\varepsilon_{205\,\mathrm{nm}} = 27 + 120 \cdot \frac{A_{280\,\mathrm{nm}}}{A_{205\,\mathrm{nm}}} \tag{4.4}$$

mit $\varepsilon_{205\,\mathrm{nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient bei 205 nm (cm^{-1} mg/ml) und $A_{280\,\mathrm{nm}/205\,\mathrm{nm}}$ = jeweilige Absorption. Nach der Messung der Absorption bei 205 nm und der Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizient bei 205 nm wurde die Konzentration gemäß dem modifizierten Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$A_{205\,\mathrm{nm}} = \varepsilon_{205\,\mathrm{nm}} \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A_{205\,\mathrm{nm}}}{\varepsilon_{205\,\mathrm{nm}} \cdot d} \tag{4.5}$$

mit $A_{205\ \mathrm{nm}}$ = Absorption, $\varepsilon_{205\,\mathrm{nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient bei 205 nm (cm^{-1} mg/ml) und d = Schichtdicke (cm).

Non Interfering Assay

Beim *Non Interfering* (NI) Assay werden Proteine präzipitiert und somit von Substanzen getrennt, die bei der Bestimmung der Konzentration stören würden, z. B. DTT oder SDS. Gefälltes Protein reagiert mit Kupfer-Ionen, wobei die ungebundenen Kupfer-Ionen mit Hilfe einer chemischen Farbreaktion detektiert werden und die Farbintensität umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration ist. Die Nachweisgrenze liegt bei 500 ng Protein.

Für diese Methode wurde das NI Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration ungebundener Kupfer-Ionen wurde mittels photometrischer Messung der Absorption bei 480 nm mit dem Spektrophotometer DU-640 bestimmt. Als Referenz diente eine Standardreihe von 0 – 50 μg BSA.

Bradford Assay

Die Methode beruht auf einer Komplexierung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G 250 mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen im sauren Milieu. Der freie Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 465 nm, der Komplex bei 595 nm. Die Absorption bei 595 nm ist also proportional zur Proteinkonzentration [253].

Für diese Methode wurde das Bradford Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration von komplexiertem Coomassie Brilliantblau G 250 wurde mittels photometrischer Messung der Absorption bei 595 nm mit dem Spektrophotometer DU-640 bestimmt. Als Referenz diente eine Standardreihe von 0 – 20 μg BSA.

4.3.2 Fällung von Proteinen

Ammoniumsulfat-Fällung

Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$) ist ein kosmotropes Salz, das hydrophobe Effekte in Proteinlösungen vergrößert und somit Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen fördert. Dabei schützt es in hohen Konzentrationen die biologische Aktivität, führt also nicht zu Denaturierung.

Eine Lösung mit dem zu fällenden Protein wurde bei $4\,°C$ unter Rühren bis zu einer Sättigung von 60 % mit $(NH_4)_2SO_4$ versetzt und für 1 – 24 h rührend bei $4\,°C$ inkubiert. Das Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation bei $50.000 \times$ g und $4\,°C$ für 30 min sedimentiert und in gewünschtem Volumen und Puffer gelöst.

Trichloressigsäure-Fällung

Bei der Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) handelt es sich um eine effiziente, quantitative Präzipitationsmethode. Es kommt zu einer irreversiblen Denaturierung von Proteinen, weshalb diese Art der Fällung nur angewendet wurde, wenn die biologische Aktivität der Proteine für weitere Anwendungen nicht mehr benötigt wurde, z. B. bei der SDS-PAGE (siehe 4.3.3).

Eine Lösung mit dem zu fällenden Protein wurde bei $4\,°C$ auf eine finale Konzentration von 10 % TCA (w/v) eingestellt und für 1 – 24 h auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation bei $20.000 \times$ g und $4\,°C$ für 20 min sedimentiert und in gewünschtem Volumen und Puffer gelöst.

4.3.3 Gelelektrophorese zur Analyse von Proteinen

Für die elektrophoretische Separation von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [254] angewendet. Bei dieser Methode werden Proteine durch Hitze und DTT oder β-Mercaptoethanol denaturiert und durch SDS umhüllt, da es an hydrophobe Regionen der Proteine bindet. So weisen alle Proteine eine negative Nettoladung und eine ellipsoide Form auf, weshalb sie sich im elektrischen Feld ausschließlich auf Grund ihrer Größe unterschiedlich schnell durch ein PAA-Gel bewegen. Durch Verwendung eines adäquaten Größenmarkers (siehe Abschnitt 3.10) kann einzelnen Proteinbanden ein Molekulargewicht zugeordnet werden.

Die Proben wurden mit Ladepuffer für SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.6) eingestellt und vor dem Probenauftrag für 3 min bei $95\,°C$ denaturiert. Als Laufpuffer diente 1× Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.6).

Die SDS-PAGE erfolgte in einer vertikalen Gelkammer mit $85 \times 100 \times 0{,}75$ mm großen Gelen bei 1,7 mA/cm Gellänge für 90 – 120 min. Die Gele bestanden aus einem 5 %igen Sammelgel und einem Trenngel, dessen Prozentigkeit sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine richtete (siehe Tabelle 4.8).

Komponente	Sammelgel	Trenngel	
		Trennbereich	*Prozentigkeit*
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1, v/v)	5 % (v/v)	50 – 350 kDa	6 % (v/v)
		30 – 300 kDa	8 % (v/v)
		20 – 250 kDa	10 % (v/v)
		10 – 200 kDa	12 % (v/v)
		3 – 100 kDa	15 % (v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	–	125 mM	
Tris-HCl (pH 6,8)	375 mM	–	
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	
APS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	
TEMED	0,1 % (v/v)	0,06 % (w/v)	

Tabelle 4.8: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel sowie Prozentigkeit des Trenngels in Abhängigkeit vom Trennbereich.

4.3.4 Detektion von Proteinen in Elektrophoresegelen und auf PVDF-Membranen

Coomassie-Färbung

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliantblau R 250 färbt Proteine unspezifisch durch Anlagerung an basische Aminosäure-Seitenketten. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 100 ng Protein pro Bande.

Für die Visualisierung von Proteinen wurden SDS-Gele (siehe Abschnitt 4.3.3) oder PVDF-Membranen (siehe Abschnitt 4.3.5) für 1 – 24 h bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend in Coomassie-Entfärbelösung inkubiert (siehe Abschnitt 3.6), bis ein optimales Signal/Hintergrund-Verhältnis erreicht wurde. Durch die in beiden Lösungen enthaltene Essigsäure wurden die Proteine gleichzeitig fixiert. Gele wurden für 1 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet und zu Dokumentationszwecken digitalisiert.

Ponceau S-Färbung

Alternativ zur Färbung mit Coomassie-Brilliantblau R 250 wurden Proteine auf PVDF-Membranen mit dem Azofarbstoff Ponceau S visualisiert, der an die positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen bindet. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Färbung vollständig reversibel ist und im Anschluss eine Immundetektion durchgeführt werden kann. Somit eignet sich die Ponceau S-Färbung als Kontrolle für den Elektrotransfer von Proteinen.

PVDF-Membranen (siehe Abschnitt 4.3.5) wurden für ca. 10 min bei Raumtemperatur in Ponceau S-Färbelösung (siehe Abschnitt 3.6) geschwenkt und anschließend mit H_2O bis zum

Erreichen eines optimalen Signal/Hintergrund-Verhältnisses inkubiert. Für eine folgende Immundetektion der Proteine (siehe Abschnitt 4.3.5) wurden diese mit H_2O vollständig entfärbt.

Silbernitrat-Färbung

Für die Visualisierung von geringen Proteinmengen in SDS-Gelen (siehe Abschnitt 4.3.3) wurde eine Silbernitrat-Färbung durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine durch Essigsäure im Gel fixiert und in einer Silbernitratlösung inkubiert. Dabei lagern sich Silber-Ionen an den Proteinen an, die durch formaldehydhaltige Entwicklerlösung zu unlöslichem atomarem Silber reduziert werden. Die Proteine werden durch das braun-schwarze Silberpräzipitat angefärbt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 1 ng Protein pro Bande.

Silberfärbungen wurden mit Hilfe des Silver Stain Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurden Gele für 1 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet und zu Dokumentationszwecken digitalisiert.

4.3.5 Western-Analyse

Neben den unspezifischen Färbemethoden für Proteine (siehe Abschnitt 4.3.4) besteht die Möglichkeit der spezifischen Detektion mit Hilfe von Antikörpern. Dafür werden Proteine zunächst mittels SDS-PAGE separiert (siehe Abschnitt 4.3.3) und dann durch Elektrotransfer auf eine Membran übertragen und immobilisiert. Nun können Proteine durch Immundetektion mit gegen sie gerichteten Antikörpern gezielt visualisiert werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode hängt stark vom verwendeten Antikörper ab, ist i. d. R. jedoch weitaus sensitiver als eine Färbung mit Coomassie-Brilliantblau R 250.

Elektrotransfer

Für den Elektrotransfer wurde das *semidry blot* Verfahren angewendet. Dabei wurde eine PVDF-Membran für 2 min in 100 % (v/v) Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem die Proteine enthaltenden SDS-Gel für 10 – 15 min in 1 × Transferpuffer (siehe Abschnitt 3.6) equilibriert. Zusätzlich wurden sechs Lagen 3 mm starkes Filterpapier in 1 × Transferpuffer getränkt und zusammen mit Gel und Membran in folgender Anordnung in die horizontale Blotkammer gelegt:

(-) Kathode
drei Lagen 3 mm Filterpapier
SDS-Gel
PVDF-Membran
drei Lagen 3 mm Filterpapier
(+) Anode

Es wurde für 90 min ein elektrisches Feld mit 0,8 mA/cm^2 angelegt. Die Effizienz des Elektrotransfers wurde durch Coomassie-Färbung des SDS-Gels sowie ggf. durch Ponceau S-Färbung der Membran kontrolliert (siehe Abschnitt 4.3.4).

Immundetektion

Für die Sättigung freier Bindungsstellen wurde die mit Proteinen beschichtete PVDF-Membran bei Raumtemperatur in Blockpuffer geschwenkt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran in einer die spezifischen Primärantikörper enthaltenden Lösung. Zur Verringerung des Hintergrundsignals wurde überschüssiger Primärantikörper durch Waschen entfernt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines den Primärantikörper bindenden Sekundärantikörpers, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist oder durch die direkte Kopplung des Primärantikörpers mit der HRP. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch Waschen entfernt und die Proteine indirekt durch Chemilumineszenz mit Hilfe des Kits ECL Western Blotting Reagent nach Herstellerangaben visualisiert. Dabei katalysiert HRP die Oxidation von Luminol und die auftretende Lumineszenz wurde entweder durch Exposition der PVDF-Membran auf einem Hyperfilm mit anschließender Entwicklung oder durch Fotografieren der Membran mit einer Chemilumineszenz-sensitiven Kamera detektiert. Tabelle 4.9 fasst die Versuchsbedingungen für die Immundetektion der verschiedenen Epitope zusammen. Die Zusammensetzung der Puffer ist unter Abschnitt 3.6 aufgeführt.

Die Auswertung der Chemilumineszenz-Aufnahmen erfolgte mit dem Programm Fusion 15.09. Eine Quantifizierung der Intensität einzelner Banden wurde bei Bedarf mit dem Programm Image Quant 5.2 vorgenommen.

Blockierung	Primärantikörper	Waschen I	Sekundärantikörper	Waschen II
Nachweis von hAgo2				
30 min Blockpuffer I	16 h, 4 °C α-Ago2 (11A9) 1:50 in Blockpuffer I	3×5 min TBS-T	1 h α-Ratte-HRP 1:5000 in Blockpuffer I	5×5 min TBS-T
Nachweis von hTRBP				
30 min Blockpuffer II	1 h α-TRBP 1:2000 in Blockpuffer II	3×5 min TBS-T	1 h α-Kaninchen-HRP 1:2000 in Blockpuffer II	3×5 min TBS-T

Nachweis von His				
1 h Blockpuffer III (*)	16 h, 4 °*C* α-Penta/Tetra/ RGS-His 1:5000 in Block- puffer III	2×10 min TBS-T 1×10 min TBS	1 h α-Maus-HRP 1:1000 in Block- puffer IV	4×10 min TBS-T
Nachweis von GST				
30 min Blockpuffer I	1 h α-GST-HRP 1:200 in Block- puffer I	5×5 min TBS-T		
Nachweis von HA				
1 h RotiBlock	16 h, 4 °*C* α-HA-HRP 1:7500 in RotiBlock	4×5 min TBS-T 1×5 min TBS		

(*) Vor der Blockierung wurde die Membran 2×10 min mit TBS und nach der Blockierung 2×10 min mit TBS-T sowie 1×10 min mit TBS gewaschen.

Tabelle 4.9: Versuchsbedingungen für die Immundetektion verschiedener Epitope.

4.3.6 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* Bakterien

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden *E. coli* Kulturen als Schüttelkultur bis 2 l oder in einem Fermenter mit 10 l Volumen verwendet. Für das Animpfen der jeweiligen Hauptkultur wurde eine adäquate Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum zunächst in eine Vorkultur überführt. Diese wurde bei 37 °*C* und 200 rpm für mindestens 16 h inkubiert. Für das Animpfen sehr großer Volumina wurde ggf. das Volumen der Vorkultur nach 8 h Inkubation expandiert. In der Hauptkultur wurde die Vorkultur dermaßen verdünnt, dass sich eine OD_{600} von 0,1 – 0,2 einstellte. Die Bakterien wurden bei 17 – 37 °*C* und 200 rpm inkubiert, bei der Fermentation wurde der Kultur zusätzlich Luft zugeführt und extensive Schaumbildung durch Zugabe von AntiFoam verhindert. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,8 – 1,0 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Induktionsdauer wurde in Abhängigkeit des Proteins gewählt. Die Zellernte erfolgte bei 4 °*C* und 5.000 – 20.000 × g für 5 – 45 min. Sofern die Zellen nicht sofort verwendet wurden, wurden sie bei –20 °*C* bzw. – 80 °*C* gelagert. Tabelle 4.10 gibt einen Überblick über die Expressionsbedingungen der einzelnen Proteine.

Protein	Temperatur der Hauptkultur	Induktionszeit
NHA-hAgo2	37 °C	2 h
hAgo2-His	37 °C	2 h
His-hAgo2	37 °C	1 – 4 h
GST-hAgo2-His	17 – 37 °C	1 – 6 h
GST-hAgo2	17 – 37 °C	1 – 6 h
TRBP	37 °C	1 – 4 h

Tabelle 4.10: Versuchsbedingungen für die Expression verschiedener Proteine.

4.3.7 Fraktionierung von bakteriellem *E. coli* Extrakt

Um die Expression von bakteriell exprimiertem rekombinantem Protein zu überprüfen und zu untersuchen, ob dies in löslicher oder unlöslicher Form in den *E. coli* Zellen vorlag, wurde ein Extrakt von Zellen vor und nach Induktion hergestellt. Die Untersuchung von Proben verschiedener Zeitpunkte nach Induktion erlaubte weiterhin die Analyse der Expressionsstärke sowie die Verteilung von löslichem und unlöslichem Protein in Abhängigkeit der Induktionszeit.

Es wurden *E. coli* Zellen, in denen zuvor die Expression von rekombinantem Protein induziert worden war (siehe Abschnitt 4.3.6) im jeweiligen Lysispuffer (siehe Abschnitt 4.3.8) resuspendiert und auf eine Konzentration von 0,05 OD_{600} pro 10 µl eingestellt. Die Suspension wurde sonifiziert und das Gesamtzelllysat für 15 min bei 4 °C und 20.000 × g zentrifugiert. Der die löslichen Proteine enthaltende Überstand wurde für die spätere Analyse verwahrt, der Niederschlag in 200 µl 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen, für 5 min bei 4 °C und 20.000 × g zentrifugiert und im adäquaten Volumen 1 % (w/v) SDS unter Erwärmen auf 55 °C gelöst. Die im Gesamtzelllysat sowie der löslichen und unlöslichen Fraktion enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch separiert (siehe Abschnitt 4.3.3) und durch Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 4.3.4) oder Western-Analyse (siehe Abschnitt 4.3.5) untersucht.

4.3.8 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Es war ein zentrales Ziel dieser Arbeit, ein leistungsfähiges und reproduzierbares Reinigungssystem für rekombinantes hAgo2 zu entwickeln, mit dem im Milligramm-Maßstab und mit zufriedenstellender Reinheit Protein für biochemische Studien gewonnen werden konnte. Für diesen Zweck wurde hAgo2 mit fünf verschiedenen Markierungen verwendet, die je nach Eigenschaft unterschiedliche Reinigungsstrategien erlaubten. Die Entwicklung der einzelnen Protokolle ist unter Abschnitt 5.4 beschrieben. An dieser Stelle sind die Protokolle aufgeführt, die sich für das jeweilige Konstrukt als am leistungsfähigsten unter den angegebenen Gesichtspunkten erwiesen haben. Soweit möglich, erfolgten alle Arbeitsschritte zur Schonung der Proteine auf Eis oder bei 4 °C.

Präparation von NHA-hAgo2, hAgo2-His und His-hAgo2 aus *inclusion bodies*

Puffer	Komponente	
Lysispuffer (1 ×)	50 mM	Tris (pH 7,5)
	1 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT
Detergenzpuffer (3 ×)	6 % (v/v)	Triton-X-100
	1,5 M	NaCl
	60 mM	EDTA
Waschpuffer (1 ×)	50 mM	Tris (pH 7,5)
	1 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
Solubilisierungspuffer (1 ×)	100 mM	CAPS (pH 12,0)
	2 M	Harnstoff
	500 mM	L-Arg
Rückfaltungspuffer (1 ×)	100 mM	Tris (pH 7,5)
	500 mM	L-Arg

Tabelle 4.11: Pufferzusammensetzung für die Präparation von hAgo2 aus *inclusion bodies*.

Für die **Zelllyse** wurden *E. coli* Zellen, in denen zuvor die Expression des jeweiligen rekombinanten Proteins induziert worden war (siehe Abschnitt 4.3.6), in 100 ml kaltem Lysispuffer pro Ernte aus 2 l Kulturvolumen durch Rühren bei 4 °*C* resuspendiert. Der Suspension wurde 100 µg/ml Lysozym zugesetzt und für 15 min rührend bei 4 °*C* inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 15 × 20 s mit Ultraschall bei 70 % Power und 100 % Cycle behandelt, gefolgt von 20 s Inkubation auf Eis.

Zum **Abbau von DNA** wurde die Suspension auf 3 mM $MgCl_2$ eingestellt, mit 10 µg/ml DNaseI versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. **Zellwandbestandteile** wurden durch Zugabe eines halben Volumens Detergenzpuffer und Inkubation für 30 min bei 4 °*C* solubilisiert.

Die folgende Zentrifugation für 30 min bei 4 °*C* und 18.000 × g trennte die unlöslichen Einschlusskörperchen und verbliebenen Zelltrümmer von löslichen Komponenten. Das Sediment wurde 2 × mit 100 ml und 1 × mit 30 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend die in den Einschlusskörperchen enthaltenen **Proteine** durch Resuspension in 20 ml semidenaturierendem Solubilisierungspuffer **in Lösung** gebracht. Die unlöslichen Bestandteile wurden für 20 min bei 4 °*C* und 20.000 × g abzentrifugiert.

Die **Rückfaltung** von hAgo2 erfolgte durch das Entfernen von Harnstoff und Einstellen eines physiologischen pH-Wertes durch Dialyse gegen 2×200 ml Rückfaltungspuffer. Der während der Rückfaltung präzipitierte Anteil an Protein wurde mittels Zentrifugation für 20 min bei $4\,°C$ und $20.000 \times$ g abgetrennt.

Die einzelnen Präparationsschritte wurden mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.3) und Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 4.3.4) oder Western-Analyse (siehe Abschnitt 4.3.5) untersucht. Die enzymatische Aktivität von hAgo2 wurde durch die siRNA-vermittelte Spaltung von *target* RNA (siehe Abschnitt 4.4.1) bestätigt und somit die Rückfaltung als erfolgreich betrachtet.

Reinigung von GST-hAgo2-His und GST-hAgo2 unter nicht-denaturierenden Bedingungen im analytischen Maßstab

Puffer	Komponente	
Lysispuffer ($1 \times$)	50 mM	Tris (pH 7,4)
	1 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
	10 mM	DTT
Bindungspuffer ($1 \times$)	50 mM	Tris (pH 7,4)
	1 mM	EDTA
	10 mM	DTT
Elutionspuffer ($1 \times$)	50 mM	Tris (pH 8,0)
	$1\times$	Glutathionlösung (reduziert)

Tabelle 4.12: Pufferzusammensetzung für die Reinigung von GST-hAgo2-His bzw. GST-hAgo2 unter nicht-denaturierenden Bedingungen.

E. coli Zellen, in denen zuvor die Expression von GST-hAgo2-His oder GST-hAgo2 induziert worden war (siehe Abschnitt 4.3.6), wurden in 30 ml kaltem Lysispuffer pro Gramm resuspendiert. Die **Zelllyse** erfolgte durch 2×1 min Ultraschallbehandlung mit 30 % Power und 60 % Cycle, gefolgt von 1 min Inkubation auf Eis. Die folgende Zentrifugation für 20 min bei $4\,°C$ und $11.000 \times$ g diente der Abtrennung von unlöslichen Zelltrümmern von den gelösten Proteinen.

Die molekularbiologisch eingeführte GST-Markierung am N-Terminus des Zielproteins erlaubte einen **affinitätschromatographischen** Reinigungsansatz. Die Proteinlösung wurde bei $4\,°C$ für mindestens 16 h mit in Bindungspuffer äquilibrierter Glutathion Sepharose 4B unter ständiger Bewegung inkubiert, wobei pro 30 ml Proteinlösung 500 μl Matrix verwendet

wurden. Die derart mit Protein beladene Matrix wurde in die Säule Econo-Column 737-4021 geladen und 3 × mit je 5 Säulenvolumina Bindungspuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Für die Elution des Zielproteins wurde die Matrix für 10 min mit 1 Säulenvolumen Elutionspuffer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Elutionsfraktionen gesammelt.

Die einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.3) und Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 4.3.4) überprüft und die Zielprotein enthaltenden Elutionsfraktionen vereinigt.

Reinigung von GST-hAgo2 unter nicht-denaturierenden Bedingungen im präparativen Maßstab

Es wurden für die Reinigung im präparativen Maßstab die gleichen Puffer wie bei derjenigen im analytischen Maßstab verwendet (siehe Tabelle 4.12), sie sind deshalb nicht erneut aufgeführt. Der **Zellaufschluss** bei beiden Reinigungen erfolgte analog mit folgenden Abweichungen:

Für den präparativen Maßstab wurden *E. coli* Zellen in 5 ml kaltem Lysispuffer pro Gramm resuspendiert. Die Bedingungen für die Ultraschallbehandlung wurden auf 5 × 1 min mit 80 % Power und 60 % Cycle, gefolgt von 1 min Inkubation auf Eis, verändert. Die Isolierung gelöster Proteine erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 30.000 × g.

Für die **affinitätschromatographische Reinigung** wurde der Überstand mit einer Peristaltik-Pumpe (Flussrate 0,1 ml/min) auf die 5 ml Glutathion Sepharose High Performance enthaltende Säule XK 16/20 gepumpt. Die Säule war zuvor mit Bindungspuffer äquilibriert worden. Die Beladung erfolgte in einem geschlossenen Kreislauf für mindestens 16 h, so dass die Proteinlösung das Säulenbett mehrfach passieren konnte. Der Durchfluss wurde bei 4 °C für eine spätere Verwendung verwahrt. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Säule mit mindestens 10 Säulenvolumina Bindungspuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Zielproteine wurden durch die Verwendung eines Elutionspuffers, der reduziertes Glutathion enthielt, bei einer Flussrate von 0,1 ml/min von der Säulenmatrix eluiert und in Fraktionen von 500 μl gesammelt. Anhand eines aufgezeichneten Chromatogramms der Absorption bei 280 nm wurden proteinhaltige Fraktionen für eine SDS-PAGE-Analyse ausgewählt (siehe Abschnitt 4.3.3), nach Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 4.3.4) die Konzentration abgeschätzt sowie die Reinheit beurteilt und die gewünschten Fraktionen vereinigt.

Die Säule wurde durch Waschen mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min regeneriert und erneut wie beschrieben mit dem Durchfluss der ersten Reinigung beladen, gewaschen und eluiert. Die **wiederholte Beladung und Elution** führte zu massiv gesteigerten Ausbeuten und wurde insgesamt bis zu sechs Mal durchgeführt.

Reinigung von hTRBP-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen im präparativen Maßstab

Puffer	Komponente	
Lysispuffer (1 ×)	20 mM	Tris (pH 7,5)
	50 mM	NaCl
	1 mM	PMSF
	5 mM	β-Mercaptoethanol
	5 mM	Imidazol
Waschpuffer (1 ×)	20 mM	Tris (pH 7,5)
	50 mM	NaCl
	1 mM	PMSF
	5 mM	Imidazol
Elutionspuffer (1 ×)	20 mM	Tris (pH 7,5)
	200 mM	Imidazol
	50 mM	NaCl
Lagerpuffer (1 ×)	20 mM	Tris (pH 7,5)
	50 mM	NaCl
	10 % (v/v)	Glyzerin
	1 mM	EDTA

Tabelle 4.13: Pufferzusammensetzung für die Reinigung von hTRBP-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen.

E. coli Zellen, in denen zuvor die Expression von hTRBP-His induziert worden war (siehe Abschnitt 4.3.6), wurden in 30 ml kaltem Lysispuffer pro Gramm resuspendiert. Für die **Zelllyse** wurde die Suspension 5 × 20 s mit Ultraschall behandelt (70 % Power und 100 % Cycle, gefolgt von 30 s Inkubation auf Eis), auf 100 μg/ml mit Lysozym eingestellt, für 15 min bei 4 °C rührend inkubiert und erneut 10 × 20 s einer Ultraschallbehandlung unterzogen (70 % Power und 100 % Cycle, gefolgt von 30 s Inkubation auf Eis). Per Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 18.000 × g wurden unlösliche Zelltrümmer sedimentiert.

Für die **Reinigung mittels Affinitätschromatographie** wurde die Proteinlösung mit einer Peristaltik-Pumpe (Flussrate 1 ml/min) auf die mit 10 ml TALON Superflow gefüllte und mit Waschpuffer äquilibrierte Säule XK 16/20 gepumpt. Die Beladung erfolgte in einem geschlossenen Kreislauf für mindestens 16 h, so dass die Proteinlösung das Säulenbett mehrfach passieren konnte. Danach wurde die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumina Waschpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 5 auf 200 mM Imidazol in 50 min, gefolgt von 30 min Elution mit konstanten 200 mM Imi-

dazol (Flussrate 1 ml/min). Es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt, die mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.3) und Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 4.3.4) analysiert wurden. Die **Umpufferung** von TRBP-His erfolgte durch Dialyse gegen 2×1 l Lagerpuffer.

4.3.9 Konzentrierung von Proteinen in Lösung

Vakuum-Dialyse

Bei der Vakuum-Dialyse wurde die zu konzentrierende Proteinlösung in eine Membranhülse mit adäquater Porengröße gefüllt und diese in Kontakt zum gewünschten Puffer gebracht. An das System wurde ein Unterdruck angelegt und dadurch das Lösungsmittel der Proteinlösung in den Puffer gesaugt. Das Volumen der Proteinlösung wurde somit eingeengt und es konnte bei Bedarf gleichzeitig ein Pufferaustausch vorgenommen werden.

Ultrafiltration

Für diese Konzentrierungsvariante wurden je nach Volumen Amicon Ultra-15 oder Centricon Ultrafiltrationseinheiten verwendet. Die Porengröße richtete sich dabei nach dem Molekulargewicht des zu konzentrierenden Proteins. Die Filtration wurde im Zentrifugalfeld mit $5.000 \times$ g bei $4\,°C$ durchgeführt, bis das gewünschte Retentionsvolumen erreicht war.

Für die gleichzeitige Umpufferung von Proteinlösungen konnte das Retentat mit dem gewünschten Puffer verdünnt, konzentriert und erneut verdünnt werden, bis ein ausreichender Austausch von Pufferkomponenten stattgefunden hatte (Diafiltration).

4.3.10 Untersuchung auf RNase-Kontamination

Da die mit RNA durchgeführten Arbeiten Bedingungen erforderten, unter denen möglichst geringe Degradation stattfindet, wurden die einzelnen Proteinpräparationen auf die Aktivität von RNasen untersucht. Hierzu wurden eine radioaktiv markierte RNA (siehe Abschnitt 4.2.6) mit der jeweiligen Proteinlösung für $1-2$ h bei $37\,°C$ inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe eines Sequenziergels (siehe Abschnitt 4.1.3) aufgetrennt und über Autoradiographie (siehe Abschnitt 4.1.4) detektiert. Das Ausmaß der Degradation wurde mit Hilfe des Programms Image Quant 5.2 bestimmt.

4.4 Techniken zur biochemischen Charakterisierung von rekombinanten Proteinen

Bei den hier genannten Konzentrationen handelt es sich – soweit nicht anders vermerkt – um die finalen Konzentrationen der jeweiligen Komponenten. Dies spielt vor allem bei solchen Reaktionen eine Rolle, bei denen eine Mischung und dadurch eine Verdünnung von zwei

Ansätzen zum Reaktionsstart erfolgte. Die Experimente wurden in auf das jeweilige Protein abgestimmten Puffern durchgeführt, die zuvor durch einen Filter mit 0,2 μm Porengröße filtriert und entweder im Ultraschallbad oder durch Anlegen eines Vakuums für etwa 15 min entgast worden waren (siehe Tabelle 4.14).

Protein	Puffer
hAgo2	Ago2-Bindungspuffer (1 ×)
	Ago2-Spaltungspuffer (1 ×)
hTRBP	TRBP-Puffer (1 ×)

Tabelle 4.14: Funktionell untersuchte Proteine mit zugehörigen Puffern.

4.4.1 siRNA-vermittelte Spaltung von *target* RNA

Standard-Spaltungsassay

Die siRNA-vermittelte Spaltung von *target* RNA (Spaltungsassay) diente dem Nachweis der enzymatischen Aktivität von hAgo2 (siehe Abschnitt 5.5.2). Dabei wurden die minimal benötigten Komponenten des RISC (hAgo2, *guide* RNA und *target* RNA) miteinander inkubiert und die sequenzspezifische Spaltung der *target* RNA als Maß für die Aktivität von hAgo2 herangezogen. Als Substrat diente das 140 nt lange, am 5'-Ende radioaktiv markierte ICAM-1-IVT, das die Erkennungssequenz für si2B trägt, also von Position 79 – 97 perfekt komplementär zum *guide* Strang as2B ist oder die zum *guide* Strang komplementäre 21 nt lange RNA s2B mit radioaktiver 5'-Endmarkierung (siehe Abschnitte 3.8.3, 4.2.3 und 4.2.6). Als Negativkontrolle wurde der *guide* Strang der siLam, einer gegen Lamin A/C gerichteten siRNA, verwendet bzw. die Reaktion ohne *guide* Strang durchgeführt. Die entsprechende *guide* RNA wurde zuvor am 5'-Ende phosphoryliert (siehe Abschnitt 4.2.6).

In einem Standardansatz wurden 100 nM *guide* RNA und 2,5 nM *target* RNA mit verschiedenen Konzentrationen hAgo2, die sich aus den Proteinpräparationen ergaben, bei 37 °C bis zu 2 h inkubiert. Das Experiment wurde in 1 × Ago2-Spaltungspuffer in Anwesenheit von 1 u/μl RiboLock^{TM} RNase Inhibitor zur Inhibition kompetierender RNasen durchgeführt. Die Reaktion wurde zu angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von 1 Volumen Ladepuffer für denaturierende PAA-Gele sowie Einfrieren in flüssigem N_2 gestoppt. Nach Denaturierung für 3 min bei 95 °C folgte die Auftrennung der Ansätze mit Hilfe von denaturierenden Sequenziergelen (siehe Abschnitt 4.1.3) unter Zuhilfenahme eines radioaktiven Größenmarkers (siehe Abschnitt 4.2.7) und die Visualisierung mittels Autoradiographie (siehe Abschnitt 4.1.4). Die Quantifizierung der Banden wurde mit dem Programm Image Quant 5.2 durchgeführt und der Umsatz der *target* RNA wie folgt berechnet:

$$Umsatz\ (\%) = \frac{I_{\mathrm{SP}}}{I_{\mathrm{SP}} + I_{\mathrm{t}}} \cdot 100 \tag{4.6}$$

mit I_{SP} = Intensität der Spaltproduktbande und I_{t} = Intensität der Bande ungespaltener *target* RNA.

Modifizierte Spaltungsassays

Neben den fluoreszenzbasierten Techniken stellten Spaltungsassays das wichtigste Instrument für die Charakterisierung von hAgo2 in dieser Arbeit dar. Ausgehend vom Standard-Spaltungsassay wurden für die Beantwortung bestimmter Fragestellungen die experimentellen Bedingungen angepasst. Die Entwicklung dieser Experimente ist in Abschnitt 5.9 beschrieben.

Für die Untersuchung von Substratspezifität und Kinetik der Spaltungsreaktion wurden verschiedene Nukleinsäuren (einzelsträngige *guide* RNA, doppelsträngige siRNA, verschiedenfach modifizierte 5'-Enden) für unterschiedlich lange Zeit eingesetzt und die Auswirkungen beobachtet. Weiterhin wurde die Spaltungsreaktion bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt und der Einfluss verschiedener Mg^{2+}-Konzentrationen auf die Aktivität untersucht. In weiteren Experimenten wurden dem minimalen Spaltungsansatz rekombinante dsRNA-bindende Proteine (hTRBP-His, hPACT-His) zugegeben, um ihren Einfluss auf die Spaltungsreaktion zu untersuchen. Für die Untersuchung der Spaltungsaktivität eines präassemblierten ternären Komplexes wurde zuvor eine Inkubation in 1 × Ago2-Bindungspuffer durchgeführt und die Spaltungsreaktion durch Zugabe von Mg^{2+} gestartet.

4.4.2 Ermittlung von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten

Eine Dissoziationskonstante (K_{d}) dient der Beschreibung einer Gleichgewichtsreaktion, die von der Assoziation und Dissoziation zweier Bindungspartner abhängig ist. Je höher K_{d} ist, umso weiter liegt das Gleichgewicht der Reaktion beim dissoziierten Zustand. K_{d} stellt also ein Maß für die Affinität eines Proteins zu seinem Bindungspartner dar. Bei Gleichgewichtsreaktionen in Lösung ist K_{d} im thermodynamischen Sinn ausschließlich von der Temperatur abhängig, weshalb bei allen Experimenten zur Ermittlung von Dissoziationskonstanten die Ansätze konstant temperiert wurden.

Gleichgewichts-Fluoreszenzspektroskopie

Eine Bindungsreaktion zwischen zwei Partnern kann anhand der Änderung eines Fluoreszenzsignals analysiert werden. Ein Bindungspartner muss dabei die Fähigkeit zur Fluoreszenz besitzen (z. B. fluorophorgekoppelte *guide* RNA oder siRNA, siehe Abschnitt 3.8.2). Die Konzentration des fluoreszierenden Bindungspartners bleibt beim Experiment konstant, während der andere Partner hinzu titriert wird. Gleichzeitig erfolgt die Anregung der Fluoreszenz.

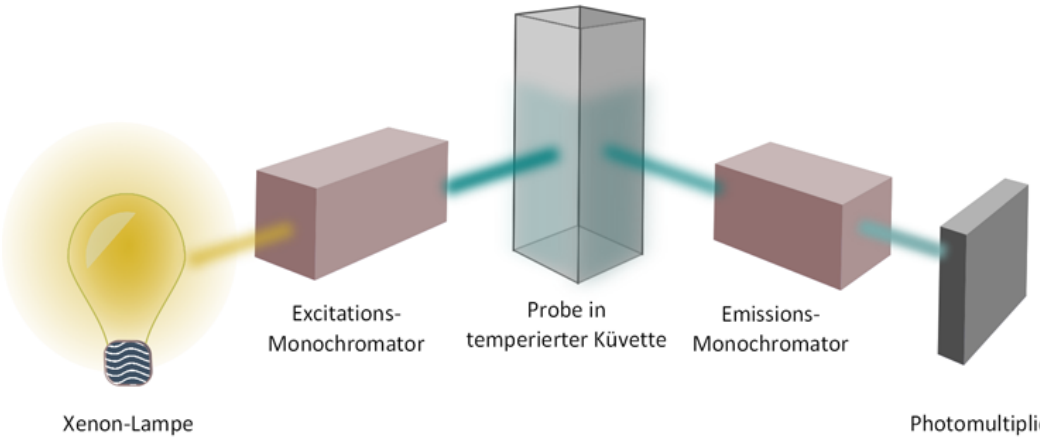


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers. Das Anregungslicht wird von einer Xenon-Lampe ausgestrahlt und durch den Excitationsmonochromator Licht der Wellenlänge 492 nm herausgefiltert. Dieses Licht trifft auf die auf 25 °C temperierte Protein-Nukleinsäure-Lösung in der Küvette, wo FAM zur Fluoreszenz angeregt wird. Das emittierte Licht trifft auf einen im rechten Winkel angeordneten zweiten Monochromator, der Licht der Wellenlänge 516 nm passieren lässt. Als Detektor dient ein Photomultiplier, der das Signal an einen angeschlossenen PC weiterleitet.

Im Falle der Bildung eines binären Komplexes aus hAgo2 und siRNA bzw. aus hTRBP und siRNA wurde eine FAM-gekoppelte Nukleinsäure vorgelegt und das Protein hinzu titriert. Bei Bindung beider Partner kommt es zur Abnahme des Fluoreszenzsignals. Für die Untersuchung der Bildung eines ternären Komplexes aus hAgo2, *guide* RNA und *target* RNA wurde ein *molecular beacon* verwendet. Dabei wurde in Ago2-Bindungspuffer eine Präinkubation von *guide* RNA und hAgo2 durchgeführt, so dass es zur Bildung eines binären Komplexes kam. Hierzu wurde die mit dem Fluoreszenzlöscher BHQ1 gekoppelte komplementäre *target* RNA s2B-BHQ titriert. Bei Bindung der *target* RNA an den binären Komplex kam es zur Löschung des von FAM emittierten Lichts und dadurch zu einem Signalabfall. Analog wurde die Hybridisierung von as2B-FAM und s2B-BHQ in Abwesenheit von hAgo2 untersucht.

Die Bestrahlung des Fluorophors mit Licht einer geeigneten Anregungswellenlänge sowie die Detektion des Fluoreszenzsignals wurden mit dem FluoroMax®-3 Fluoreszenzspektrometer vorgenommen (siehe Abbildung 4.1). In einer Fluoreszenzküvette mit 400 µl oder 700 µl Fassungsvermögen wurde die zu bindende Nukleinsäure im entsprechenden Reaktionspuffer (siehe Tabelle 4.14) vorgelegt und der Bindungspartner schrittweise zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde bis zum Erreichen eines stabilen Signals gewartet und der gemittelte Messwert dokumentiert. Konzentrationen und Fluoreszenz wurden bezüglich der zunehmenden Verdünnung korrigiert. Durch Temperierung des Küvettenhalters auf 25 °C wurden Temperaturschwankungen vermieden.

Die Daten wurden mit dem Programm DataMax 2.20 erfasst und mittels GraFit 5.0.6 mathematisch ausgewertet. Dazu wurde eine quadratische Gleichung an die experimentellen

Daten angepasst, aus der sich die jeweilige Dissoziationskonstante ergab (siehe Anhang A.1.1).

Filterbindungsexperiment

Alternativ zur Ermittlung von K_ds durch Gleichgewichts-Fluoreszenzspektroskopie wurde eine Methode gewählt, die auf der nicht-kovalenten Bindung von Proteinen an Nitrocellulose-Membranen basiert. Wenn man Protein-Nukleinsäure-Gemische auf die Membran gibt, so wird Nukleinsäure, welche mit den Proteinen komplexiert ist, indirekt auf der Membran fixiert und kann nach Entfernung ungebundener Nukleinsäure quantifiziert werden.

Hierfür wurden steigende Konzentrationen an GST-hAgo2 oder NHA-hAgo2 mit einer konstanten Menge radioaktiv markierter Nukleinsäure (siehe Abschnitt 4.2.6) für 90 min bei 4 $°C$ in Ago2-Spaltungspuffer (im Fall von NHA-hAgo2: ohne KCl) inkubiert und anschließend 10 μl des Ansatzes auf einen im äquivalenten Puffer äquilibrierten Nitrocellulosefilter aufgetragen. Der Filter wurde mit 2 ml Puffer gewaschen, für 1 h bei 60 $°C$ getrocknet, in ein 5 ml Szintillationsgefäß überführt und mit 3 ml Szintillationslösung überschichtet. Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte mittels Flüssigszintillationsmessung für 1 min.

Zur Ermittlung der Nukleinsäuremenge, die ohne Anwesenheit von Protein am Filter haftet, wurde ein Ansatz ohne Protein wie beschrieben mitgeführt. Für die Messung des maximalen Signals wurde ein gleicher Ansatz auf einen Filter gegeben, jedoch nicht mit Puffer gewaschen. Die Filterbindungsexperimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Für die Bestimmung von Dissoziationskonstanten wurde der gebundene Anteil an Nukleinsäure unter Berücksichtigung des Hintergrunds zum maximalen Signal ins Verhältnis gesetzt und gegen die jeweilige Proteinkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraFit 5.0.6 analog zu den mittels Gleichgewichts-Fluoreszenzspektroskopie gewonnenen Daten.

4.4.3 Charakterisierung von Nukleinsäurebindungsreaktionen mittels transienter Fluoreszenzmessungen

Die Messung von Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Bindungsreaktion von Nukleinsäuren an Proteine bei der Bildung eines binären Komplexes bzw. der Bindungsreaktion einer *target* RNA an einen hAgo2/*guide* RNA-Komplex zur Entstehung eines ternären Komplexes erfolgte vor der Einstellung des Reaktionsgleichgewichts. Mit Hilfe der *stopped flow* Anlage SX20 (siehe Abbildung 4.2) wurden beide Bindungspartner sehr schnell miteinander gemischt und die resultierende Komplexbildung beobachtet. Aus den experimentellen Daten wurden Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten mathematisch ermittelt. Für die Bestimmung von Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurde bei gleichzeitiger Verhinderung der Reassoziation der Zerfall des Komplexes verfolgt. Die zeitabhängige Fluoreszenzänderung wurde aufgezeichnet.

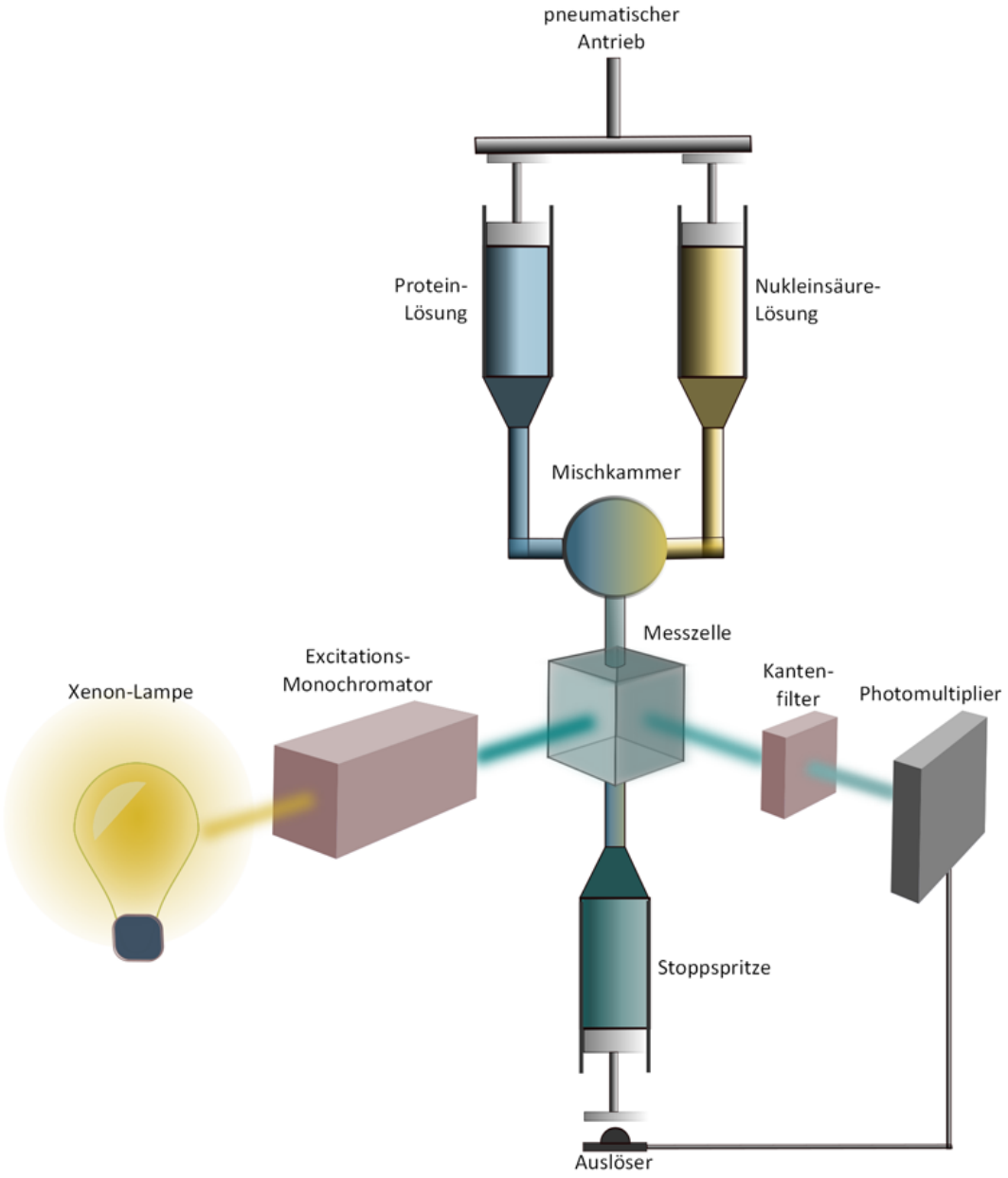


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau einer *stopped flow* Anlage. Die beiden Bindungspartner befinden sich getrennt voneinander in zwei Vorratsspritzen, deren Kolben zeitgleich pneumatisch mit einem Druck von 8 bar angetrieben werden. Die Lösungen gelangen in die Mischkammer, wo sie sich sehr schnell vermischen. Von dort fließt das Gemisch in die Messzelle. Am anderen Ende der Zelle befindet sich die Stoppspritze, in die der in der Messzelle befindliche Inhalt (ca. 50 μl) verdrängt wird und über ihren Kolben einen Schalter betätigt. Dadurch wird zum Einen der Fluss der Reaktionsmischung gestoppt und zum Anderen die Aufzeichnung der Fluoreszenzmessung gestartet. Die Dauer dieses Vorgangs wird als Totzeit bezeichnet und determiniert die Zeitauflösung des Geräts (ca. 2 ms). Das Reaktionsgemisch in der Messzelle wird vom Licht einer Xenon-Lampe bestrahlt, dass zuvor einen Monochromator passiert (Anregungswellenlänge 490 nm). Das emittierte Fluoreszenzlicht passiert einen Kantenfilter, der nur Strahlung mit Wellenlängen größer als 530 nm durchtreten lässt. Die Detektion erfolgt im rechten Winkel zur Anregung mit Hilfe eines Photomultipliers.

Es wurden die zu untersuchenden Bindungspartner im entsprechenden Volumen adäquatem Puffer (siehe Tabelle 4.14) auf das Doppelte der finalen Konzentration eingestellt. Für die Bestimmung von Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden eine Protein- bzw. Komplex- und eine Nukleinsäuresubstratlösung getrennt voneinander in zwei Vorratsspritzen vorgelegt und ihre Assoziation zeitaufgelöst beobachtet. Für die Bestimmung von Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurde der Komplex aus Protein und Nukleinsäuresubstrat durch eine mehrminütige Vorinkubation bei Raumtemperatur gebildet und seine Dissoziation zeitaufgelöst beobachtet, indem ein geeigneter Kompetitor in 7 – 100 × molarem Überschuss die Reassoziation verhinderte.

Die Messungen erfolgten in Mehrfachbestimmung; es wurden die Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Um den Einfluss des Puffers sowie das Ausbleichen des Fluorophors über einen längeren Messzeitraum zu berücksichtigen, wurde in einem Kontrollexperiment im Fall von hAgo2 der Einfluss des Lagerpuffer-Messpuffer-Gemischs, das der jeweiligen Proteinkonzentration entsprach, bzw. im Fall von hTRBP der Einfluss des reinen Messpuffers auf das Fluoreszenzsignal gemessen und die experimentell ermittelten Daten bezüglich dieses Hintergrundsignals korrigiert. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit den Programmen Pro-Data SX und Pro-Data Viewer, die Auswertung wurde mit GraFit 5.0.6 vorgenommen. Dabei wurde diejenige exponentielle Gleichung, die den Daten am besten entsprach, an die Messpunkte angepasst und die sich ergebenden Geschwindigkeitskonstanten errechnet. Diese wurden für eine bessere Übersichtlichkeit auf- oder abgerundet (für Werte größer 1: 1 Nachkommastelle; für Werte zwischen 0,1 und 1: 2 Nachkommastellen; für Werte kleiner 0,1: 4 Nachkommastellen).

4.4.4 Gelverzögerungs-Analysen

Diese Methode (auch *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) kann zwischen proteingebundenen und ungebundenen Nukleinsäuren in einem Elektrophoresegel unterscheiden, da Komplexe auf Grund ihrer Größe eine geringere Mobilität aufweisen und sie also verzögert werden. Sie diente der Untersuchung der Komplexbildung zwischen hTRBP-His und doppelsträngiger siRNA zum Nachweis der korrekten Faltung des Proteins nach seiner Reinigung sowie dem Nachweis der Komplexbildung zwischen hAgo2 und *guide* RNA.

Für die Bindungsreaktion von hTRBP-His und siRNA wurden in 15 μl Ansätzen 700 nM si2B-FAM mit steigenden Mengen (300 – 3300 nM) hTRBP-His gemischt und für 10 min bei 25 $°C$ inkubiert. Als Kontrolle diente as2B-FAM als Substrat bzw. die Kompetition eines Komplexes aus 700 nM si2B-FAM und 2700 nM hTRBP-His mit steigenden Mengen (100 – 6700 nM) si2B. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Hilfe von nicht-denaturierender PAGE (entweder 8 % konstant oder 4 – 20 % als Gradient, siehe Abschnitt 4.1.3). Die Visualisierung der Fluoreszenz erfolgte mit dem PhosphorImager Typhoon™ 8600. Für eine Abschätzung der Affinität wurden die Banden mittels Image Quant 5.2 quantifiziert und mit GraFit 5.0.6 aus-

gewertet; allerdings diente die ermittelte apparente Dissoziationskonstante nur als Richtwert.

Für die Überprüfung der Komplexbildung aus hAgo2 und *guide* RNA wurde in einem Volumen von 15 μl 5 nM radioaktiv markierte Nukleinsäure (siehe Abschnitt 4.2.6) mit 0 nM oder 2500 nM NHA-hAgo2 in Ago2-Spaltungspuffer ohne KCl gemischt und für 90 min bei 4 °C inkubiert. Die Ansätze wurden auf einem nicht-denaturierenden 8 % PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und per Autoradiographie detektiert (siehe Abschnitt 4.1.4).

4.4.5 Untersuchung von Protein-Oligomerisierungszuständen

Fraktionierung von Proteinlösungen durch Zentrifugation

Für die Separation unterschiedlich großer Proteinaggregate oder Multimere von kleineren Proteinpopulationen wurde die zu untersuchende Proteinlösung für 1 h bei 4 °C und 20.000 × g oder 150.000 × g zentrifugiert und die Überstände oder Sedimente analysiert. Dies erfolgte alternativ durch SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.3) mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 4.3.4), mittels analytischer Gelfiltration oder Dynamischer Lichtstreuung (siehe unten).

Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde zum Einen verwendet, um die Möglichkeit einer Reinigung von hAgo2 durch Größenausschlusschromatographie zu testen. Zum Anderen wurden Erkenntnisse über das Oligomerisierungsverhalten von hAgo2 und hTRBP gewonnen.

Es wurden eine HPLC-Anlage sowie die Superdex 200 HR10/30 Gelfiltrationssäule verwendet, die zunächst mit dem adäquaten Puffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min äquilibriert wurde. Es folgten die Injektion der zu trennenden Proteinlösung in das Laufmittel und die Dokumentation des Chromatogramms über einen Zeitraum von 50 min. Für den Nachweis von Proteinen wurden anhand des Chromatogramms Fraktionen gesammelt, bei Bedarf mit TCA gefällt (siehe Abschnitt 4.3.2) und mit SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.3) und anschließender Coomassie- oder Silbernitrat-Färbung (siehe Abschnitt 4.3.4) analysiert.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Wenn Licht in eine Lösung von Partikeln eingestrahlt wird, kommt es zu verschiedenen Wechselwirkungen. Neben der Absorption, bei der Photonen Teilchen anregen und ihre Abwesenheit nach Durchstrahlen einer Lösung registriert wird, kommt es auch zur Streuung von Licht. Hierbei werden keine Photonen absorbiert, jedoch ihre Richtung geändert. Man unterscheidet elastische (Rayleigh-) Streuung, bei der keine Energieübertragung zwischen dem Photon und seinem Streuzentrum auftritt, so dass das eingestrahlte Photon die gleiche Frequenz besitzt wie das abgelenkte, und inelastische (Raman-) Streuung. Hierbei kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Photon und Streuzentrum, bei dem ein oszillierendes Dipolmoment induziert

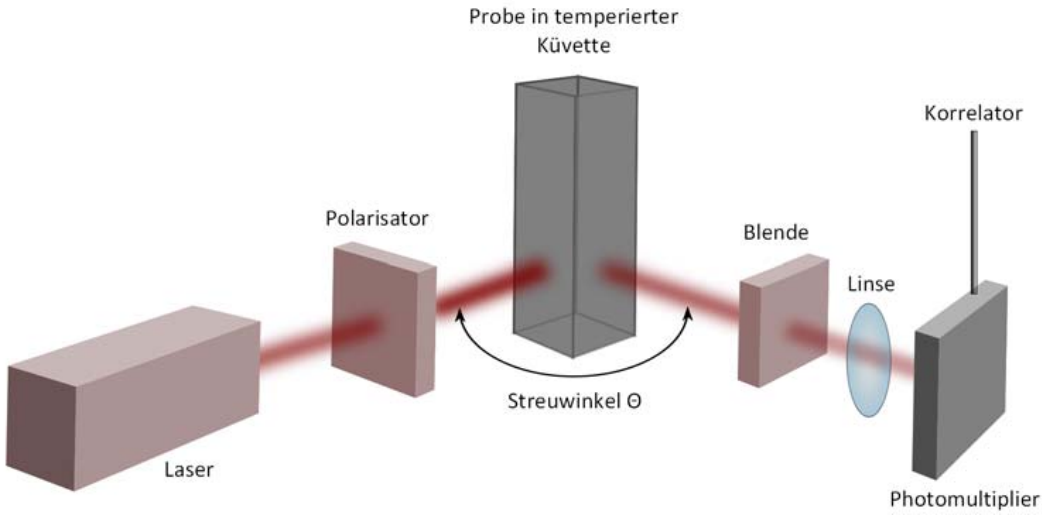


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau einer DLS-Apparatur. Der Laser strahlt Licht der Wellenlänge 830 nm aus, welches polarisiert wird und auf die temperierte Proteinlösung trifft. Die Photonen werden an den zahlreichen Streuzentren um den Winkel θ abgelenkt, passieren eine Blende und eine Linse, bevor sie über Glasfaserkabel vom Photomultiplier detektiert werden. Dieser zeichnet die zeitabhängigen Fluktuationen des Streulichtes auf. Der Korrelator berechnet die Autokorrelationsfunktion, auf deren Grundlage die Parameter der Proteinlösung bestimmt werden.

und somit eine elektromagnetische Welle erzeugt wird, die die Frequenz des abgelenkten Photons verändert.

Wenn eine Proteinlösung mit monochromatischem Licht bestrahlt wird, wird es an vielen Streuzentren gleichzeitig abgelenkt (Rayleigh-Streuung). Auf Grund der Brown' schen Molekularbewegung diffundieren die Proteine und es kommt zu einer Frequenzverschiebung (Doppler-Effekt), die bei langsamen Molekülen geringe, bei schnellen Molekülen starke Fluktuationen bewirken. Dieses Phänomen wird als Dynamische oder Quasielastische Lichtstreuung bezeichnet. Die Messung dieser Fluktuationen in Abhängigkeit der Zeit gibt Aufschluss über die Geschwindigkeit der sich bewegenden Proteine und dadurch über den Diffusionskoeffizienten. Hieraus lassen sich bei bekannter Viskosität des Lösungsmittels der hydrodynamische Radius und somit das Molekulargewicht eines Partikels berechnen (siehe Anhang A.1.3). Außerdem lässt sich eine Aussage über die Polydispersität einer Proteinlösung machen. Die Probe gilt für weniger als 20 % relative Standardabweichung als monodispers, von 20 – 30 % spricht man von mittlerer Dispersität und bei über 30 % von polydispers.

Die Dynamische Lichtstreuung wurde verwendet, um Oligomerisierungszustände von Proteinen zu untersuchen und Komplexe mit Nukleinsäuren zu charakterisieren. Es wurde das Gerät DynaPro MS/X verwendet (siehe Abbildung 4.3). Die Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte mit dem Programm DynaPro Dynamics 6.7.3.

Die Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, in einer 12 μl Quarz-Küvette bei einer Temperatur von 25 $°C$ in 20 s-Intervallen mit jeweils 15 Messungen. Die Viskosität des

verwendeten Lösungsmittels wurde mit einem Refraktometer bestimmt. Da Verunreinigungen oder Luftblasen zu massiven Fehlern in der Messung führen, wurden die Proben sorgfältig vorbereitet. Zur Abtrennung großer Aggregate wurden die Proteinlösungen vor dem Einfüllen in die Küvette für 10 min bei $3.000 \times$ g und $4\,°C$ in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, anschließend der Überstand mit staubfreien Pipettenspitzen überführt und die Küvette zum Entfernen von Luftblasen für 5 min bei 2.800 rpm in einer speziell für Küvetten vorgesehenen Zentrifuge zentrifugiert.

5 Ergebnisse

5.1 Vorarbeiten zu diesem Dissertationsprojekt

Grundlage für die im Rahmen dieser Dissertation geplanten Studien war ein bakterielles Expressionskonstrukt für rekombinantes NHA-hAgo2 (pET24(+)-NHA-hAgo2 im *E. coli* Stamm BL21(DE3)) sowie ein Protokoll zur Isolierung des Proteins aus *inclusion bodies* (Einschlusskörperchen) unter denaturierenden Bedingungen und seine anschließende Rückfaltung. Beides wurde freundlicherweise von C. Geist (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt. Nach Durchführung von Expression, Isolierung und Rückfaltung lag partiell gereinigtes, *in vitro* enzymatisch aktives Protein im Milligramm-Maßstab vor. Allerdings war der Reinheitsgrad des gewonnenen NHA-hAgo2 für die geplanten Studien nicht ausreichend hoch, da die Präparation eine große Anzahl kürzerer Proteinfragmente aufwies, die sehr wahrscheinlich auf translationale Abbrüche während der Expression zurückzuführen sind (siehe Abschnitte 5.3.1 und 5.3.3).

Somit wurden verschiedene Strategien zur Gewinnung einer ausreichend homogenen, enzymatisch aktiven und mengenmäßig zufriedenstellenden Proteinpräparation verfolgt. Trotz aufwändiger Bemühungen ist bislang in der wissenschaftlichen Literatur die Expression und Aufreinigung von bakteriell exprimiertem, rekombinantem hAgo2, das derartigen Ansprüchen gerecht wird, nicht beschrieben.

5.2 Strategien zur Gewinnung von rekombinantem hAgo2 für biochemische Studien

Für die Entwicklung neuer Strategien zur Gewinnung von rekombinantem hAgo2 mussten zwei wesentliche Faktoren berücksichtigt werden: die schlechte Löslichkeit des Proteins während der Expression sowie die unvollständige Translation, die neben dem vollständig translatierten Protein jeweils eine Vielzahl weiterer, kürzerer Produkte hervorbrachte.

Im ersten Fall war zwar ein Protokoll zur Isolierung von NHA-hAgo2 unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung etabliert, jedoch stellte dies keine ideale Voraussetzung für die im Rahmen des Dissertationsprojektes geplanten Studien dar. Zum Einen gibt es keine Möglichkeit festzustellen, wie effizient die Rückfaltung des mit 103,8 kDa relativ großen Proteins und somit wie groß der Anteil an inaktivem Enzym ist. Zum Anderen konnte

NHA-hAgo2 nur in Anwesenheit von 500 mM L-Arginin zur Rückfaltung gebracht werden. Verdünnung des Proteins und damit einhergehend des L-Arginins führte zur Präzipitation.

Im zweiten Fall waren im Vorfeld bereits Anstrengungen unternommen worden, um die Expressionsbedingungen zu optimieren. Diese beinhalteten die Variation der IPTG-Konzentration, Induktionszeit oder -temperatur oder die Expression des Konstruktes in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3)-Codon+RIL und Rosetta, die bezüglich der benötigten Codons eines eukaryonten Gens optimiert sind. Die Maßnahmen führten nicht zu einer verbesserten Translation. Deshalb wurde ein neues Expressionssystem entwickelt.

Es wurden teilweise parallel vier Strategien verfolgt, um die ausgeführten Probleme zu überwinden. Bei der ersten Strategie wurde ein hAgo2-Konstrukt verwendet, das am C-Terminus eine Poly-His-Markierung trägt und sich somit die Möglichkeit eröffnete, mittels affinitätschromatographischer Reinigung nur vollständig translatierte Proteine zu isolieren. Der dafür verwendete *E. coli* Stamm BL21(DE3)-pET41b(+)-hAgo2-His wurde freundlicherweise von Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt. Allerdings zeigte sich im Verlauf der Experimente, dass die Einführung der C-terminalen Markierung zu einer signifikanten Abnahme der enzymatischen Aktivität von hAgo2 führte. Zur Verfolgung der zweiten Strategie wurde die Herstellung eines Plasmids bei der Firma Qiagen in Auftrag gegeben, welches für hAgo2 kodiert und am N-Terminus eine Poly-His-Markierung anfügt. Für eine verbesserte Translation wurde die Sequenz bezüglich *codon usage* und GC-Gehalt optimiert, interne Poly-A-Stellen, Introns und *splicing* Stellen entfernt und sich wiederholende Sequenzabschnitte, Instabilitätselemente sowie zu Sekundärstrukturen der mRNA führende Bereiche vermindert. Bei der dritten und vierten Strategie wurden Konstrukte entworfen und kloniert, die beide zur Löslichkeitserhöhung am N-Terminus eine GST-Markierung trugen; bei Strategie drei wurde zusätzlich eine C-terminale Poly-His-Markierung angefügt, um vollständig translatiertes Protein isolieren zu können. Bei Strategie vier blieb der C-Terminus unmodifiziert. Bei Strategien drei und vier wurde durch den Ein-

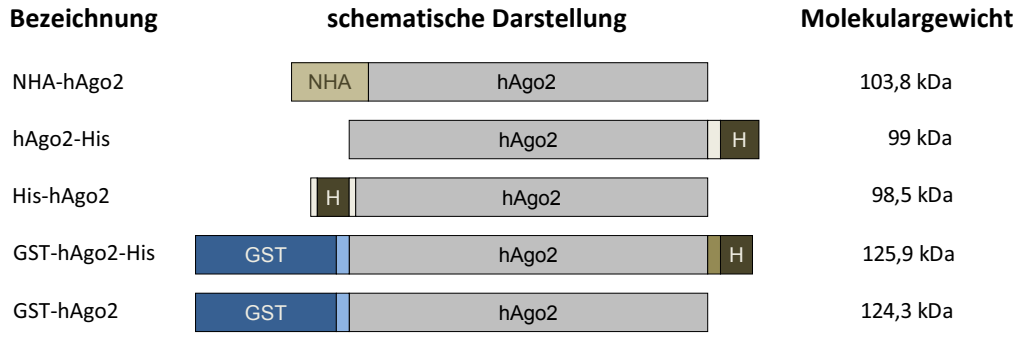


Abbildung 5.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten hAgo2-Fusionskonstrukte. Das jeweilige Molekulargewicht ist angegeben. Grau: Kodierender Bereich. Weiß: Linker-Region. Hellblau: TEV Protease-Schnittstelle. Ocker: Thrombin-Schnittstelle.

bau von Protease-Schnittstellen die Möglichkeit geschaffen, die Markierungen nach erfolgter Reinigung zu entfernen. Abbildung 5.1 gibt einen Überblick über die verwendeten hAgo2-Konstrukte.

5.3 Expression von rekombinantem hAgo2 und hTRBP [1]

5.3.1 Expression von NHA-hAgo2, hAgo2-His und His-hAgo2

Die Expression von NHA-hAgo2, hAgo2-His und His-hAgo2 wurde, wie unter Abschnitt 4.3.6 beschrieben, durchgeführt. Nach der Zellernte wurde der Expressionserfolg mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western-Analyse überprüft sowie weiterhin untersucht, ob das jeweilige Zielprotein in gelöster oder ungelöster Form vorlag.

Abbildungen 5.2 A, B und D zeigen die IPTG-abhängige Induktion der Expression aller drei Fusionsproteine, wobei die vollständig translatierten Proteine ein apparentes Molekulargewicht von über 95 kDa zeigen. Im Fall von hAgo2-His kommt es bereits vor Zugabe von IPTG zu einer geringen Expression (siehe Abbildung 5.2 B). Bei allen Proteinen liegt nur ein minimaler Teil in gelöster Form vor, während sich der überwiegende Anteil in der die ungelösten Proteine enthaltenden Fraktion des *E. coli* Extraktes befindet.

Die Identität von hAgo2 sowie die Integrität der Markierungen wurden durch Western-Analysen unter Verwendung von gegen hAgo2 oder HA bzw. Poly-His gerichteten Antikörpern nachgewiesen (siehe Abbildung 5.2 A, B, C, E).

Durch Verwendung von Antikörpern, die den N-terminalen Bereich der Fusionsproteine binden (siehe Abbildung 5.2 A, B, E) und damit auch Proteine detektieren, die C-terminal verkürzt sind, zeigt sich ein charakteristisches Bandenmuster mit zahlreichen Proteinen höherer elektrophoretischer Mobilität. Dieses tritt unabhängig davon auf, ob die Markierung oder hAgo2 selbst durch den Antikörper detektiert wird und weist darauf hin, dass die Translation nur zu einem mäßigen Anteil vollständig abläuft. Wenn hingegen ein gegen den C-terminalen Bereich gerichteter Antikörper verwendet wird (siehe Abbildung 5.2 C), zeigen sich neben einer prominenten Bande auf Höhe des vollständig translatierten hAgo2-His nur wenige weitere schwache Banden, die eventuell durch Protease-Abbau entstanden sind.

[1] Die in Abschnitt 5.3 beschriebenen Experimente wurden teilweise in Zusammenarbeit mit S. Weißbach und J. Blank im Rahmen der Betreuung ihrer Bachelorarbeiten sowie A. Roth im Rahmen der Betreuung ihres studentischen Praktikums durchgeführt.

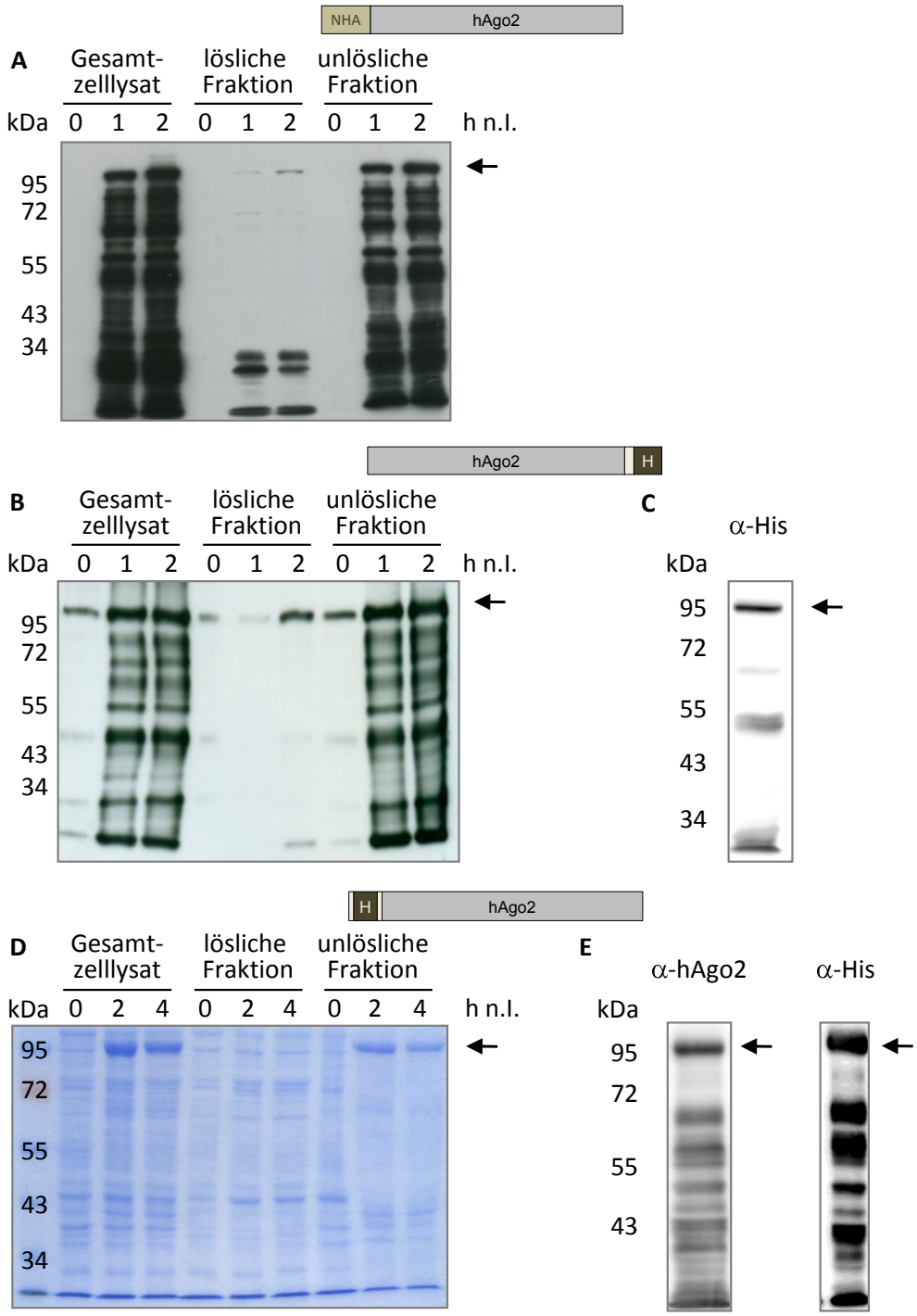


Abbildung 5.2: Expression verschiedener hAgo2-Fusionsproteine (siehe Abschnitt 4.3.6). Die Anzucht der *E. coli* Stämme BL21(DE3)-pET24a(+)-NHA-hAgo2, BL21(DE3)-pET41b(+)-hAgo2-His bzw. BL21(DE3)-pQE-T7-His-hAgo2 erfolgte in TFB-Medium bei 37°*C*. Die Proteinexpression wurde für 2 h (A, B, C) oder 4 h (D, E) induziert. *E. coli* Zellextrakte wurden auf die Anwesenheit der Zielproteine sowie ihre Verteilung auf die lösliche und unlösliche Fraktion untersucht. (A) Western-Analyse von NHA-hAgo2 mittels α-HA-Antikörper. (B, C) Western-Analysen von hAgo2-His mittels α-hAgo2- (B) bzw. α-His-Antikörper (C). (D) Detektion von His-hAgo2 durch Coomassie-Färbung. (E) Western-Analyse von His-hAgo2 mittels α-hAgo2- bzw. α-His-Antikörper. Die Banden vollständig translatierter Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. h n.I.: Stunden nach Induktion.

5.3.2 Klonierung von GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His

Zur Erhöhung der Löslichkeit wurden zwei weitere hAgo2-Fusionsproteine entworfen, die am N-Terminus beide mit einer Glutathion-S-Transferase (GST)-Markierung ausgestattet wurden. Zusätzlich trug ein Konstrukt am C-Terminus eine Poly-His-Markierung.

Als Grundlage für die Klonierungsstrategie diente das Plasmid pET41b(+), welches für die GST-Sequenz kodiert. Um die Markierungen später vom Protein abspalten zu können, wurden die Nukleotidsequenzen für eine TEV-Protease- bzw. Thrombin-Schnittstelle in das Plasmid integriert. Hierfür wurde pET41b(+) mit den Restriktionsenzymen SpeI und BlpI linearisiert, mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und mit einem zuvor hybridisierten DNA-Oligonukleotid ligiert, welches zu den generierten Enden des Plasmids kompatibel war. Zwischen den Sequenzen für die Protease-Schnittstellen wurde auf diesem Weg eine neue *multiple cloning site* sowie direkt hinter der Sequenz für die Thrombin-Schnittstelle eine Poly-His-Sequenz, gefolgt von einem Stopp-Codon, eingeführt (siehe Abbildung 5.3 A).

Das derart modifizierte Plasmid pET41b(+)_modifiziert wurde durch Elektroporation in den *E. coli* Stamm DH5α eingebracht, die Bakterienzellen kultiviert und das vervielfältigte Plasmid pET41b(+)_modifiziert isoliert. Es folgte eine weitere Linearisierung durch die Restriktionsenzyme AflII und AgeI sowie die Reinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Mit dem Plasmid pET41b(+)-hAgo2-His als Vorlage wurde die kodierende Sequenz für hAgo2 mit Hilfe von PCR amplifiziert sowie kompatible Enden generiert. In einem Fall wurde nach der kodierenden Sequenz ein Stopp-Codon eingeführt, um die Transkription der sich anschließenden Thrombin-Schnittstelle und Poly-His-Markierung zu verhindern. Beide

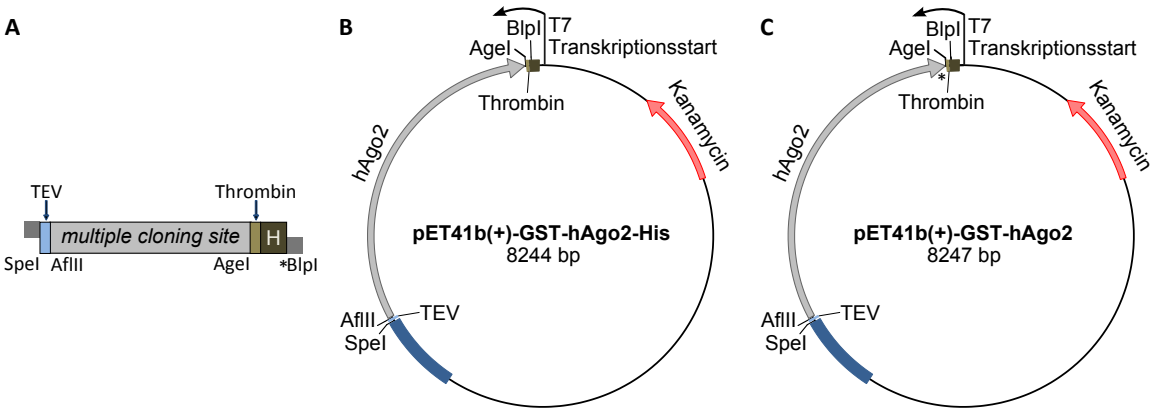


Abbildung 5.3: Vektorkarten der GST-hAgo2-Fusionskonstrukte. (A) Schematische Darstellung des DNA-Oligonukleotides zur Modifikation von pET41b(+). (B, C) Vektorkarten der Konstrukte für die Expression von GST-hAgo2-His und GST-hAgo2. Beide Plasmide beinhalten einen T7-Promotor, ein Kanamycinresistenzgen sowie die Sequenzen für die GST- und Poly-His-Markierungen und Protease-Schnittstellen. Ein zusätzlich eingeführtes Stopp-Codon (*) verhindert die Transkription von Thrombin-Schnittstelle und Poly-His-Markierung bei pET41b(+)-GST-hAgo2. H, dunkelbraun: Poly-His-Markierung. Dunkelblau: GST-Markierung.

Konstrukte wurden mit dem linearisierten pET41b(+)_modifiziert ligiert und die Plasmide pET41b(+)-GST-hAgo2-His und pET41b(+)-GST-hAgo2 (siehe Abbildung 5.3 B und C) wurden mittels Elektroporation in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) eingebracht. Nach Anzucht unter Kanamycin-Selektion folgte die Untersuchung von Kolonien mittels PCR sowie die Plasmid-Isolierung mit anschließender Restriktionsanalyse. Plasmide aus erfolgreich transformierten Kolonien wurden zum Ausschluss von Mutationen sequenziert und je ein Stamm für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

5.3.3 Studien zur Optimierung der Expression von GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His

Nachdem sichergestellt wurde, dass die beiden Stämme GST-hAgo2-His bzw. GST-hAgo2 exprimierten, wurden mit dem Ziel der Gewinnung einer größtmöglichen Menge an gelöstem Protein die Bedingungen für die Expression optimiert. Hierzu wurden die Temperatur während der Induktion, ihre Dauer sowie die Zusammensetzung des Bakterienkulturmediums variiert.

Zunächst wurden die Bakterienstämme in LB-Medium bei $37\,°C$ kultiviert und die Expression der Proteine für 6 h induziert. Eine zeitaufgelöste Analyse der fraktionierten Zellextrakte zeigte, dass bei beiden Stämmen nach 2 h der größtmögliche Anteil an gelöstem Protein vorlag; längere Induktionszeiten führten zu einer Verschiebung hin zu mehr ungelöstem Protein. Das Experiment wurde bei $17\,°C$ und $29\,°C$ wiederholt, wobei bei $17\,°C$ auch mit einer Ausdehnung der Induktionszeit auf 18 h keine Proteinexpression beobachtet werden konnte. Die bei $29\,°C$ kultivierten Bakterien exprimierten zwar nach 2 h einen vergleichbaren Anteil an Protein wie bei $37\,°C$, allerdings lag ein geringerer Anteil in gelöster Form vor. Um den Einfluss des Kulturmediums auf Bakterienwachstum und Proteinexpression zu untersuchen, wurden beide Stämme in dem nährstoffreicheren und gepufferten TFB-Medium kultiviert. Das Medium hatte auf die Proteinmenge pro Bakterienzelle keinen Einfluss, allerdings wurde das Zellwachstum nach IPTG-Zugabe im Vergleich zur Anzucht in LB-Medium verstärkt, was also insgesamt zu einer höheren Proteinausbeute führte. Somit wurden als optimale Bedingungen für die Expression von GST-hAgo2-His und GST-hAgo2 die Bakterienstämme in TFB-Medium kultiviert und die Proteinexpression bei $37\,°C$ für 2 h induziert (siehe Abbildung 5.4).

Die Identität von hAgo2 sowie die Integrität der Markierungen wurden durch Western-Analysen unter Verwendung von adäquaten Antikörpern und Größenmarkern nachgewiesen (siehe Abbildung 5.4 B, D). Gleichzeitig zeigte sich, dass durch das Anfügen der GST-Markierung zwar die Löslichkeit von hAgo2 erhöht, jedoch die Translationseffizienz nicht verbessert werden konnte. Eine Erniedrigung der Induktionstemperatur auf $17\,°C$ führte ebenfalls zu keiner Verbesserung der Translationseffizienz. Wie bereits unter Abschnitt 5.3.1 beschrieben, weist die Detektion von vollständig translatierten Proteinen allein im Vergleich zur zusätzlichen Detektion C-terminal verkürzter Varianten (siehe Abbildung 5.4 D) auf eine hohe Anzahl unvollständig translatierter Versionen von hAgo2 hin.

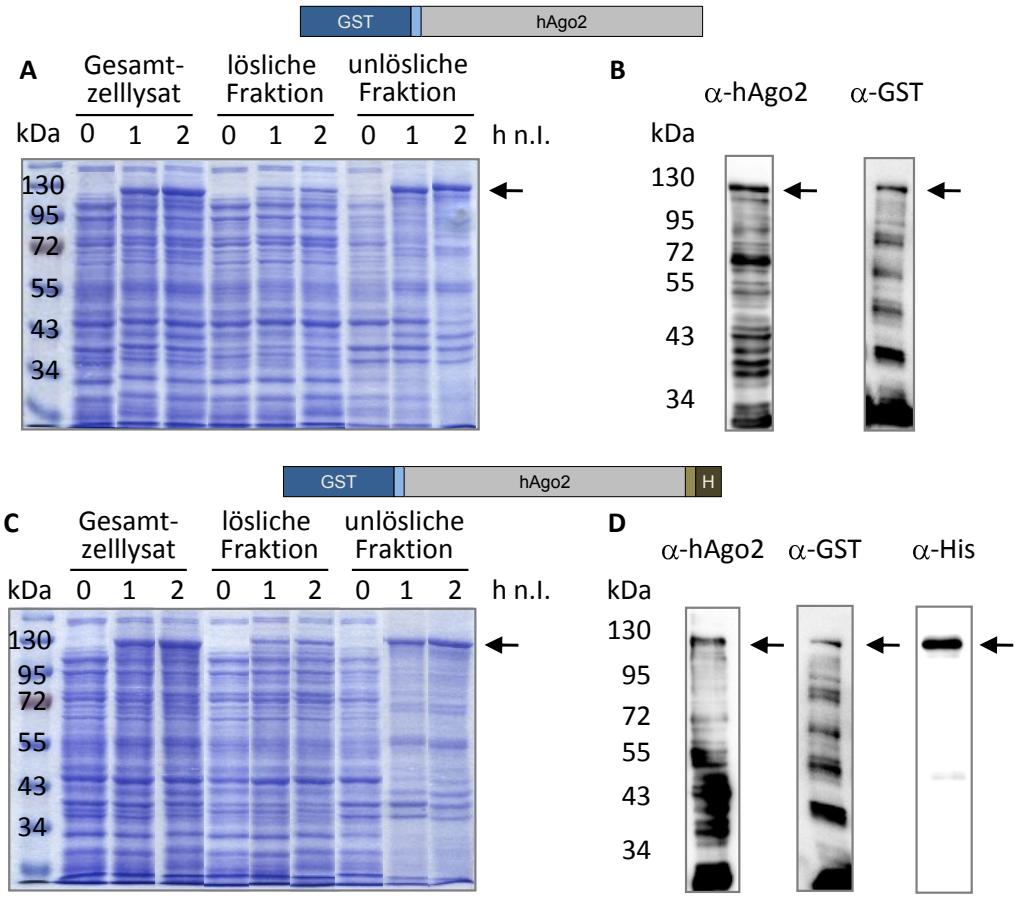


Abbildung 5.4: Expression von GST-hAgo2-Fusionsproteinen unter optimierten Bedingungen (siehe Abschnitt 4.3.6). Die Anzucht der Stämme BL21(DE3)-pET41b(+)-GST-hAgo2-His bzw. BL21(DE3)-pET41b(+)-GST-hAgo2 erfolgte in TFB-Medium bei 37°*C* für 2 h. *E. coli* Zellextrakte wurden auf Anwesenheit der Zielproteine sowie ihre Verteilung auf die lösliche und unlösliche Fraktion untersucht. (A, C) Detektion von GST-hAgo2 bzw. GST-hAgo2-His durch Coomassie-Färbung. (B, D) Western-Analyse von GST-hAgo2 bzw. GST-hAgo2-His mittels α-hAgo2-, α-GST- sowie α-His-Antikörper. Die Banden vollständig translatierter Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. h n.I.: Stunden nach Induktion.

5.3.4 Studien zur Optimierung der Expression von hTRBP-His

In dieser Arbeit sollte neben hAgo2 ein weiteres Protein charakterisiert werden, um Erkenntnisse über seine Rolle bei der RNA-Interferenz zu gewinnen: hTRBP. Es ist als Interaktionspartner von hAgo2 identifiziert und spielt vermutlich eine Rolle bei der Beladung des RISC (siehe Abschnitt 2.6.1). Der hierzu benötigte Expressionsstamm BL21(DE3)-pET41b(+)-hTRBP-His wurde freundlicherweise von Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far zur Verfügung gestellt. Weiterhin lag ein Protokoll zur Expression und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen, gefolgt von der Rückfaltung des Proteins, aus Vorarbeiten der AG Kretschmer-Kazemi Far vor. Um die Unsicherheit der Rückfaltungseffizienz zu umgehen, wurden Anstrengungen un-

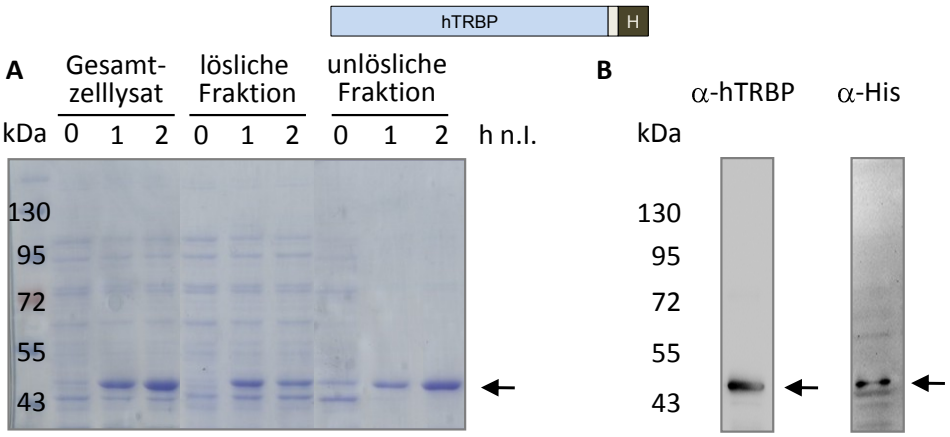


Abbildung 5.5: Expression von hTRBP-His (siehe Abschnitt 4.3.6). Die Anzucht des Stamms BL21(DE3)-pET41b(+)-hTRBP-His erfolgte in TFB-Medium bei 37°*C* für 4 h. *E. coli* Zellextrakte wurden auf Anwesenheit des Zielproteins sowie seine Verteilung auf die lösliche und unlösliche Fraktion untersucht. (A) Detektion von hTRBP-His durch Coomassie-Färbung. (B) Western-Analyse von hTRBP-His mittels α-hTRBP- sowie α-His-Antikörper. Die Banden der Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. h n. I.: Stunden nach Induktion.

ternommen, den löslich exprimierten hTRBP-His-Anteil zu vergrößern und im Anschluss eine Reinigung des nativen Proteins durchführen zu können.

Dafür wurde der Stamm BL21(DE3)-pET41b(+)-hTRBP-His in TFB-Medium bei 37°*C* kultiviert und die Proteinexpression für 4 h induziert. Nach zeitaufgelöster Analyse der fraktionierten Zellextrakte zeigte sich, dass nach 1 h mehr als 50 % der Gesamt-hTRBP-His-Menge in löslicher Form vorlag, wohingegen eine längere Induktionszeit insgesamt zwar mehr hTRBP-His hervorbrachte, jedoch einen deutlich höheren unlöslichen Anteil. Damit wurden als optimale Bedingungen für die Expression von hTRBP-His der Expressionsstamm bei 37°*C* in TFB-Medium kultiviert und die Proteinexpression für 1 h induziert (siehe Abbildung 5.5).

Die hTRBP-Identität sowie die Integrität der Poly-His-Markierung wurden durch Western-Analysen unter Verwendung von adäquaten Antikörpern und Größenmarkern nachgewiesen (siehe Abbildung 5.5 B).

5.4 Präparation von rekombinantem hAgo2 und hTRBP [2]

Als Voraussetzung für die meisten der geplanten biochemischen Studien war eine Präparation der Zielproteine mit möglichst hohem Reinheitsgrad sowie der Entfernung störender Faktoren wie Nukleasen oder inhibierender Chemikalien unabdingbar. Dies stellte vor allem für die Gewinnung von rekombinantem hAgo2 eine große Hürde dar. Zwar sind bereits Reinigungsprotokolle für bakteriell exprimiertes rekombinantes hAgo2 in der Literatur beschrieben [62, 255], jedoch konnten mit den publizierten Strategien keine großen Ausbeuten erzielt werden. Strategien wie die Isolierung aus Säuger- [79] oder Insektenzellen [199, 256] stellten auf Grund zu geringer Ausbeuten oder der Koisolierung weiterer Proteine ebenfalls keine Alternative dar. Aus diesen Gründen wurden, teilweise parallel, Erkenntnisse aus den verschiedenen Reinigungsstrategien, die sich durch die Verwendung der unterschiedlichen Konstrukte (siehe Abbildung 5.1) ergaben, gewonnen und miteinander kombiniert.

5.4.1 Studien zur Reinigung von NHA-hAgo2, hAgo2-His und His-hAgo2

Präparation aus *inclusion bodies* unter denaturierenden Bedingungen

Die Überexpression von rekombinanten Proteinen führt häufig zur Aggregatbildung in den Bakterienzellen. Die Aggregate oder *inclusion bodies* (Einschlusskörperchen) bestehen v. a. aus nicht nativ gefalteten Proteinen, was einen Vorteil für die Reinheit der aus den *inclusion bodies* isolierten Proteinen darstellt. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass die biologische Funktion des Proteins durch seine Rückfaltung wiederhergestellt werden muss.

Als Basis für die Reinigung von hAgo2 unter denaturierenden Bedingungen ohne Verwendung einer Affinitätsmarkierung wurde das bereits bestehende Protokoll für NHA-hAgo2 verwendet und auf die Konstrukte hAgo2-His und His-hAgo2 übertragen (siehe Abbildung 5.6).

Durch die Behandlung mit Lysozym, DNaseI und Detergenz wurden die Einschlusskörperchen weitgehend von den Zelltrümmern und gelösten Bakterienproteinen getrennt. Nach stringentem Waschen konnte das Zielprotein – im Fall von NHA-hAgo2 und His-hAgo2 quantitativ – resolubilisiert werden. Die Rückfaltung erbrachte partiell gereinigtes, lösliches hAgo2, dessen enzymatische Aktivität bestätigt werden konnte (siehe Abschnitt 5.5.2). Die Ausbeute betrug für NHA-hAgo2 7,1 mg pro g Bakterienzellen (NI), für hAgo2-His 13,7 mg pro g Bakterienzellen (NI) und für His-hAgo2 31,7 mg pro g Bakterienzellen (A_{280}).

[2] Die in Abschnitt 5.4 beschriebenen Experimente wurden teilweise in Zusammenarbeit mit S. Weißbach und J. Blank im Rahmen der Betreuung ihrer Bachelorarbeiten sowie A. Roth im Rahmen der Betreuung ihres studentischen Praktikums durchgeführt.

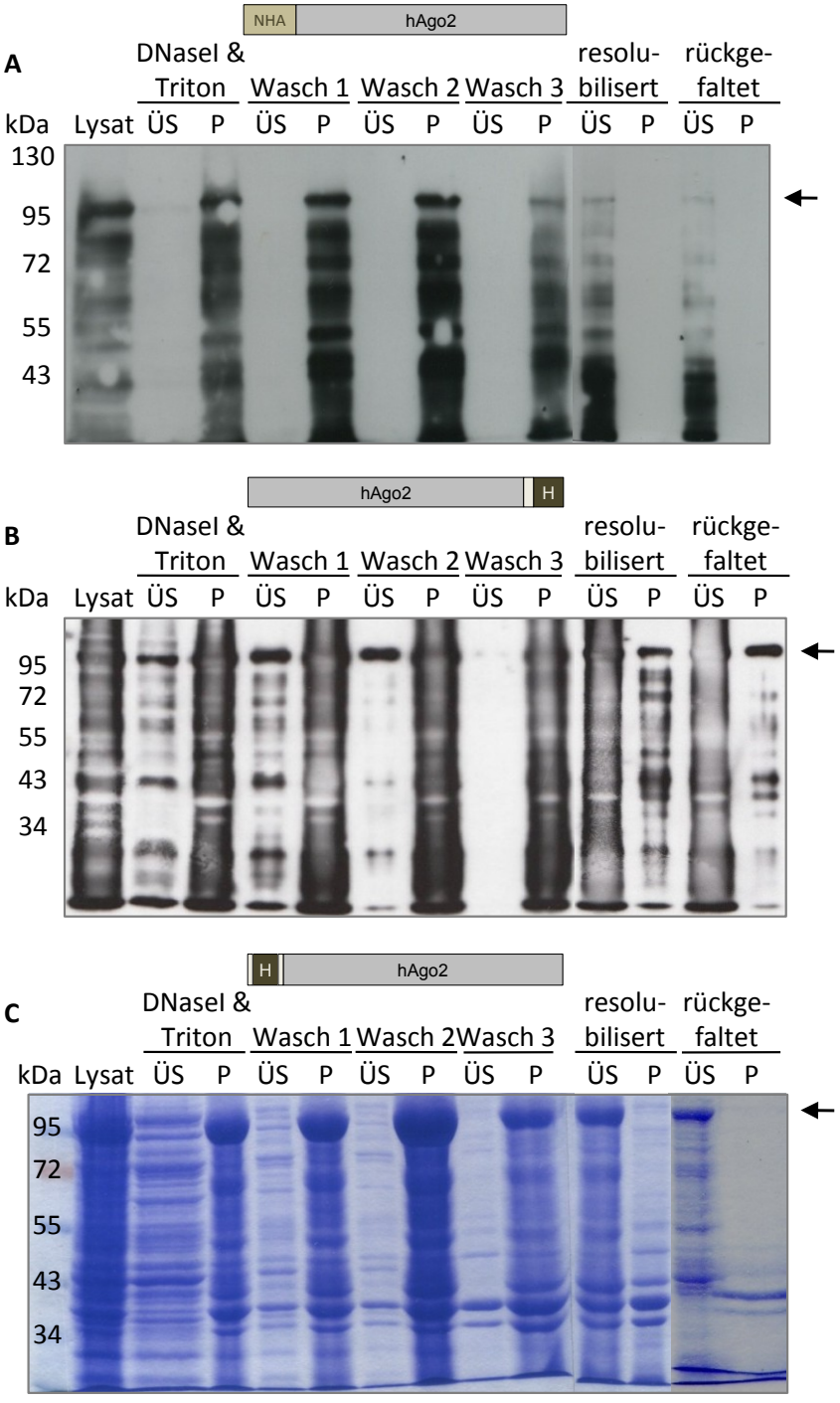


Abbildung 5.6: Präparation verschiedener hAgo2-Fusionsproteine aus *inclusion bodies* (siehe Abschnitt 4.3.8). (A) Western-Analyse von NHA-hAgo2 mittels α-HA-Antikörper. (B) Western-Analyse von hAgo2-His mittels α-hAgo2-Antikörper. (C) Detektion von His-hAgo2 durch Coomassie-Färbung. Die Banden vollständig translatierter Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. ÜS: Überstand nach Zentrifugation. P: Sediment nach Zentrifugation.

Reinigung mittels Affinitätschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Für die beiden Konstrukte His-hAgo2 und hAgo2-His ergab sich die Möglichkeit einer affinitätschromatographischen Reinigung. Zwar lag nur ein geringer Proteinanteil von ca. 10 % in gelöster Form vor (siehe Abbildung 5.2), jedoch wurde aus den bereits genannten Gründen für eine Reinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen zunächst diese Strategie verfolgt.

Die Untersuchungen wurden mit hAgo2-His durchgeführt und sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die Integrität der Ni^{2+}-NTA-Säulenmatrix wurde getestet, indem ein GST-His-Fusionsprotein nach Herstellerangaben erfolgreich gereinigt wurde.

Zellaufschluss		Elution	Säulenmaterial	Maßstab
50 mM	Tris pH 7,4	linear 5 – 500 mM Imidazol	1,5 ml Ni^{2+}-NTA	präparativ
0,5 mM	DTT	in 100 min		
1 mM	PMSF			
40 ml	pro 14 g Zellen			
50 mM	Tris pH 7,4	linear 0 – 500 mM Imidazol	1,5 ml Ni^{2+}-NTA	präparativ
40 ml	pro 14 g Zellen	in 100 min		
50 mM	Tris pH 7,4	150 mM Imidazol	150 µl TALON	analytisch
0,5 mM	DTT			
1 mM	PMSF			
151 µl	pro 50 mg Zellen			
50 mM	Tris pH 7,4	pH 4,4	150 µl TALON	analytisch
0,5 mM	DTT			
1 mM	PMSF			
151 µl	pro 50 mg Zellen			

Tabelle 5.1: Getestete Bedingungen für die nicht-denaturierende Reinigung von hAgo2-His.

Bei den untersuchten experimentellen Bedingungen zeigte sich, dass sowohl die Bindung von hAgo2-His an das Säulenmaterial als auch die Elution des Proteins problematisch waren, was zu sehr geringen Ausbeuten führte. Deshalb wurde die Reinigungsstrategie geändert, um den wesentlich größeren unlöslichen Proteinanteil unter denaturierenden Bedingungen zu isolieren.

Reinigung mittels Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Für die systematische Entwicklung eines Protokolls wurde zunächst die Bindung von hAgo2-His an die Säulenmatrix und im Anschluss die Elution des Zielproteins untersucht. Dabei

konnte mit der bisher verwendeten Matrix Ni^{2+}-NTA weder unter nicht-denaturierenden noch unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 2 M Harnstoff eine zufriedenstellende Bindung erzielt werden. Deshalb wurde im Folgenden eine Matrix mit immobilisierten Co^{2+}-Ionen (TALON Superflow) verwendet.

Für die Optimierung von Proteinbindung bei der Beladung der Matrix sowie der Elution wurden die Pufferbedingungen und der pH-Wert, die Art, Dauer und Temperatur während der Beladung und Elution wie folgt variiert.

Für die Optimierung der Proteinbindung bei der Beladung der Matrix wurden zunächst im analytischen Maßstab die Pufferbedingungen variiert. Es wurden 20 – 50 mg Bakterienzellen in 1 ml nicht-denaturierendem Puffer lysiert und nach Entfernen der gelösten bakteriellen Proteine durch Zentrifugation der verbliebene unlösliche Anteil in verschiedenen Puffern bei pH 12 solubilisiert. Die gewonnene Lösung wurde mit 125 μl Säulenmatrix für 1 h bei 4 $°C$ unter ständiger Bewegung inkubiert. Es wurde der Einfluss von Harnstoff, NaOH, NaCl, β-Mercaptoethanol und den Puffersubstanzen Na_2HPO_4 bzw. CAPS untersucht, wobei die Verwendung eines Puffers mit 2 M Harnstoff und 20 mM CAPS als einziger ein positives Ergebnis zeigte. Eine Behandlung der Zellen bei Raumtemperatur gegenüber bei 4 $°C$ zeigte keinen Unterschied. Im Weiteren wurden 2 g Bakterienzellen in 20 ml denaturierendem Puffer bei pH 8 in Anwesenheit von 8 M Harnstoff und 5 mM β-Mercaptoethanol lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4 $°C$ und 50.000 $\times$ g entfernt und der verbliebene Anteil mit 125 μl Säulenmatrix für 16 h bei 4 $°C$ unter ständiger Bewegung inkubiert. Eine anschließende Western-Analyse und Quantifizierung zeigte, dass durch dieses Verfahren ca. 30 % hAgo2-His an die Säulenmatrix gebunden werden konnte.

Im Anschluss wurde nach optimalen Bedingungen für die Elution gesucht. Zunächst wurde eine Elution von Proteinen untersucht, die unter Verwendung von 2 M Harnstoff mit der Säulenmatrix inkubiert worden waren. Die Erniedrigung des pH-Werts von 12 während der Beladung auf 5,5 während der Elution zeigte keinen Erfolg. Auch eine Elution durch Verdrängung mit Imidazol brachte nur eine geringe Ausbeute. Der Einfluss verschiedener Imidazol- und Harnstoff-Konzentrationen sowie von L-Arginin-Zusatz wurde getestet, führte aber ebenfalls nicht zu einem verbesserten Ergebnis. Das Protein, das in Anwesenheit von 8 M Harnstoff an die Säulenmatrix gebunden hatte, konnte durch Erniedrigung des pH-Werts auf 4,5 in Anwesenheit von 1 mM β-Mercaptoethanol eluiert werden.

Da sich sowohl die Bindung von hAgo2-His an die Säulenmatrix als auch die Elution unter denaturierenden Bedingungen als problematisch erwiesen, wurde zur Gewinnung einer möglichst großen Proteinmenge eine große Bakterienzellmasse eingesetzt und die Reinigung unter Zuhilfenahme einer FPLC-Anlage im präparativen Maßstab mit den bisher genutzten Bedingungen durchgeführt. Allerdings konnten diese Bedingungen nicht erfolgreich vom analytischen auf einen präparativen Maßstab übertragen werden. Aus technischen Gründen erfolgte im präparativen Maßstab die Beladung der Säulenmatrix mit Hilfe einer Pumpe ohne permanente

Bewegung von Proteinlösung und Matrix; außerdem konnten die genauen Verhältnisse von Zellmasse zu Aufschlusspuffer und Matrix nicht eingehalten werden. Dies mögen Gründe sein, warum die getesteten Pufferbedingungen nicht auf einen präparativen Maßstab übertragbar waren. Die Verwendung von 2 % Triton-X-100, 500 mM NaCl oder 5 mM β-Mercaptoethanol brachte ebenfalls keine Verbesserung der Proteinbindung.

Alle Experimente, die statt mit hAgo2-His mit His-hAgo2 durchgeführt wurden, erbrachten vergleichbar schlechte Ergebnisse. So war es nicht möglich, unter Verwendung von Ni^{2+}-NTA oder TALON als Säulenmatrix unter denaturierenden Bedingungen im analytischen oder präparativen Maßstab eine zufriedenstellende Menge an hAgo2 zu reinigen.

Allerdings stellte die unterschiedliche Position der Poly-His-Markierung (N- *versus* C-terminal) eine Möglichkeit dar, das Konzept der Trennung von vollständig translatiertem hAgo2 von C-terminal verkürzten Produkten zu testen. Dazu wurden beide Konstrukte aus *inclusion bodies* isoliert (siehe Abschnitt 5.4.1) und nach erfolgter Rückfaltung je 1 ml hAgo2-Lösung für 16 h bei 4 °C mit je 500 μl Säulenmatrix TALON Superflow unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Matrix wurde von der Proteinlösung getrennt und ungebundenes hAgo2 durch Waschen entfernt. Es folgte die Elution durch Inkubation mit 500 mM Imidazol-haltigem Puffer für 20 min bei Raumtemperatur. Als Präzipitationskontrolle wurden je 50 μl proteinhaltige Matrix bei 95 °C mit Ladepuffer für SDS-PAGE behandelt. Abbildung 5.7 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse.

Beim Vergleich von Abbildungen 5.7 A und B zeigt sich, dass die eluierten Proteine das gleiche Bandenmuster aufweisen, unabhängig von der Position der Poly-His-Markierung. Die Elutionsfraktionen von hAgo2-His sollten allerdings nur das vollständig translatierte hAgo2 enthalten. Dies impliziert, dass die C-terminal verkürzten hAgo2-Fragmente an das vollständig translatierte Protein binden und so koeluieren. Ein weiteres Indiz für die Bildung von hAgo2/hAgo2-Interaktionen ist die Aggregationstendenz von hAgo2-His, gezeigt durch die

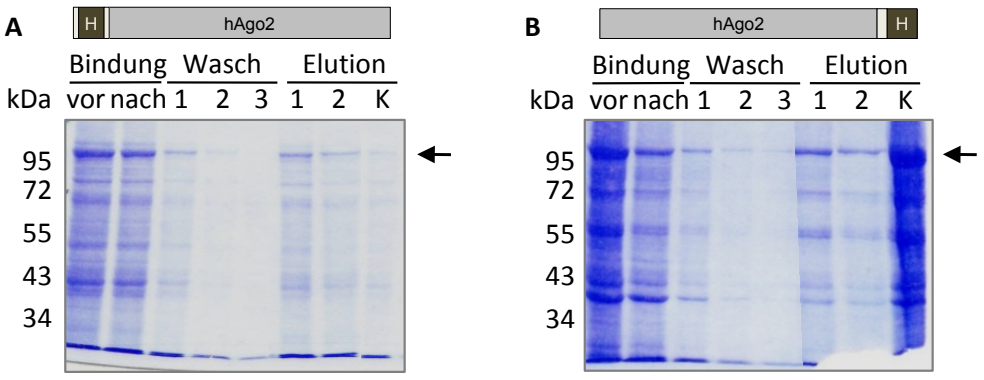


Abbildung 5.7: Affinitätschromatographische Reinigung von His-hAgo2 (A) und hAgo2-His (B). Durchführung siehe Text. Detektion durch Coomassie-Färbung. Die Banden vollständig translatierter Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. K: Präzipitationskontrolle.

Präzipitationskontrolle in Abbildung 5.7 B.

Diese Erkenntnis stellte die Strategie einer Isolierung von vollständig translatiertem hAgo2 durch Verwendung einer C-terminalen Poly-His-Markierung in Frage. Deshalb wurden im Folgenden mit dem aus *inclusion bodies* isolierten und durch 500 mM L-Arg partiell stabilisierten hAgo2-His und His-hAgo2 Studien zu einer möglichen Reinigung durch Größenauschlusschromatographie durchgeführt.

Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Zunächst wurde mit Hilfe eines Gelfiltrationsstandards mit fünf Proteinen in einem Molekulargewichtsbereich von 1,35 – 670 kDa für die verwendete Gelfiltrationssäule eine Eichgerade erstellt und das Ausschlussvolumen ermittelt. Proteine bzw. deren Aggregate, die auf Grund ihrer Größe keine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial eingehen, werden nicht zurückgehalten und verlassen deshalb das Säulenbett mit der Pufferfront. Bei einer Säule mit 30 ml Volumen und einer Flussrate von 0,5 ml/min ist das nach ca. 15 min der Fall. Dies konnte experimentell bestätigt werden; Proteinaggregate wiesen eine Retentionszeit von 15,9 min auf.

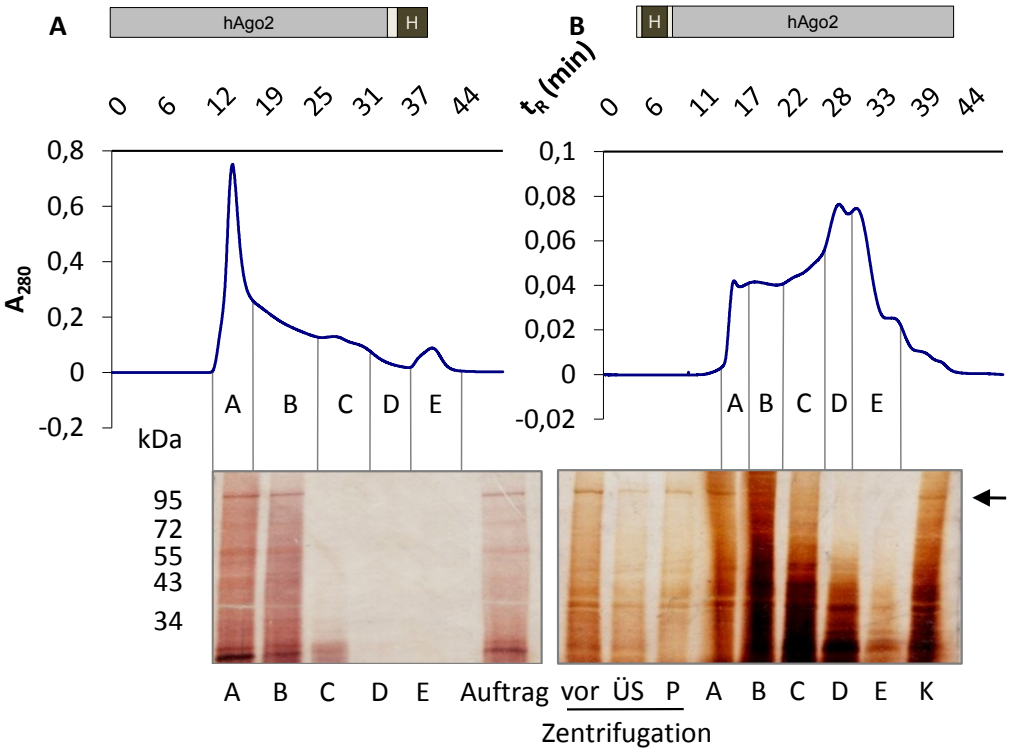


Abbildung 5.8: Größenauschlusschromatographie von hAgo2-His (A) und His-hAgo2 (B). Durchführung siehe Text. Detektion durch Silbernitrat-Färbung. Die Banden vollständig translatierter Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. t_R: Retentionszeit. A – E: Fraktionen. K: TCA-Kontrolle. ÜS: Überstand nach Zentrifugation (entspricht der auf die Säule geladenen Proteinlösung, ist also analog zur Spur Auftrag aus (A)). P: Sediment nach Zentrifugation.

Um die Größenauschlusschromatographie als Möglichkeit einer weiteren Reinigungsmethode für hAgo2-His oder His-hAgo2 zu testen, wurde die Säule mit Rückfaltungspuffer (siehe Abschnitt 4.3.8) äquilibriert und zunächst mit 2 mg aus *inclusion bodies* isoliertem hAgo2-His beladen. Das Chromatogramm (siehe Abbildung 5.8 A) zeigt einen maximalen Absorptionsanstieg bei einer Retentionszeit von 15,4 min. Daraus lässt sich schließen, dass hAgo2-His auf Grund seiner Größe nicht mit der Säulenmatrix interagiert hat und vermutlich stark aggregiert vorliegt. Die einzelnen Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die enthaltenen Proteine durch Silbernitrat-Färbung detektiert. Zwar zeigt sich in Fraktion B, dass eine weniger stark aggregierte hAgo2-His-Population eluiert werden konnte. Jedoch deutet der Vergleich des Bandenmusters mit demjenigen der eingesetzten Proteinlösung auf keinen Reinigungseffekt hin.

In einem weiteren Experiment wurde aus *inclusion bodies* isoliertes His-hAgo2 eingesetzt, das zuvor bei 150.000 × g und 4 °C für 1 h zentrifugiert worden war, um große Aggregate vor der Beladung der Säule abzutrennen. So wurden bereits vor der Größenausschlusschromatographie etwa 50 % der eingesetzten 1,5 mg sedimentiert (siehe Abbildung 5.8 B). Von den gesammelten Fraktionen wurden je 1,8 ml mit TCA gefällt, elektrophoretisch getrennt und per Silbernitrat-Färbung detektiert. Es zeigt sich, dass ein großer Teil der Aggregate, die im Fall von hAgo2-His nicht mit der Säulenmatrix interagiert hatten, durch die zuvor durchgeführte Zentrifugation entfernt werden konnten. Allerdings konnte erneut kein zusätzlicher Reinigungseffekt für weniger stark aggregiertes His-hAgo2, welches eine längere Retentionszeit aufwies (siehe Abbildung 5.8 B, Fraktionen B und C), erzielt werden.

Zusammen mit den Erkenntnissen der affinitätschromatographischen Reinigungsexperimente, also geringer Reinigungseffekt und sehr schlechte Ausbeute, wurde entschieden, das aus *inclusion bodies* isolierte, partiell gereinigte hAgo2-His und His-hAgo2 für weitere Studien zu verwenden, für die der erreichte Reinheitsgrad genügte.

5.4.2 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Parallel zu den Studien mit hAgo2-Konstrukten zu einer möglichen Reinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde mit GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His an einer Lösung zur Gewinnung von ausreichend großen Mengen (mehrere Milligramm) Protein gearbeitet. Die beiden Konstrukte ermöglichen durch ihre GST-Markierung eine weitere affinitätschromatographische Strategie. Außerdem lag in beiden Fällen ein weitaus größerer Anteil von hAgo2 in gelöster Form im bakteriellen Extrakt vor als bei den anderen Konstrukten. Deshalb wurden zunächst systematisch die Bedingungen für die affinitätschromatographische Reinigung von GST-hAgo2-His und GST-hAgo2 unter nicht-denaturierenden Bedingungen im analytischen Maßstab getestet.

Studien zur Optimierung der Reinigung von GST-hAgo2 und GST-hAgo2-His im analytischen Maßstab

Unter Abschnitt 4.3.8 ist das Protokoll mit den optimierten Bedingungen für eine Reinigung von GST-hAgo2-His und GST-hAgo2 im analytischen Maßstab aufgeführt. Die Experimente zur Ermittlung dieser optimierten Bedingungen sind im Folgenden beschrieben.

Es wurden pro Experiment etwa 800 mg Bakterienzellen verwendet. Für die Bestimmung der optimalen Bedingungen wurden die Zusammensetzung des Aufschlusspuffers, die Länge der Ultraschallbehandlung, die Inkubation der löslichen Proteinfraktion mit der Säulenmatrix bezüglich Dauer, Art und Temperatur, die Zusammensetzung des Elutionspuffers sowie Art, Dauer und Temperatur während der Elution variiert. Die Integrität der Säulenmatrix wurde getestet, indem ein GST-Luciferase-Fusionsprotein nach optimiertem Protokoll (siehe Abschnitt 4.3.8) erfolgreich gereinigt wurde.

Der Zellaufschluss erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 0,5 – 10 mM DTT sowie unterschiedlich stringentem Ultraschall. Zwar sollte der größtmögliche Anteil an Zellen lysiert werden, jedoch ohne eine Beeinträchtigung der Proteinfaltung. Nach Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile durch Zentrifugation wurde der die löslichen Proteine enthaltende Überstand mit der Säulenmatrix Glutathion Sepharose 4B für 1 – 16 h bei Raumtemperatur oder 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Alternativ wurde die Säulenbeladung bei Raumtemperatur durch die *gravity flow* Methode getestet. Zuvor war die Säulenmatrix mit einem Bindungspuffer equilibriert worden, der die dem Aufschlusspuffer entsprechende Konzentration DTT enthielt. Zusätzlich wurde der Einfluss von 150 – 300 mM NaCl, 10 % Glyzerin und 0,5 – 5 mM reduziertes Glutathion im Bindungspuffer untersucht. Zur Optimierung der Elution wurde die Konzentration von reduziertem Glutathion von 10 – 20 mM variiert und der Einfluss von 2 M NaCl untersucht. Die Elution wurde mit unterschiedlichen Volumina bei Raumtemperatur oder 4 °C für 10 min – 16 h unter ständiger Bewegung oder nach der *gravity flow* Methode durchgeführt.

Die beiden Konstrukte zeigten in den Experimenten dasselbe Verhalten, so dass für GST-hAgo2-His und GST-hAgo2 ein identisches Protokoll entwickelt wurde. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Bakterienzellen in Anwesenheit von 10 mM DTT durch eine milde Ultraschallbehandlung (2 × 1 min mit 30 % Power und 60 % Cycle, gefolgt von 1 min Inkubation auf Eis) lysiert wurden. Die Säulenmatrix wurde ebenfalls in Anwesenheit von 10 mM DTT äquilibriert; auf die Verwendung von Glyzerin und NaCl wurde verzichtet, da dies die Bindung des Proteins beeinträchtigte. Die Beladung der Matrix erwies sich bei 4 °C für 16 h unter ständiger Bewegung als optimal. Die mit Proteinen beladene Matrix wurde mit Bindungspuffer gewaschen. Für eine optimierte Elution wurde sie anschließend mit 1 Säulenvolumen Elutionspuffer mit 20 mM reduziertem Glutathion bei Raumtempertaur für 10 min inkubiert und nach der *gravity flow* Methode eluiert. Mit dem optimierten Protokoll konnte aus 1 g Bakterienzellen ca. 0,6 mg Protein gereinigt werden.

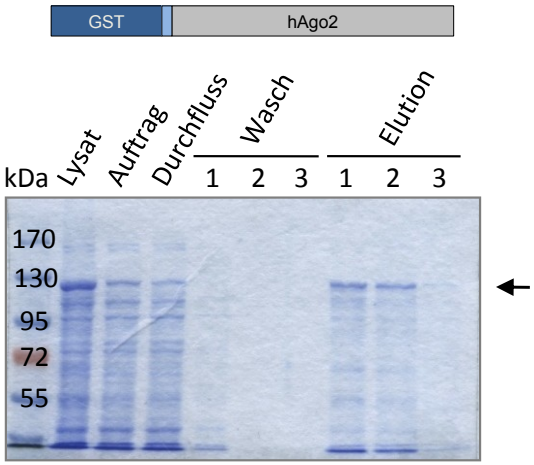


Abbildung 5.9: Repräsentative affinitätschromatographische Reinigung von GST-hAgo2 unter optimierten Bedingungen im analytischen Maßstab (siehe Abschnitt 4.3.8). Detektion durch Coomassie-Färbung. Die Banden vollständig translatierter Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Für GST-hAgo2-His konnte eine weitere affinitätschromatographische Reinigung unter Verwendung der Poly-His-Markierung getestet werden. Es wurden, wie bereits bei den Reinigungsstudien von hAgo2-His unter Verwendung der Poly-His-Markierung und nicht-denaturierenden Bedingungen, Matrices mit immobilisierten Ni^{2+}- oder Co^{2+}-Ionen verwendet. Im ersten Fall kam es zu einer unerwünschten Bindung *E. coli* eigener Proteine, was durch die Kontrolle mit untransformierten BL21(DE3)-Zellen gezeigt wurde. GST-hAgo2-His konnte in den Elutionsfraktionen nicht detektiert werden. Im zweiten Fall war die Bindung des Proteins an die Matrix so schwach, dass eluiertes GST-hAgo2-His nur mit Hilfe einer Silbernitrat-Färbung im SDS-Gel nachgewiesen werden konnte; die Menge war für eine Detektion mittels der weniger sensitiven Coomassie-Färbung nicht möglich. Hier zeigte sich außerdem, dass eine Entfernung von durch unvollständige Translation entstandenen kürzeren hAgo2-Varianten nur sehr bedingt möglich war. Dies war bereits für hAgo2-His beobachtet worden (siehe Abschnitt 5.4.1).

Als zweite alternative Reinigungsmethode wurde eine Größenausschlusschromatographie getestet, wobei sich auch in diesem Fall zeigte, dass sich das verwendete GST-hAgo2 verhielt wie die bereits untersuchten Konstrukte His-hAgo2 und hAgo2-His. Nach Äquilibrierung der Säule mit GF-Puffer und der Entfernung großer Aggregate durch Zentrifugation wurden 110μg Protein für eine analytische Gelfiltration eingesetzt. Durch die Zentrifugation wurde etwa 50 % des Proteins sedimentiert, und der eluierte Anteil wies vergleichbar viele Verunreinigungen auf wie das eingesetzte Material.

Die beschriebenen Experimente zeigen, dass die gewählten Methoden keinen zusätzlichen Reinigungseffekt erbringen, jedoch die Ausbeute drastisch verringern. Für das Konstrukt GST-hAgo2-His wurde konstatiert, dass die C-terminale Poly-His-Markierung zum Einen den Nachteil einer verminderten enzymatischen Aktivität zur Folge hatte (siehe Abschnitt 5.5.2) und

zum Anderen den angestrebten Vorteil einer Entfernung unvollständig translatierter hAgo2-Versionen nicht zeigte. Deshalb wurde für die weiteren Arbeiten das Konstrukt GST-hAgo2 ausgewählt und im präparativen Maßstab gereinigt.

Reinigung von GST-hAgo2 im präparativen Maßstab

Im Fall von hAgo2-His und His-hAgo2 war zwar eine Reinigung im analytischen Maßstab erfolgreich gewesen, die Bedingungen ließen sich jedoch nicht auf einen präparativen Maßstab übertragen und deshalb konnten keine zufriedenstellenden Ausbeuten erzielt werden (siehe Abschnitt 5.4.1). Deshalb wurde zunächst untersucht, ob es sich im Fall von GST-hAgo2 ähnlich verhielt. In einem semipräparativen Ansatz wurden die zuvor getesteten Bedingungen auf ca. 3 g Zellen angewendet. Mit den Volumina von 1 ml Säulenmatrix sowie 90 ml Aufschlusspuffer wurden hierbei die Grenzen des technisch Durchführbaren im semipräparativen System erreicht. Nach der Durchführung von Reinigung, Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie Quantifizierung der in den Eluaten enthaltenen Proteinmengen zeigte sich, dass bei einer Verwendung der etwa 3,5-fachen Zellmasse gegenüber dem analytischen Maßstab mit 1,3 mg die 2,6-fache Proteinausbeute erzielt werden konnte.

Für die sich anschließende Reinigung von GST-hAgo2 im präparativen Maßstab mit Hilfe einer FPLC-Anlage konnten die optimierten Bedingungen aus technischen Gründen nur näherungsweise angewendet werden. Die optimierten Puffer wurden von den Experimenten im analytischen Maßstab übernommen. Allerdings wurden die Verhältnisse von Zellmasse zu Aufschlusspuffer- und Säulenmatrixvolumen verändert, was zu einer verbesserten oder verschlechterten Ausbeute führen kann. Die genaue Durchführung ist unter Abschnitt 4.3.8 beschrieben.

Nach Durchführung der ersten Reinigung von GST-hAgo2 im präparativen Maßstab zeigte das aufgezeichnete Chromatogramm nur einen geringen Anstieg der Absorption bei 280 nm und mit SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Färbung konnte nur sehr wenig GST-hAgo2 in den Elutionsfraktionen detektiert werden (siehe Abbildung 5.10 A). Nachdem die GST-hAgo2-enthaltende Proteinlösung das Säulenbett passiert hatte (Durchfluss), wurde sie aufgefangen und die Säule nach der ersten Elution durch Waschen mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer regeneriert. Anschließend wurde der Durchfluss ein weiteres Mal auf die Säule gepumpt, diese wie zuvor gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert. Bei dieser zweiten Reinigung kam es zu einem starken Anstieg der Absorption bei 280 nm während des Elutionsvorganges. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Färbung zeigte, dass bei der zweiten Reinigung, im Gegensatz zur ersten, GST-hAgo2 an die Säule gebunden hatte und eluiert werden konnte (siehe Abbildung 5.10 B). Jede weitere Wiederholung der Reinigung erzielte Proteinausbeuten, die vergleichbar waren zur zweiten Reinigung. Der Prozess wurde insgesamt sechs Mal durchgeführt und die GST-hAgo2 enthaltenden Elutionsfraktionen jeder Charge (1 – 6) nach Abschätzung der Proteinmenge in je drei Konzentrationsgraden vereint (A: hoch kon-

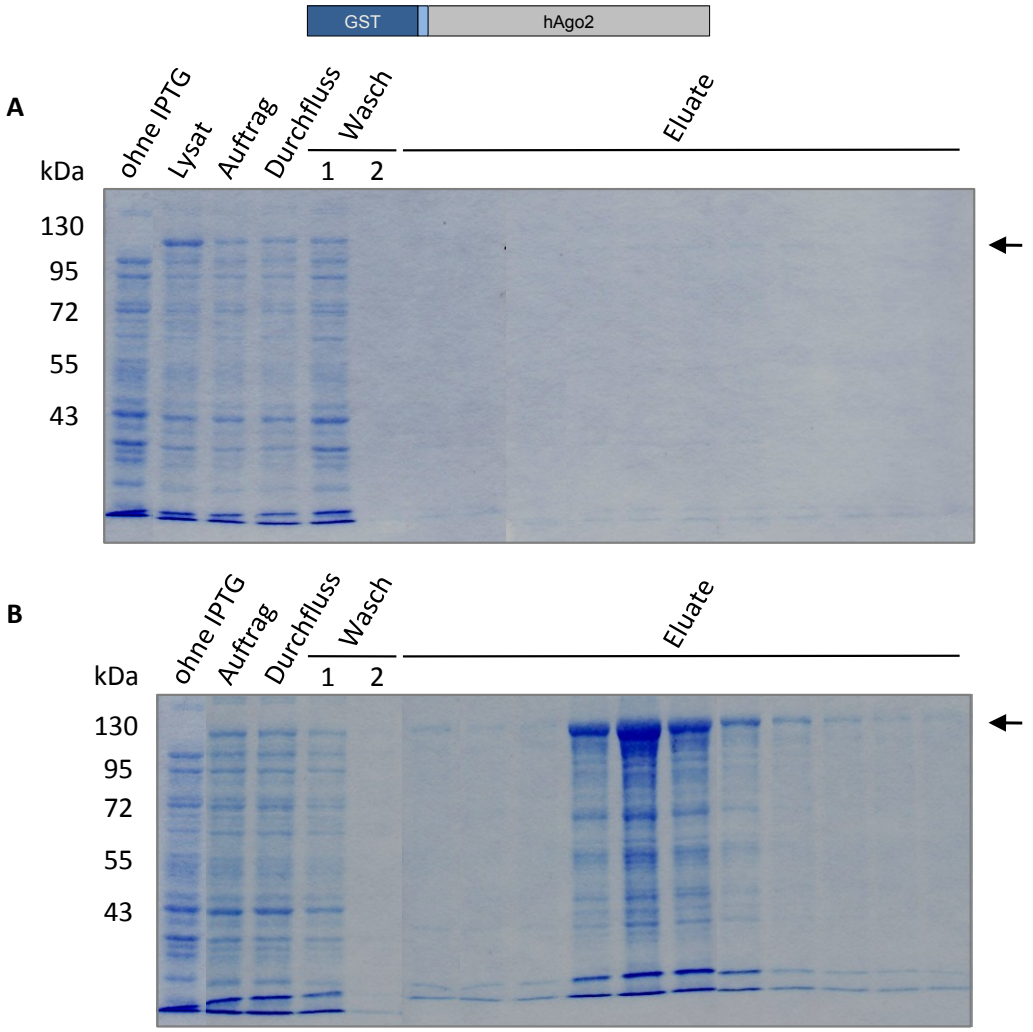


Abbildung 5.10: Affinitätschromatographische Reinigung von GST-hAgo2 im präparativen Maßstab (siehe Abschnitt 4.3.8). (A) Erste Reinigung mit minimaler Ausbeute. Detektion durch Coomassie-Färbung. (B) Repräsentative wiederholte Reinigung mit stark gesteigerter Ausbeute. Detektion durch Coomassie-Färbung. Die Banden vollständig translatierter Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

zentriert, B: mittelstark konzentriert, C: schwach konzentriert). Die Konzentration aller Fraktionen wurde gemessen (A_{280}), die enzymatische Aktivität von GST-hAgo2 getestet (siehe Abschnitt 5.5.2) und die Präparationen auf mögliche Nuklease-Verunreinigungen untersucht (siehe Abschnitt 5.5.1). Mit Hilfe der wiederholten Beladung und Elution konnten pro Gramm Bakterienzellen etwa 6,4 mg GST-hAgo2 gereinigt werden. Die Fraktionen geringer Proteinkonzentration wurden durch Ultrafiltration eingeengt, alle Chargen aliquotiert und bei $-20°C$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.4.3 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für hTRBP-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Nach der erfolgreichen Etablierung eines hTRBP-His-Expressionssystems zur Gewinnung von größtmöglichen Mengen an löslichem Protein (siehe Abschnitt 5.3.4) wurde eine affinitätschromatographische Reinigung von hTRBP-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen im präparativen Maßstab durchgeführt. Dabei erwies sich der Umgang mit diesem Protein als wesentlich einfacher als mit den unterschiedlichen hAgo2-Konstrukten.

In einem ersten experimentellen Ansatz wurden ca. 8 g BL21(DE3)-pET41b(+)-hTRBP-His Bakterienzellen aufgeschlossen und die Proteinreinigung, wie unter Abschnitt 4.3.8 beschrieben, mit folgender Ausnahme durchgeführt. Statt Elution durch einen linearen Imidazolgradienten von 5 – 200 mM über 50 min wurde nach dem Waschen der Säule in Anwesenheit von 5 mM Imidazol die Elution durch Erhöhung auf 200 mM Imidazol ohne Gradienten durchgeführt (siehe Abbildung 5.11 A). Zur Entfernung von verunreinigenden Proteinen wurden die

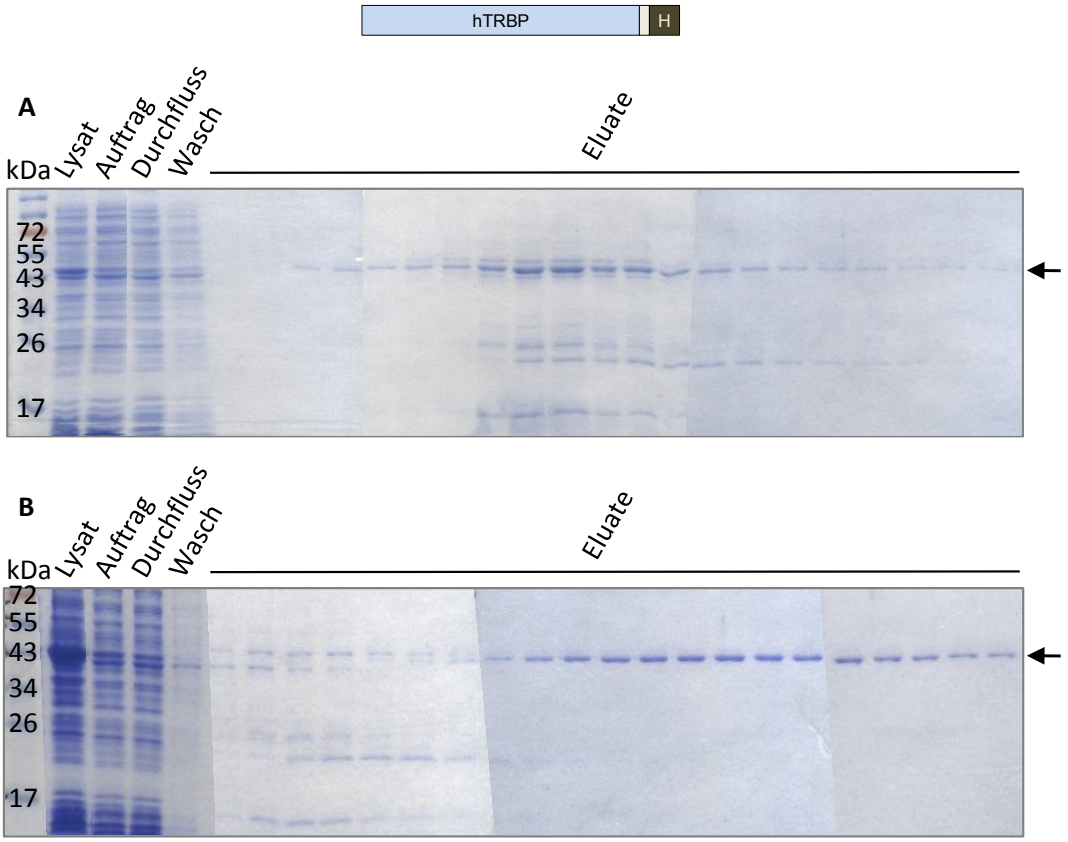


Abbildung 5.11: Affinitätschromatographische Reinigung von hTRBP-His im präparativen Maßstab (siehe Abschnitt 4.3.8). (A) Reinigung ohne Gradientenelution. Detektion durch Coomassie-Färbung. (B) Reinigung mit Gradientenelution. Detektion durch Coomassie-Färbung. Die Banden der Zielproteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

entsprechenden Elutionsfraktionen vereinigt und einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen, da hTRBP einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 6,35 aufweist und somit bei pH 7,5 eine negative Nettoladung besitzt. Hierzu wurde eine TMAE Sepharose Source 15 Säule verwendet. Bei der Elution durch einen biphasischen Gradienten (0 – 1 M NaCl in 30 min, 1 – 2 M in 5 min) konnte hTRBP-His nicht annähernd quantitativ eluiert werden, wie eine spätere SDS-PAGE-Analyse zeigte. Die Annahme, dass das Zielprotein auf der Säule aggregiert war und sich deshalb nicht eluieren ließ, bestätigte sich durch das Spülen mit 3×1 ml 1 M NaOH. Bei der Analyse der derart eluierten Fraktionen konnte hTRBP-His in einem SDS-Gel detektiert werden.

Im zweiten experimentellen Ansatz wurden etwa 13 g Bakterienzellen lysiert und hTRBP-His wie unter Abschnitt 4.3.8 beschrieben gereinigt. Im Gegensatz zum oben beschriebenen experimentellen Ansatz führte die Verwendung eines linearen Imidazolgradienten bei der Proteinelution dazu, dass geringer affin gebundene, verunreinigende Proteine vor dem Zielprotein eluierten und daher für hTRBP-His ein hoher Reinheitsgrad erzielt werden konnte (siehe Abbildung 5.11 B).

Nach Vereinigung der hTRBP-His enthaltenden Fraktionen erfolgte eine Dialyse gegen glyzerinhaltigen Lagerpuffer sowie ggf. die Konzentrierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung oder Ultrafiltration und die Lagerung von hTRBP-His bei $-20\,°C$. Bei einer ersten präparativen Reinigung konnten pro g Bakterienzellen 0,3 mg (A_{280}) hTRBP-His gereinigt werden, wobei durch Präzipitation während der Dialyse ca. 30 % Verlust zu verzeichnen war. Bei einer zweiten Reinigung fiel die Ausbeute mit 1,5 mg (A_{280}) Protein pro g Bakterienzellen höher aus, wobei es kaum zu Präzipitation während der Dialyse kam.

5.5 Biochemische Charakterisierung von rekombinantem hAgo2 [3]

5.5.1 Untersuchung der Präparationen auf Nuklease-Verunreinigungen

Alle hAgo2-Präparationen wurden, wie unter Abschnitt 4.3.10 beschrieben, auf die Anwesenheit von kontaminierenden Nukleasen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die NHA-hAgo2- und hAgo2-His-Präparationen keine detektierbare Nuklease-Kontamination enthielten (siehe Abbildung 5.12 A und B). Die Präparation von His-hAgo2 hingegen wies eine starke Kontamination auf. Diese Präparation wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet. Da die Reinigung von GST-hAgo2 in mehreren Chargen erfolgte, konnten diese separat auf eine mögliche Kontamination untersucht werden. Alle Chargen wiesen eine leichte Kontamination auf, eventuell bedingt durch die native Reinigungsstrategie. Deshalb wurden die mit GST-hAgo2 durchgeführten Studien bei Bedarf in Anwesenheit von RNase-Inhibitoren durchgeführt bzw.

[3] Die in Abschnitt 5.5 beschriebenen Experimente wurden teilweise in Zusammenarbeit mit S. Weißbach und S. Willkomm im Rahmen der Betreuung ihrer Bachelor- bzw. Masterarbeit durchgeführt.

die Experimente in einem Zeitfenster durchgeführt, in dem die Nuklease-Kontamination nicht zum Tragen kam.

5.5.2 Überprüfung der sequenzspezifischen Spaltungsaktivität

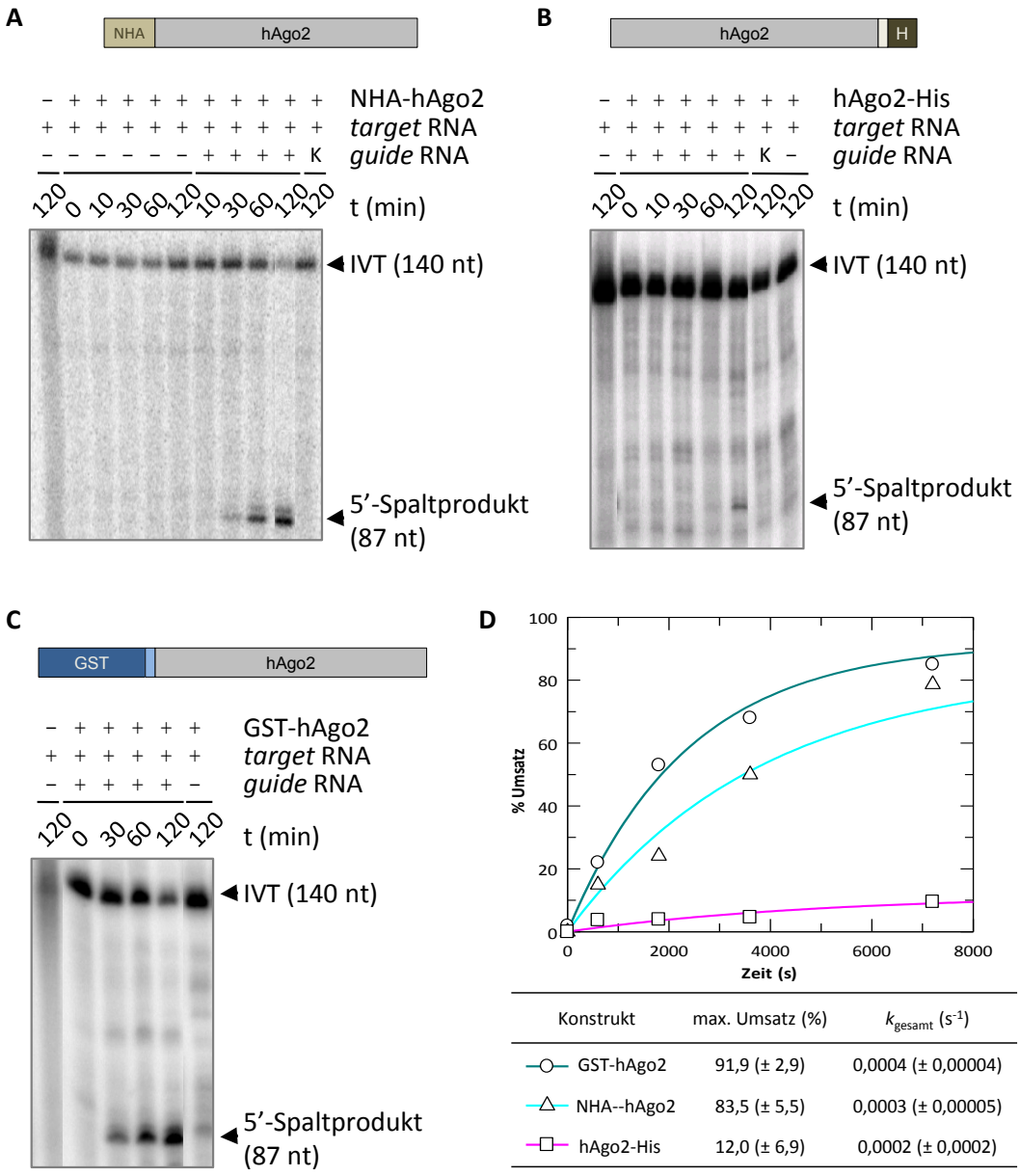
Nach der erfolgreichen Präparation der hAgo2-Konstrukte sollten die Proteine hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität getestet werden. Da hAgo2 eine intrinsische Nukleasefunktion besitzt und charakteristische Spaltprodukte generiert, die in Abhängigkeit des *guide* Stranges eine definierte Länge aufweisen, wurde die Spaltungsaktivität als Maß der enzymatischen Aktivität herangezogen.

Die einzelnen Proteinpräparationen wurden mit der *guide* RNA as2B und der komplementären *target* RNA ICAM-1-IVT unter Standard-Bedingungen inkubiert und der Umsatz bestimmt (siehe Abschnitt 4.4.1). In Abbildung 5.12 ist die Spaltungsaktivität von NHA-hAgo2, hAgo2-His und GST-hAgo2 gezeigt.

Alle Konstrukte zeigen eine zeitabhängige, sequenzspezifische Spaltung der komplementären *target* RNA, nicht jedoch in Abwesenheit einer *guide* RNA oder in Anwesenheit einer nichtkomplementären *guide* RNA. Die Spaltprodukte weisen eine Länge von 87 nt auf, was einer Spaltung an der kanonischen Stelle, also gegenüber des Phosphatrückgrates zwischen dem 10. und 11. Nukleotid des *guide* Stranges von seinem 5'-Ende aus, entspricht.

Beim Vergleich des maximalen Umsatzes der drei Konstrukte fällt auf, dass hAgo2-His nur 13 – 14 % des maximalen Umsatzes von NHA-hAgo2 bzw. GST-hAgo2 erreicht. Die Rate der Spaltungsreaktion ist bei allen Konstrukten vergleichbar und für ein Enzym unerwartet langsam: hRNase H1 besitzt einen putativ ähnlichen RNA-Spaltungsmechanisums [26] und ist mit einer Geschwindigkeit von 0,05 s^{-1} ca. 100-fach schneller [203]. Da die Konstrukte sich in erster Linie durch die Position ihrer jeweiligen Markierungen unterscheiden, ist zu vermuten, dass diese Einfluss auf die enzymatische Aktivität besitzt. Dabei scheint der Carboxy-Terminus von hAgo2 für die Anfügung zusätzlicher raumfordernder Strukturen ungeeignet zu sein. Da die Ratenkonstanten der Spaltungsreaktion aller drei Konstrukte jedoch vergleichbar sind, scheint die Beeinträchtigung bei hAgo2-His bei einem der eigentlichen Spaltung vorgelagerten Prozess aufzutreten. Hierbei könnte es sich um die Bindung des *guide* Stranges und die Ausbildung eines stabilen binären Komplexes handeln.

Bei wiederholt durchgeführten Spaltungsassays wurde beobachtet, dass der maximale Umsatz von hAgo2 mit einer Lagerungszeit über mehrere Monate kontinuierlich abnimmt. Auf die Ratenkonstanten hat die Lagerung keinen Einfluss. Die in Abbildung 5.12 gezeigten Experimente wurden jeweils zeitnah nach der Präparation der Proteine durchgeführt und lassen deshalb vergleichende Schlüsse zu.



Konstrukt	max. Umsatz (%)	k_{gesamt} (s^{-1})
GST-hAgo2	91,9 (± 2,9)	0,0004 (± 0,00004)
NHA--hAgo2	83,5 (± 5,5)	0,0003 (± 0,00005)
hAgo2-His	12,0 (± 6,9)	0,0002 (± 0,0002)

Abbildung 5.12: Nachweis der Spaltungsaktivität von rekombinantem hAgo2 (siehe Abschnitt 4.4.1). Standard-Spaltungsassay mit 2,4 μM NHA-hAgo2 (A), 2,2 μM hAgo2-His (B) oder 3,7 μM GST-hAgo2 (C) mit anschließender denaturierender PAGE und Detektion mittels Autoradiographie. (D) Bestimmung von maximalem Umsatz und Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion durch die verschiedenen hAgo2-Konstrukte. Der Umsatz wurde gegen die Zeit aufgetragen und die korrespondierende Ratenkonstante k_{gesamt} durch Anpassung der experimentellen Daten an eine exponentielle Gleichung ermittelt. K: Kontroll-Ansatz mit asLam als *guide* RNA. t: Zeit. IVT: ICAM-1 *in vitro* Transkript als *target* RNA.

5.5.3 Einfluss der Temperatur auf die Spaltungsreaktion

Spaltungsexperimente wurden standardmäßig bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Dahingegen fanden die Assoziations- und Dissoziationsstudien bei 25 °C statt (siehe Abschnitte 5.7, 5.8 und 5.10), da Ago2 zur Aggregation neigt [257] und eine niedrigere Temperatur der Bildung von Multimeren entgegenwirkt (siehe Abschnitt 5.5.5). Um zu testen, ob hAgo2 bei 25 °C eine vergleichbare Spaltungsaktivität aufweist, wurde in einem Standard-Assay der *target* RNA-Umsatz durch NHA-hAgo2 bei beiden Temperaturen getestet (siehe Abbildung 5.13).

Es findet bei beiden Temperaturen eine vergleichbare Spaltung der *target* RNA statt. Der maximale Umsatz bei 25 °C ist mit etwa 84 %, verglichen zum maximalen Umsatz bei 37 °C, unwesentlich geringer. Daraus lässt sich ableiten, dass die bei 25 °C beobachteten Assoziations- und Dissoziationsprozesse von hAgo2 und verschiedenen Nukleinsäuren sich nicht wesentlich von den bei 37 °C untersuchten Spaltungsprozessen unterscheiden und eine Kombination der gewonnenen Daten daher zulässig ist.

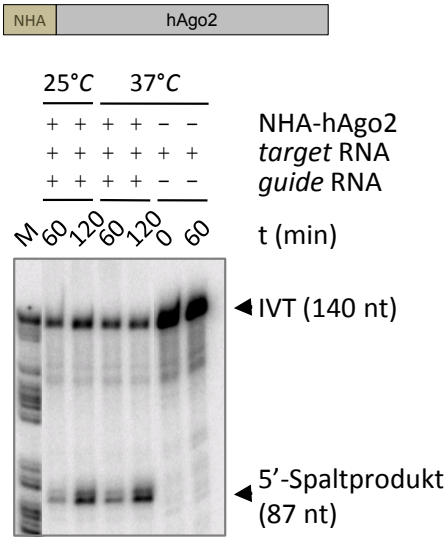


Abbildung 5.13: Spaltungsaktivität von NHA-hAgo2 bei verschiedenen Temperaturen (siehe Abschnitt 4.4.1). Standard-Spaltungsassay mit 2,4 μM NHA-hAgo2 mit anschließender denaturierender PAGE und Detektion mittels Autoradiographie. Zur Abtrennung von Proteinaggregaten erfolgte vor dem Experiment eine Zentrifugation von NHA-hAgo2 bei 4°C und 150.000 × g für 1 h. M: Größenmarker (siehe Abschnitt 4.2.7). t: Zeit. IVT: ICAM-1 *in vitro* Transkript als *target* RNA.

5.5.4 Einfluss der Mg^{2+}-Konzentration auf die Spaltungsreaktion

Die RISC-vermittelte Spaltung von *target* RNA ist als ein Prozess beschrieben, der von divalenten Metallkationen abhängig ist [26, 163]. Für affinitätsgereinigtes hAgo2 konnte von Ameres *et al.* gezeigt werden, dass die Zugabe von EDTA die Spaltung unterbindet. Durch

5 mM $MgCl_2$ wurde die enzymatische Aktivität wiederhergestellt [200]. Rivas *et al.* beobachteten, dass bakteriell exprimiertes, rekombinantes GST-hAgo2 ohne den Zusatz von Mg^{2+} keine Spaltungsaktivität aufweist [62].

Im Folgenden wurde der Einfluss von Mg^{2+} auf die Spaltungsaktivität des hier verwendeten rekombinanten GST-hAgo2 untersucht. Es wurden Standard-Spaltungsansätze in 1 × Ago2-Bindungspuffer gemischt und für 10 min bei 37 °*C* in An- oder Abwesenheit von 1 mM EDTA präinkubiert. Die Spaltung wurde durch Zugabe von $MgCl_2$ in verschiedenen Konzentrationen gestartet (siehe Abbildung 5.14 A und B).

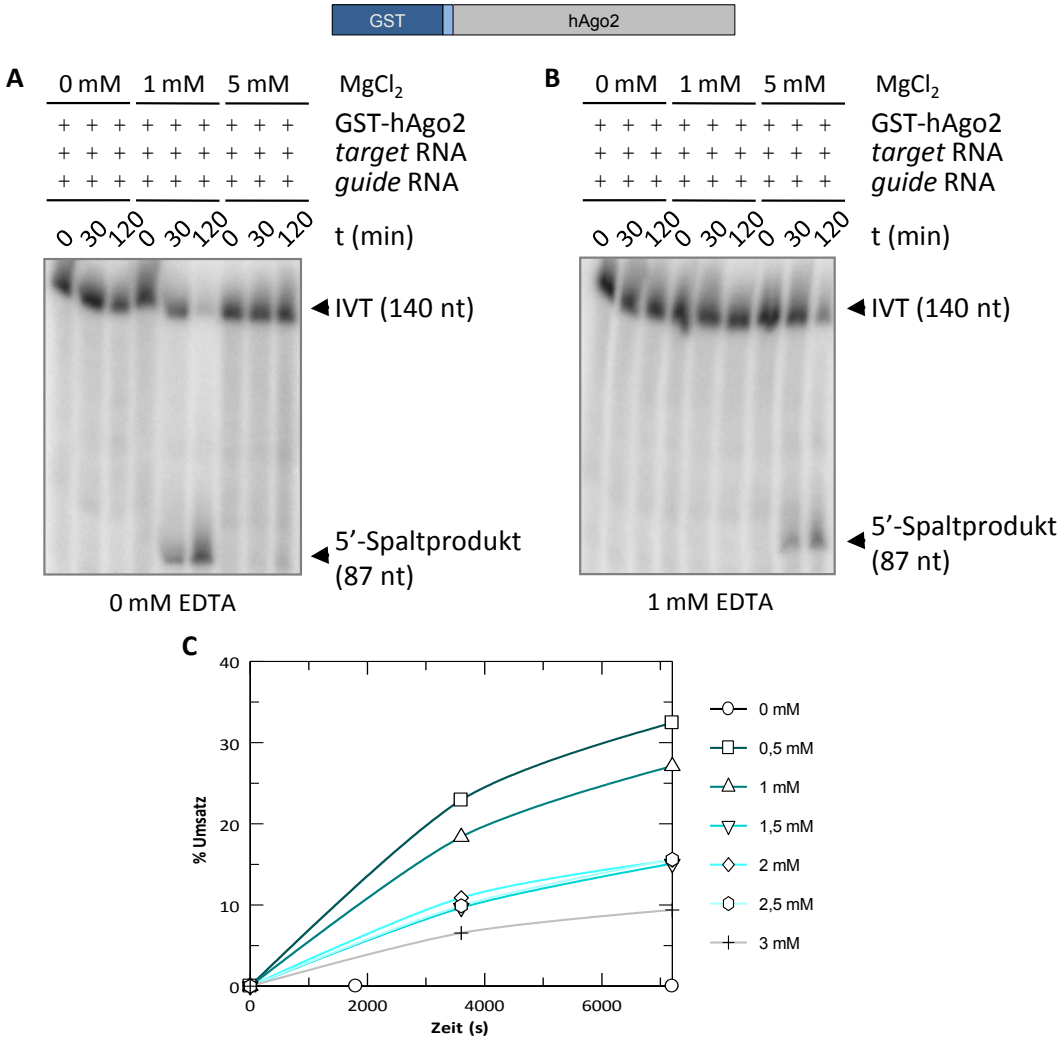


Abbildung 5.14: Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 bei verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen (siehe Abschnitt 4.4.1). Nach einer Präinkubation ohne EDTA (A) oder mit 1 mM EDTA (B) wurde ein Standard-Spaltungsassay mit 3,7 μM GST-hAgo2 mit anschließender denaturierender PAGE durchgeführt und mittels Autoradiographie detektiert. (C) Quantifizierung des maximalen *target* RNA-Umsatzes in Abhängigkeit von verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen. t: Zeit. IVT: ICAM-1 *in vitro* Transkript als *target* RNA.

In beiden Experimenten konnte ohne den Zusatz von $MgCl_2$ keine *target* RNA-Spaltung beobachtet werden. Bei der Präinkubation des Spaltungsansatzes ohne EDTA reichte die Zugabe von 1 mM $MgCl_2$ aus, um eine Spaltung zu induzieren. Bei höheren $MgCl_2$-Konzentrationen war eine Abnahme der Aktivität zu verzeichnen (siehe Abbildung 5.14 A). Im Falle der Präinkubation des Spaltungsansatzes mit 1 mM EDTA reichte die Zugabe von äquimolaren Mengen $MgCl_2$ nicht aus, um die Spaltungsaktivität wieder herzustellen. Erst bei Konzentrationen, die das vorhandene EDTA im Ansatz vollständig sättigten und darüber hinaus noch für GST-hAgo2 zur Verfügung standen, trat ein Spaltprodukt mit der erwarteten Größe auf (siehe Abbildung 5.14 B). Auch in diesem Fall führte die weitere Erhöhung der $MgCl_2$-Konzentration zu einer Inhibition der Spaltung.

In einem weiteren Experiment wurde die optimale $MgCl_2$-Konzentration ermittelt, indem ein Spaltungsansatz in 1 × Ago2-Bindungspuffer für 10 min bei 37 °C präinkubiert und die Spaltung durch Zugabe von 0 – 3 mM $MgCl_2$ induziert wurde. Für jede $MgCl_2$-Konzentration wurde der *target* RNA-Umsatz gegen die Zeit aufgetragen und 0,5 mM $MgCl_2$ als optimale Konzentration für die Induktion der Spaltung bestimmt (siehe Abbildung 5.14 C). Eine unter diesen Bedingungen durchgeführte Spaltungsreaktion läuft mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit ab wie unter Standard-Spaltungsassay-Bedingungen ($k_{\text{gesamt}} = 0{,}0014\,(\pm 0{,}0001)\,s^{-1}$).

5.5.5 Studien zum Oligomerisierungsverhalten von hAgo2

Zwar ist bekannt, das Argonaute Proteine *in vitro* eine Tendenz zur Aggregation besitzen, allerdings wird dieser Umstand in sehr wenigen Publikationen diskutiert [257]. Die damit einhergehenden Probleme sind vielfältig: zunächst ergeben sich Schwierigkeiten für eine effiziente Reinigung (siehe Abschnitt 5.4). Weiterhin kann man davon ausgehen, dass eine massive Proteinaggregation einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat. Allerdings ist nicht bekannt, ob die Bildung von großen Oligomeren eine biologische Relevanz besitzt. Die im Folgenden beschriebenen Experimente zielten auf ein besseres Verständnis der hAgo2-Oligomerisierung *in vitro* ab, um die Lagerung sowie Handhabung von hAgo2 zu optimieren und einen Eindruck zu bekommen, welchen Einfluss die Anwesenheit von Nukleinsäuren besitzt, die mit hAgo2 wechselwirken können.

Untersuchung mittels analytischer Gelfiltration

Erste Erkenntnisse über den Oligomerisierungsgrad von hAgo2 wurden mit Hilfe von analytischer Gelfiltration gewonnen. Dafür wurden die Experimente, die im Rahmen der Reinigung von hAgo2-His und His-hAgo2 bzw. GST-hAgo2 bereits durchgeführt worden waren (siehe Abschnitt 5.4.1 und 5.4.2), herangezogen. Es hatte sich bereits gezeigt, dass hAgo2 teilweise aggregiert vorlag und auf Grund der Komplexgröße keine Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix eingegangen war. Die verwendete Superdex 200 HR10/30 Gelfiltrationssäule besitzt eine Ausschlussgröße von 1.300 kDa. Für die Konstrukte hAgo2-His und His-hAgo2 mit einem

Molekulargewicht von 99,0 bzw. 98,5 kDa ergibt sich also, dass zum Teil Oligomere aus 13 oder mehr hAgo2-Molekülen vorliegen. Beim Konstrukt GST-hAgo2 hatte sich ein ähnliches Bild gezeigt. Es besitzt ein Molekulargewicht von 124,3 kDa, woraus sich errechnen lässt, dass die sich im Ausschlussvolumen befindlichen Proteinmultimere mindestens zehn Monomere umfassen.

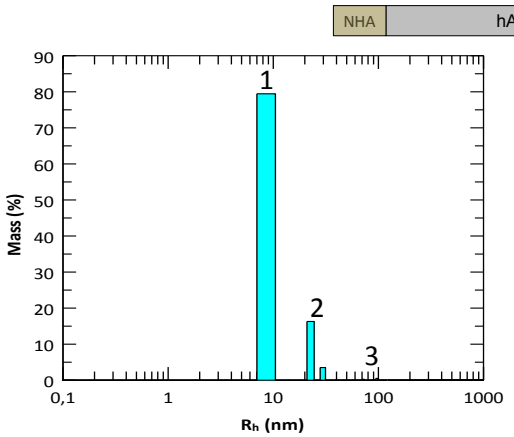
Mit Hilfe von analytischer Gelfiltration lässt sich jedoch nur näherungsweise bestimmen, welche hAgo2-Populationen vorliegen. Eine genaue Aussage über den Oligomerisierungsgrad (Monomere bzw. verschiedene Oligo- bis Multimere) ist nicht machbar. Weiterhin kann mit dieser Methode nicht bestimmt werden, welche Population welchen Anteil der Gesamtproteinmenge ausmachen.

Untersuchung mittels Dynamischer Lichtstreuung

Nachdem eine Untersuchung mittels analytischer Gelfiltration nur eine vage Aussage über die hAgo2-Populationen und deren Zusammensetzung in einer Lösung zulässt, wurden im Folgenden mit Hilfe von Dynamischer Lichtstreuung detaillierte Studien mit dem Konstrukt NHA-hAgo2 durchgeführt. Dabei wurden hauptsächlich durch zwei Größen Informationen über die Proteinlösung gewonnen. Zum Einen konnten über ein Regularisierungs-Histogramm die verschiedenen Populationen in der hAgo2-Lösung auf Grund ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Radien ermittelt und ihr Anteil an der Gesamtmasse sowie ihre Polydispersität bestimmt werden. Dies diente beispielsweise der Identifikation einer enzymatisch aktiven Population. Zum anderen wurde der durchschnittliche hydrodynamische Radius aller Populationen in einer Messung ermittelt und die Veränderung durch diverse Faktoren beobachtet. Hierüber ließen sich Aussagen über das Aggregationsverhalten von hAgo2 in Abhängigkeit von Pufferbestandteilen, Inkubationszeiten und -temperaturen und den Einfluss von Nukleinsäuren beobachten.

Zunächst wurde der Oligomerisierungsgrad von NHA-hAgo2 in seinem Lagerpuffer (siehe Abschnitt 4.3.8) untersucht. Unter der Annahme, dass hAgo2 ein globuläres Protein ist, beträgt sein berechneter hydrodynamischer Radius 4,3 nm. Abweichungen von diesem idealen Wert sind bei DLS-Messungen jedoch nicht ungewöhnlich. So beträgt der berechnete hydrodynamische Radius von BSA 3,6 nm und konnte experimentell auf 2,8 – 3,5 nm bestimmt werden. Abbildung 5.15 zeigt ein typisches Regularisierungs-Histogramm einer NHA-hAgo2-Lösung.

In der Lösung zeigen sich innerhalb des Messbereiches der DLS-Apparatur von 1 – 1000 nm drei individuelle Populationen, wobei alle als gering polydispers eingestuft werden können. Population 1 hat mit 79,4 % den größten Anteil an der Gesamtproteinmenge und kann durch den hydrodynamischen Radius von 7,6 nm als vermutlich mono- bis tetramer identifiziert werden. Bei den anderen beiden Populationen handelt es sich wahrscheinlich um größere Aggregate. Neben diesen drei Signalen können zwei weitere verzeichnet werden, die jedoch außerhalb des verlässlichen Messbereiches der DLS-Apparatur liegen. Ein Signal mit einem hydrodynami-



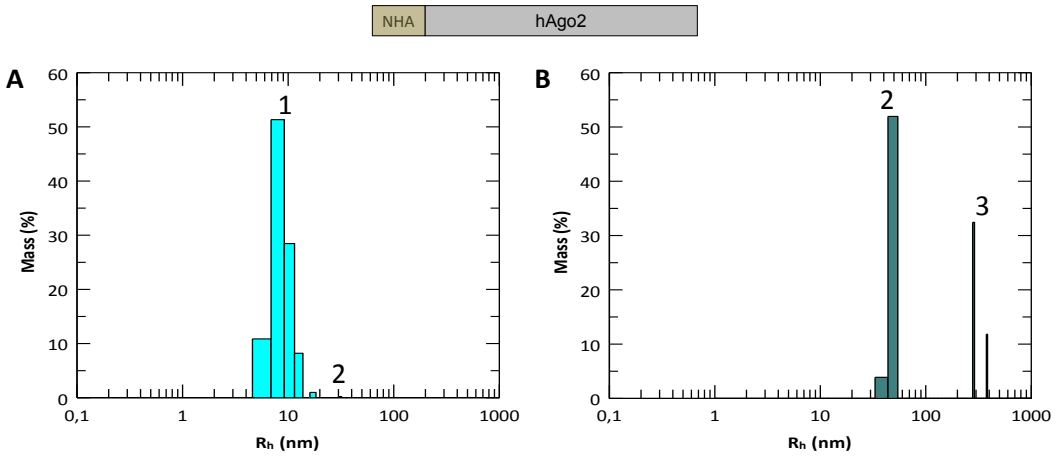
Population	R_h (nm)	Pd (%)	MW-R (kDa)	Mass (%)
1	7,6	0,0	391	79,4
2	24,7	11,7	6099	19,8
3	89,5	15,2	124022	0,8

Abbildung 5.15: Regularisierungs-Histogramm der Dynamischen Lichtstreuung durch 24,1 μM NHA-hAgo2 in Rückfaltungspuffer (siehe Abschnitt 4.4.5). Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt. Die unterschiedliche Breite der Balken im Histogramm erklärt sich durch die logarithmische Abszissenachse. Mass: Massenanteil. R_h: hydrodynamischer Radius. Pd: Polydispersität. MW-R: auf Grundlage von R_h berechnetes Molekulargewicht.

schen Radius kleiner als 1 nm konnte durch eine Kontrollmessung mit Puffer als von einem Lösungsmittelbestandteil verursacht identifiziert werden. Alle Signale außerhalb des Messbereiches wurden als Artefakte gewertet.

Für die Separation der beobachteten Spezies wurde eine fraktionierte Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3.000 – 20.000 × g durchgeführt und die gewonnenen Überstände analysiert. Es zeigte sich bei allen Ansätzen ein ähnliches Bild, weshalb die Zentrifugation bei 150.000 × g für 1 h wiederholt wurde, um Bestandteile, die größer als 50 nm sind, zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment im gleichen Volumen Rückfaltungspuffer vorsichtig resuspendiert, um die Zusammensetzung der Populationen nicht zu verändern. Aggregate konnten erfolgreich abgetrennt und Population 1 isoliert werden (siehe Abbildung 5.16). Die Bestimmung der Proteinkonzentration in beiden Fraktionen mittels NI Assay zeigte, dass durch die Zentrifugation etwa 20 % der Gesamtproteinmenge sedimentiert wurde. Dies entspricht dem Massenanteil von Populationen 2 und 3 (siehe Abbildung 5.15). Das im Überstand enthaltene NHA-hAgo2 wurde einem Standard-Spaltungsassay unterzogen und zeigte die kanonische sequenzspezifische Spaltungsaktivität (siehe Abbildung 5.13). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Population 1 um diejenige Fraktion handelt, die enzymatisch aktives hAgo2 enthält.

Population 1 war über mehrere Wochen bei 4 °C lagerfähig, ohne dass es zur Bildung weiterer Populationen in der Lösung kam. Auch eine Inkubation bei Raumtemperatur über mehrere Stunden führte nicht zur Aggregatbildung, im Gegensatz zur Inkubation auf Eis. Für einen Zeitraum von 15 min blieb der Massenanteil von Population 1 konstant. Nach einer Stunde allerdings nahm der entsprechende Anteil um 15 % ab.



Population	R_h (nm)	Pd (%)	MW-R (kDa)	Mass (%)
1	8,7	24,8	531	99,8
2	30,9	0,0	10302	0,2

Population	R_h (nm)	Pd (%)	MW-R (kDa)	Mass (%)
2	53,1	6,3	36652	55,8
3	314,4	13,1	2348440	44,2

Abbildung 5.16: Regularisierungs-Histogramm der Dynamischen Lichtstreuung isolierter Populationen von NHA-hAgo (siehe Abschnitt 4.4.5). Überstand (A) und resuspendiertes Sediment (B) nach Zentrifugation einer 24,1 μM Lösung NHA-hAgo2 in Rückfaltungspuffer. Die Messung wurde bei 25 $°C$ durchgeführt. Die unterschiedliche Breite der Balken im Histogramm erklärt sich durch die logarithmische Abszissenachse. Mass: Massenanteil. R_h: hydrodynamischer Radius. Pd: Polydispersität. MW-R: auf Grundlage von R_h berechnetes Molekulargewicht.

Bei Verdünnung von NHA-hAgo2 in Ago2-Spaltungspuffer war ebenfalls die Bildung großer Aggregate in einem Zeitraum von wenigen Minuten beobachtbar. Diese Erkenntnis warf die Frage auf, inwieweit es während der Durchführung eines Spaltungsassays zur Aggregation und damit eventuell zur Inaktivierung von hAgo2 kommt. Deshalb wurde zunächst die Thermostabilität von NHA-hAgo2 untersucht. Hierfür wurde eine Proteinlösung in Rückfaltungspuffer schrittweise erwärmt und die Zunahme der durchschnittlichen Radien aller Populationen beobachtet (siehe Abbildung 5.17 A). Es zeigte sich, dass die Zusammensetzung der hAgo2-Populationen über einen Temperaturbereich von $4-30\,°C$ stabil ist; darüber hinaus kommt es zu einer Zunahme der durchschnittlichen Radien um ca. das Zweifache bei $50\,°C$. Dies deutet auf eine temperaturinduzierbare Proteinaggregation hin.

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation von NHA-hAgo2 mit *guide* RNA und nichtradioaktiv markierter *target* RNA, analog zu einem Standard-Spaltungsassay, bei $4\,°C$, $25\,°C$ und $37\,°C$. Die Dynamische Lichtstreuung wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min aufgezeichnet (siehe Abbildung 5.17 B). Während es bei $4\,°C$ und $25\,°C$ über die Zeit zu keiner wesentlichen Veränderung der durchschnittlichen Radiengröße kam, konnte bei der Inkubation aller essentiellen Spaltungsassaykomponenten bei $37\,°C$ eine zeitabhängige Zunahme verzeichnet werden.

Die Regularisierungs-Histogramme zeigten bei allen drei Temperaturen eine Verschiebung

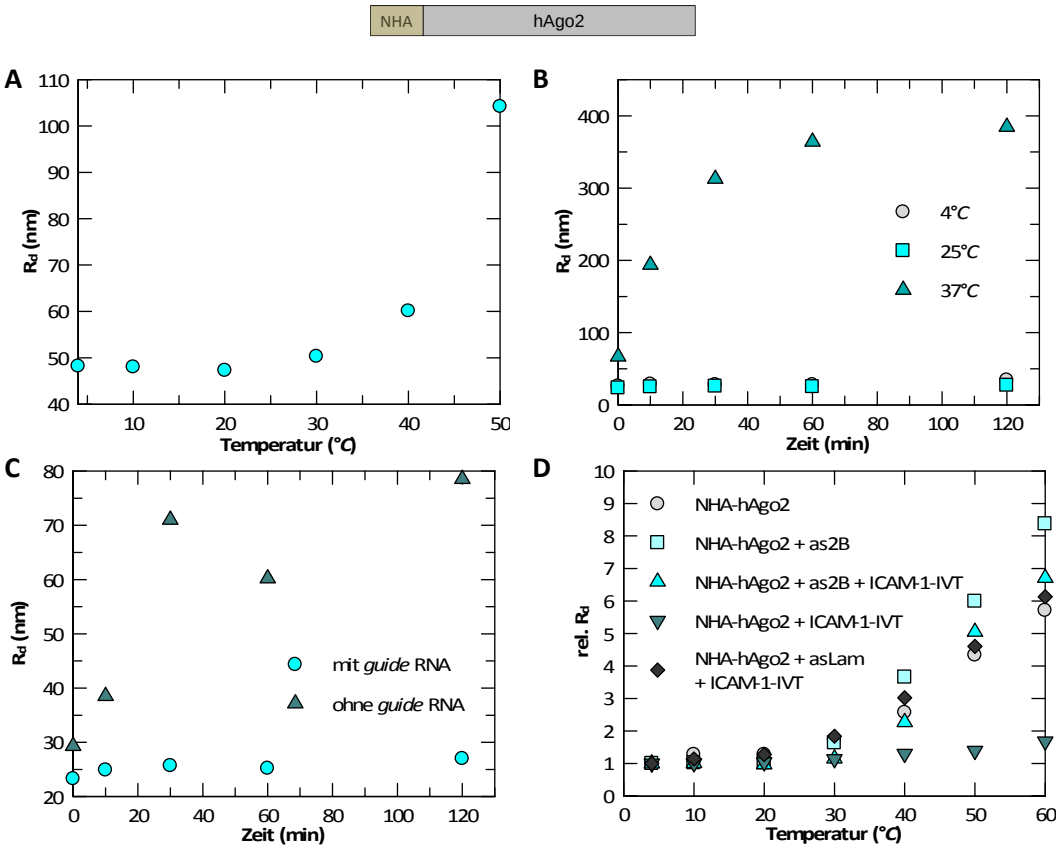


Abbildung 5.17: Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von enzymatisch aktivem NHA-hAgo2 (siehe Abschnitt 4.4.5). (A) Durchschnittliche Radien von NHA-hAgo2-Populationen einer 24,1 μM Lösung in Rückfaltungspuffer in Abhängigkeit der Temperatur. (B) Durchschnittliche Radien der Populationen in Standard-Spaltungsassay-Ansätzen bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit der Zeit. (C) Durchschnittliche Radien der Populationen in Standard-Spaltungsassay-Ansätzen bei 25 °C in An- und Abwesenheit von *guide* RNA in Abhängigkeit der Zeit. (D) Relative durchschnittliche Radien der Populationen in Standard-Spaltungsassay-Ansätzen verschiedener Zusammensetzung in Abhängigkeit der Temperatur. R_d: durchschnittlicher Radius.

von Population 1 zu größeren Radien von 17,2 – 21,4 nm (Population 1*). Vermutlich stellt diese größere Population den enzymatisch aktiven Komplex dar, da sie in Abwesenheit von *guide* und *target* RNA nicht zu beobachten war. Der Massenanteil von Population 1* betrug 93,2 – 99,8 %, war also größer als derjenige von Population 1. Dies deutet darauf hin, dass die Zusammenssetzung der NHA-hAgo2-Lösung auf einem dynamischen Gleichgewicht beruht und Proteine aus multimeren Komplexen diffundieren, die daraufhin für RNAi zur Verfügung stehen.

Es wurde eine weitere Inkubation von NHA-hAgo2 und *target* RNA unter Bedingungen eines Standard-Spaltungsassays bei 25 °C in An- bzw. Abwesenheit der *guide* RNA durchgeführt. Abbildung 5.17 C zeigt, dass in Anwesenheit der *guide* RNA die Zusammensetzung der Populationen stabil bleibt, wohingegen es in Abwesenheit von *guide* RNA über die Zeit zu ei-

ner Zunahme der durchschnittlichen Radien kommt. Daher sind enzymatisch aktive Komplexe scheinbar besser vor Aggregation geschützt als nicht aktive Komplexe.

In einem letzten Satz von Experimenten wurde die Bildung von Aggregaten in Standard-Spaltungsassay-Ansätzen bzw. in verschiedenen Kontrollen durch die Erhöhung der Temperatur induziert und die Zunahme der durchschnittlichen Radien beobachtet (siehe Abbildung 5.17 D). Wie bereits zuvor gezeigt, kam es zur Aggregatbildung in einem Kontrollansatz, der nur NHA-hAgo2 enthielt. Anders als bei einer konstanten Temperatur werden aktive Komplexe nicht vor Aggregation geschützt; die Zunahme der durchschnittlichen Radien erfolgte beim Ansatz mit as2B und ICAM-1-IVT etwa im gleichen Maß wie bei den Kontrollen ohne *guide* RNA bzw. der nicht-komplementären *guide* RNA asLam. Allerdings führte die Anwesenheit der *target* RNA allein zu einem fast vollständigen Schutz vor temperaturinduzierter Aggregation von NHA-hAgo2.

5.6 Biochemische Charakterisierung von rekombinantem hTRBP [4]

5.6.1 Untersuchung der Präparation auf Nuklease-Verunreinigungen und proteingebundene Nukleinsäuren

Beide hTRBP-His-Präparationen wurden auf eine mögliche Kontamination mit Nukleasen getestet (siehe Abschnitt 4.3.10). Es zeigte sich, dass bei der ersten Präparation eine leichte Kontamination vorhanden war, die sich bei niedrigen Proteinkonzentrationen jedoch nicht bemerkbar machte. Das bei dieser Reinigung gewonnene hTRBP-His wurde für die Charakterisierung der Nukleinsäurebindung durch Gelverzögerungs-Analysen sowie Studien zum Oligomerisierungsverhalten von hTRBP verwendet. Die zweite Präparation wies eine stärkere RNase-Kontamination auf. Protein dieser Reinigung wurde für Experimente eingesetzt, deren Dauer so kurz war, dass die Kontamination vernachlässigbar war. In jedem Fall wurden Inkubationszeiten so kurz wie möglich gehalten sowie bei Bedarf die Experimente unter Verwendung von RNase-Inhibitoren durchgeführt.

Da hTRBP die Fähigkeit besitzt, Nukleinsäuren zu binden, sollte weiterhin ausgeschlossen werden, dass das bakteriell exprimierte hTRBP-His an Nukleinsäuren gebunden vorlag, die bei der Reinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen nicht entfernt worden waren. Das Verhältnis der Absorption $A_{260\ \mathrm{nm}}/A_{280\ \mathrm{nm}}$ zeigte kein eindeutiges Ergebnis bezüglich einer Nukleinsäurekontamination, da hTRBP-His ein unüblich kleines Absorptionsmaximum von weniger als 270 nm besitzt. Deshalb wurde das gereinigte hTRBP-His mittels denaturierender 12 % SDS-PAGE analysiert. Die Detektion erfolgte in drei Alternativen: mittels Coomassie-Färbung können ausschließlich Proteine, durch Silbernitrat-Färbung Proteine sowie Nuklein-

[4] Die in Abschnitt 5.6 beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit J. Blank im Rahmen der Betreuung ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

säuren und durch SYBR® Gold-Färbung nur Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der entsprechenden Färbemethoden konnten nur von Proteinen verursachte Banden im SDS-Gel detektiert werden. Eine Nukleinsäurekontamination lag nicht vor.

5.6.2 Überprüfung der Nukleinsäurebindung mittels Gelverzögerungs-Analysen

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung von hTRBP-His sollte überprüft werden, ob es seine intrinsische Aktivität besitzt, also zur Bindung an doppelsträngige RNA fähig ist. Zu diesem Zweck wurden Gelverzögerungs-Analysen mit doppel- bzw. einzelsträngiger siRNA durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.4). Neben der qualitativen Aussage bietet diese Methode den Vorteil, dass sich eine apparente Dissoziationskonstante ($K_{\mathrm{d,app}}$) bestimmen lässt. Sie diente als Richtwert für die spätere Messung des K_{d} mittels Gleichgewichts-Fluoreszenzspektroskopie (siehe Abschnitt 5.11.1).

Abbildung 5.18 A zeigt die konzentrationsabhängige Bildung verschiedener hTRBP-His/ siRNA-Komplexe in Form von mehreren distinkten Banden sowie ein Fluoreszenzsignal in den Taschen des Gels. Es wurde bereits durch Gredell *et al.* gezeigt, dass hTRBP bei der Bindung des doppelsträngigen RNA-Substrates TAR sowie bei Bindung von siRNA in Gelverzögerungs-Analysen in verschiedenen oligomeren Zuständen vorliegt (vermutlich als Monomer, Dimer, Tetramer und in großen Komplexen) [237]. Das Fluoreszenzsignal in den Geltaschen deutet auf die Bildung von Komplexen hin, deren Größe die Porenweite des Gels überschreitet und sie deshalb nicht quantitativ, sondern nur in Form eines Schmiers knapp unterhalb der Tasche einlaufen können. In einem alternativen Experiment wurde hTRBP-His vor der Inkubation mit Nukleinsäure für 1 h bei 20.000 × g oder 150.000 × g und 4 °C zentrifugiert, um aggregiertes Protein zu sedimentieren. In beiden Fällen wurden die gleichen großen Komplexe in den Geltaschen beobachtet.

Die Bindung doppelsträngiger siRNA durch hTRBP-His ist sättigbar, da das Substrat sich durch steigende Konzentrationen einer nichtmarkierten, kompetierenden siRNA aus einem Komplex mit hTRBP-His verdrängen lässt (siehe Abbildung 5.18 B). Einzelsträngige *guide* RNA wird durch hTRBP-His mit deutlich geringerer Affinität gebunden als doppelsträngige siRNA. Es kommt nur zur Bildung weniger großer Komplexe, die zum Großteil nicht in das Gel einlaufen können (siehe Abbildung 5.18 C).

In allen drei Experimenten fällt die bei zunehmender Proteinkonzentration verstärkt auftretende Degradation der RNA auf. Sie wird auf die Nukleasekontamination in der hTRBP-His-Präparation zurückgeführt und ließ sich auch durch den Einsatz verschiedener RNase-Inhibitoren nicht vollständig verhindern. Allerdings lässt die Tatsache, dass einzelsträngige RNA deutlich stärker abgebaut wird als doppelsträngige, den Schluss zu, dass die Bindung an hTRBP-His einen schützenden Einfluss vor Degradation besitzt.

Nach der Quantifizierung des gebundenen RNA-Anteils und der Auftragung gegen die

hTRBP-His-Konzentration wurden die Daten an eine quadratische Gleichung angepasst (siehe Abbildung 5.18 D und E). Für die Bindung von hTRBP-His an si2B-FAM wurde eine apparente Dissoziationskonstante von 120 nM ermittelt. Yamashita *et al.* konnten die Affinität von hTRBP für siRNA durch isothermale Titrationskalorimetrie im subnanomolaren

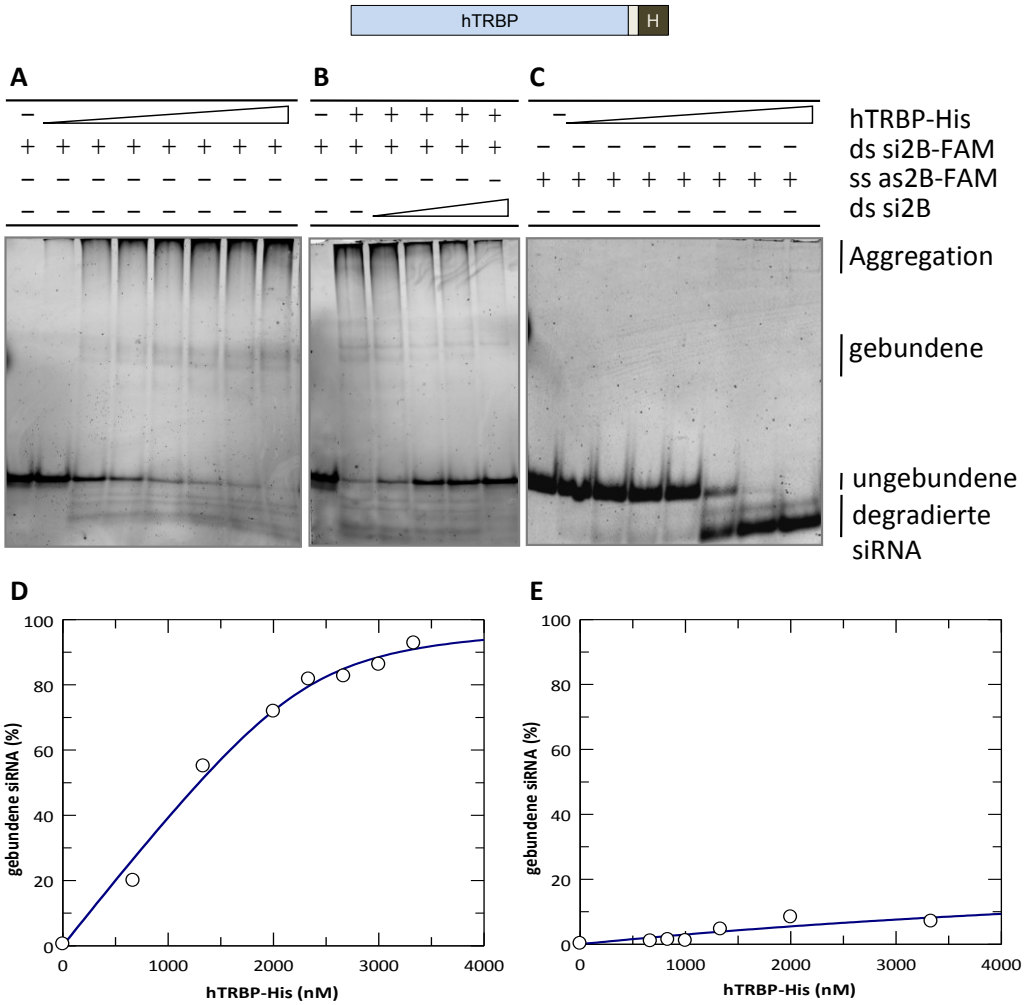


Abbildung 5.18: Untersuchungen zur Nukleinsäurebindung durch hTRBP-His mittels Gelverzögerungs-Analysen (siehe Abschnitt 4.4.4). (A) Nicht-denaturierendes 4 – 20 % PAA-Gradientengel zur Auftrennung von Ansätzen mit konstanter Konzentration fluoreszenzmarkierter si2B-FAM und steigender Konzentration von hTRBP-His. (B) Nicht-denaturierendes 4 – 20 % PAA-Gradientengel zur Auftrennung von Ansätzen mit konstanter Konzentration fluoreszenzmarkierter si2B-FAM sowie konstanter Konzentration hTRBP-His mit steigender Konzentration unmarkierter kompetierender si2B. (C) Nicht-denaturierendes 8 % PAA-Gel zur Auftrennung von Ansätzen mit konstanter Konzentration fluoreszenzmarkierter as2B-FAM und steigender Konzentration von hTRBP-His. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mit Hilfe des PhosphorImagers Typhoon™ 8600. Der Anteil gebundener si2B-FAM (D) bzw. as2B-FAM (E) wurde gegen die Konzentration von hTRBP-His aufgetragen und die experimentellen Daten an eine quadratische Gleichung angepasst. Für si2B-FAM ergab sich $K_{\mathrm{d,app}} = 120\,(\pm\,45)$ nM. Für as2B-FAM konnte keine apparente Dissoziationskonstante ermittelt werden.

Bereich bestimmen [204]. Chakravarthy *et al.* ermittelten Dissoziationskonstanten mittels Filterbindungsexperimenten, die ebenfalls im subnanomolaren Bereich lagen [258]. Da bei den verwendeten Methoden auf eine Markierung des Substrates verzichtet werden kann, liegt der Schluss nahe, dass die Fluoreszenzmarkierung in den hier durchgeführten Experimenten einen Einfluss auf die Bindung besitzt. Für die Bindung einzelsträngiger *guide* RNA lässt sich kein eindeutiger Wert angeben. Allerdings kann man näherungsweise davon ausgehen, dass der K_{d} mindestens $50\times$ größer ist.

Die gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass mit dem etablierten Reinigungsprotokoll (siehe Abschnitt 5.4.3) korrekt gefaltetes hTRBP-His gewonnen wurde, das für funktionelle Studien eingesetzt werden kann.

5.6.3 Studien zum Oligomerisierungsverhalten von hTRBP-His

Die Gelverzögerungs-Analysen zeigten, dass hTRBP-His in verschiedenen multimeren Zuständen Komplexe mit siRNA bildet. Dabei traten vor allem große Komplexe auf, die nicht ins Gel einwandern konnten. Im Folgenden wurde das Oligomerisierungsverhalten von hTRBP-His in Lösung näher untersucht. Dabei wurde auch der Einfluss einer siRNA auf die Bildung großer Multimere hinterfragt.

Untersuchung mittels analytischer Gelfiltration

Für diese Untersuchungen wurden Experimente, wie unter Abschnitt 4.4.5 beschrieben, durchgeführt. Mit Hilfe einer Eichgeraden, die durch Verwendung eines Gelfiltrationsstandards erstellt worden war (siehe Abschnitt 5.4.1), konnten die erwarteten Retentionszeiten für hTRBP-His-Monomere, -Dimere und -Tetramere berechnet werden (siehe Abbildung 5.19 A).

Zunächst wurden 152 μg hTRBP-His auf die Superdex 200 HR10/30 Gelfiltrationssäule geladen und die Absorption bei 260 nm und 280 nm in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Das Chromatogramm zeigt eine prominente Absorptionsänderung bei $t_{\mathrm{R}} = 16{,}2$ min (siehe Abbildung 5.19 B). Wie bereits unter Abschnitt 5.5.5 ausgeführt, repräsentiert dieses Absorptionsmaximum aller Wahrscheinlichkeit nach Multimere mit einem Molekulargewicht von über 1.300 kDa, also mindestens 30 hTRBP-His-Moleküle des Molekulargewichts 40,4 kDa. Die Positionen, an denen mono-, di- bzw. tetrameres Protein basierend auf den Berechnungen mit der Eichgeraden von der Säule eluieren würde, sind dargestellt. Durch eine Kontrolle mit dem Lagerpuffer von hTRBP-His konnte das Absorptionsmaximum D als von einem Pufferbestandteil verursacht zugeordnet werden.

Die Eluate wurden in Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Um auch hTRBP-His geringerer Konzentration durch Coomassie-Färbung detektieren zu können, wurden die Fraktionen mit Absorptionsmaxima kleiner 0,02 relativen Einheiten zuvor quantitativ durch TCA gefällt. In den Fraktionen A, B und C konnte hTRBP-His nachgewiesen werden, wobei die Höhe der Absorptionsmaxima mit der Intensität der Proteinbanden korreliert. Die

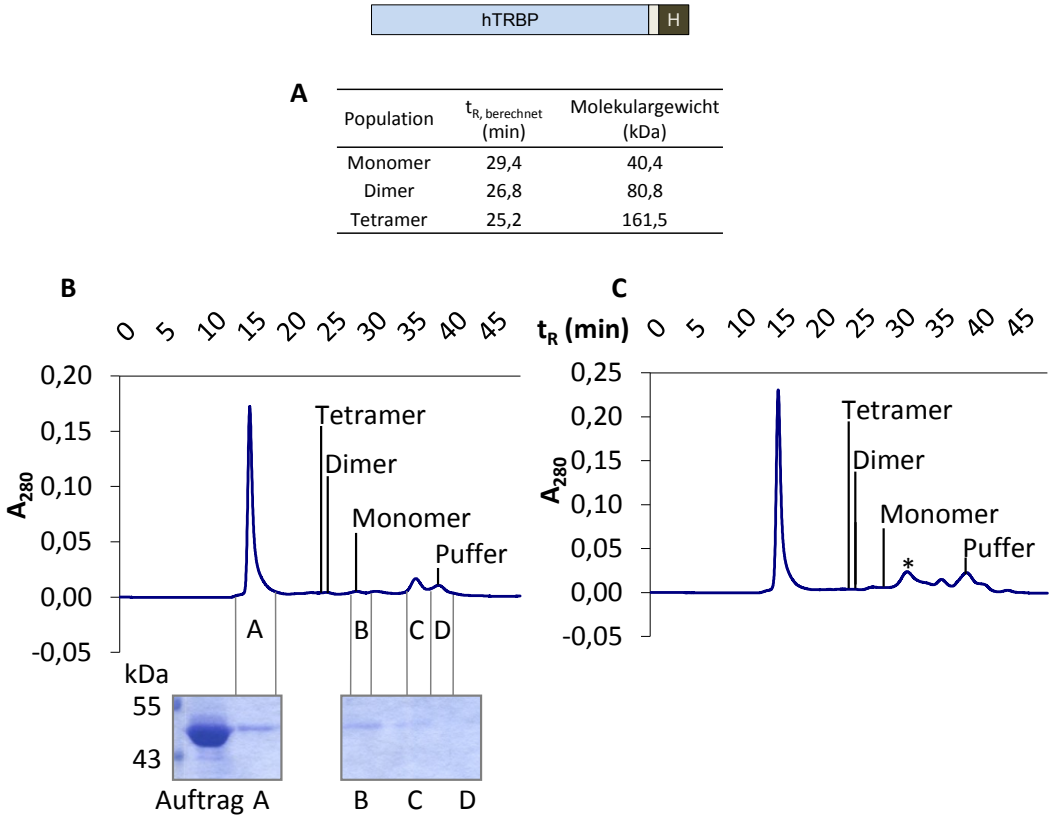


Abbildung 5.19: Analyse des Oligomerisierungszustandes von hTRBP-His in An- bzw. Abwesenheit von siRNA mittels analytischer Gelfiltration (siehe Abschnitt 4.4.5). (A) Übersicht über die erwarteten Retentionszeiten verschiedener hTRBP-His-Populationen. (B) Chromatogramm von hTRBP-His sowie SDS-PAGE-Analyse einzelner Fraktionen. Fraktionen B, C und D wurden quantitativ durch TCA gefällt. Die Detektion erfolgte durch Coomassie-Färbung. (C) Chromatogramm von hTRBP-His im Komplex mit si2B. Die Absorption wurde auf eine einheitliche Proteinkonzentration normiert. t_R: Retentionszeit. A – D: Fraktionen. *: vermutlich durch ungebundene si2B verursachtes Absorptionsmaximum.

Fraktion D, dessen Signal von Pufferbestandteilen verursacht wurde, enthält hingegen keine nachweisbaren hTRBP-His-Mengen (siehe Abbildung 5.19 B). Dies lässt erkennen, dass der größte Teil von hTRBP-His in Lösung in Form von großen multimeren Komplexen vorliegt.

Um den Einfluss einer siRNA auf den Oligomerisierungsgrad von hTRBP-His zu untersuchen, wurde das Gelfiltrationsexperiment mit 19,4 μM Protein wiederholt (entspricht 87 μg), das zuvor mit 4,8 μM si2B für 10 min bei 25 $°C$ inkubiert worden war. Bei diesem Protein-siRNA-Verhältnis liegt etwa 90 % des Substrates komplexiert vor, wie Gelverzögerungs-Analysen zeigten (siehe Abschnitt 5.6.2). Ein Vergleich von Abbildung 5.19 B und C zeigt, dass sich das Chromatogramm von hTRBP-His im Komplex mit si2B nicht wesentlich von demjenigen ohne si2B unterscheidt. Es ist nur ein zusätzliches Absorptionsmaximum geringer Höhe bei $t_R = 32$ min erkennbar (*). Der Quotient von A_{260}/A_{280} beträgt 2,4, was darauf schließen lässt, dass dieses Signal vermutlich durch ungebundene si2B verursacht wird. Die Ergebnisse

der Gelverzögerungs-Analysen und der Vergleich der Chromatogramme von hTRBP-His allein oder im Komplex mit siRNA implizieren demnach, dass die Substratbindung durch multimeres hTRBP-His erfolgen kann.

Untersuchung mittels Fraktionierung und SDS-PAGE

Um nähere Informationen über die Zusammensetzung der hTRBP-His-Lösung sowie die Größe und den Anteil der einzelnen Populationen zu erhalten, wurde eine Fraktionierung durch Zentrifugation vorgenommen wie unter Abschnitt 4.4.5 beschrieben.

Auf Grund der unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten der Populationen werden bei einer Zentrifugation mit 20.000 × g Multimere mit einem Radius größer 250 nm sedimentiert; kleinere Multimere verbleiben im Überstand. Wenn man eine Zentrifugalkraft von 150.000 × g anlegt, kommt es zur Sedimentation aller Multimere mit einem Radius größer 50 nm. Die Überstände wurden abgenommen und die Sedimente im adäquaten Volumen Ladepuffer für SDS-PAGE gelöst. Die Analyse aller Fraktionen erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung. Die Banden wurden quantifiziert und daraus die Größe der Populationen sowie deren Verteilung abgeschätzt (siehe Abbildung 5.20).

Es zeigt sich, dass ca. ein Drittel der hTRBP-His-Moleküle in Populationen vorliegen, deren Radien 250 nm überschreiten. Diesen Anteil kann man als aggregiert betrachten und ob er funktionelles hTRBP-His beinhaltet, ist fraglich. Ein Viertel der Populationen haben einen Radius kleiner als 50 nm. Eventuell bildet Protein aus dieser Fraktion mit siRNA Komplexe, die in Gelverzögerungs-Analysen als distinkte Banden erkennbar sind (siehe Abbildung 5.18 A). Diejenigen Komplexe, deren Größe die Porenweite des nicht-denaturierenden PAA-Gels überschreiten, werden möglicherweise unter Verwendung der dritten Population gebildet, deren Radien im Bereich von 50 – 250 nm liegen.

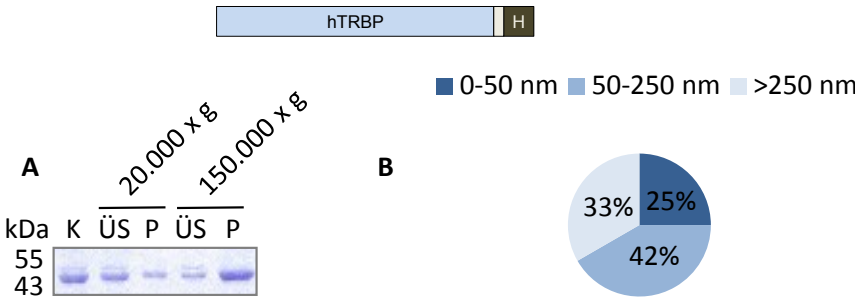
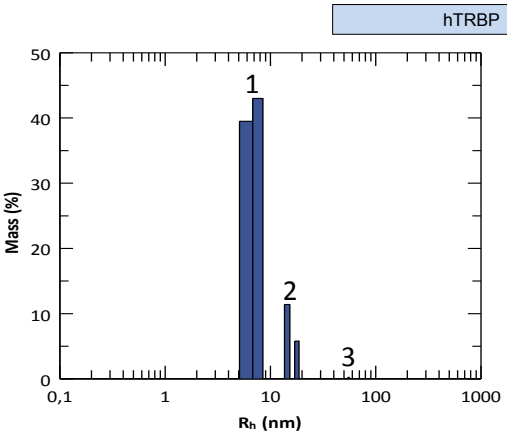


Abbildung 5.20: Zusammensetzung einer 12,14μM hTRBP-His-Lösung (siehe Abschnitt 4.4.5). (A) SDS-PAGE-Analyse einer hTRBP-His-Lösung vor Zentrifugation (K) sowie jeweils Überstand (ÜS) und solubilisiertes Sediment (P) nach Zentrifugation für 1 h bei 4 °C und 20.000 × g bzw. 150.000 × g. Detektion mittels Coomassie-Färbung. (B) Darstellung des prozentualen Anteils an Populationen mit einem Radius kleiner 50 nm, 50 – 250 nm und größer 250 nm.

Untersuchung mittels Dynamischer Lichtstreuung

Für eine weiterführende Analyse des Oligomerisierungszustandes von hTRBP-His in Lösung wurde die Dynamische Lichtstreuung gemessen. Bei dieser Art von Messung tragen große Partikel übermäßig zur Erzeugung des Signals bei, wobei der Anteil am Gesamtsignal nicht mit dem Anteil an der Gesamtmasse der Lösung korreliert. Das bedeutet, dass bereits die Anwesenheit weniger sehr großer Partikel wie Proteinaggregate die Auflösung im Bereich von 1 – 100 nm beeinflussen können. Dieses Problem trat bei der Messung mit der hTRBP-His-Lösung auf. Eine Zentrifugation bei 20.000 × g war nicht ausreichend, um alle störenden Aggregate zu entfernen und ein Histogramm mit zufriedenstellender Auflösung zu erhalten. Erst durch Zentrifugation bei 150.000 × g für 1 h konnten Daten gewonnen werden, die Rückschlüsse auf den Oligomerisierungsgrad von hTRBP-His in einer 12,14 μM Lösung zulassen (siehe Abbildung 5.21).

Für ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 40,4 kDa beträgt der berechnete hydrodynamische Radius 2,9 nm. Das Regularisierungs-Histogramm von hTRBP-His zeigt drei distinkte Populationen. Population 1 entspricht am ehesten dem berechneten hydrodynamischen Radius von monomerem hTRBP-His und könnte deshalb eine mono- oder dimere Spezies repräsentieren. Sie macht mit 82,2 % den größten Massenanteil nach der Abtrennung großer Aggregate durch Zentrifguation aus. Population 2 könnte entsprechend eine Spezies repräsentieren, deren Radius etwa doppelt so groß ist wie bei Population 1, also Di- oder Tetrameren entsprechen. Population 3 ist mit 0,3 % nur zu einem geringen Teil vertreten. Diese Ergebnisse sind konsistent mit früheren Beobachtungen, nach denen hTRBP *in vivo* [225] und *in vitro* [256] Homodimere bilden kann. Weiterhin konnten Yamashita *et al.* zeigen, dass der



Population	R_h (nm)	Pd (%)	MW-R (kDa)	Mass (%)
1	6,9	13,8	310	82,5
2	15,2	13,8	1956	17,2
3	57,7	10,3	44482	0,3

Abbildung 5.21: Regularisierungs-Histogramm der Dynamischen Lichtstreuung durch 12,14 μM hTRBP-His in Lagerpuffer (siehe Abschnitt 4.4.5). Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt. Die unterschiedliche Breite der Balken im Histogramm erklärt sich durch die logarithmische Abszissenachse. Mass: Massenanteil. R_h: hydrodynamischer Radius. Pd: Polydispersität. MW-R: auf Grundlage von R_h berechnetes Molekulargewicht.

Oligomerisierungszustand von hTRBP abhängig von seiner Konzentration ist [204]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass hTRBP-His scheinbar in mono- und multimeren Zuständen in Lösung vorliegt. Interessanterweise scheint seine siRNA-Bindungseigenschaft weitgehend unabhängig von der Größe dieser Proteinkomplexe zu sein.

5.7 Charakterisierung der siRNA-Bindung durch hAgo2

5.7.1 Auswahl geeigneter siRNA-Substrate

Bei der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz kommt es initial zur Bildung eines Komplexes, der minimal aus Argonaute2 und einer *guide* RNA besteht. Für das Verständnis des Gesamtprozesses ist es elementar, diesen primären Schritt möglichst detailliert zu untersuchen. Als Modellsystem bieten *in vitro* Studien mit rekombinantem Protein und einer geeigneten Nukleinsäure hierzu die Möglichkeit.

In der Literatur findet sich ein Paradoxon bezüglich der siRNA, mit der Ago2 beladen werden kann. Innerhalb der Zelle ist der *guide* Strang mit dem *passenger* Strang zu einer doppelsträngigen siRNA hybridisiert, da die siRNA auf endogenem Weg aus einem langen doppelsträngigen siRNA-Vorläufer generiert [29] bzw. als Doppelstrang transfiziert wird. Sie wird mit Hilfe des RLC in Ago2 geladen, wobei die molekularen Details dieses Prozesses nicht bekannt sind. Dabei ist auch nicht geklärt, ob der *guide* Strang allein an Ago2 übergeben und der *passenger* Strang durch einen von Spaltung unabhängigen Prozess freigesetzt wird. Alternativ könnte auch der Doppelstrang geladen werden, was die Spaltung und Freisetzung des *passenger* Stranges zur Folge haben müsste, um einen katalytisch kompetenten RISC zu erzeugen [36]. *In vitro* konnte bisher nicht gezeigt werden, dass mit doppelsträngiger siRNA beladenes Ago2 Spaltungsaktivität aufweist [35]. Dies gelang nur nach Beladung mit einem *guide* Strang [35, 199]. Weiterhin ist bekannt, dass das 5'-Ende des *guide* Stranges präferentiell phosphoryliert vorliegen muss, um eine effektive Bindung durch Ago2 zu gewährleisten [199]. Der Umsatz einer *target* RNA bei Verwendung eines nicht-phosphorylierten *guide* Stranges ist gegenüber demjenigen mit 5'-phosphoryliertem *guide* Strang deutlich vermindert [35, 199].

Aus diesen Gründen wurden drei fluoreszenzmarkierte siRNA-Substrate ausgewählt, die vergleichende Untersuchungen zur Substrataffinität und der Bildung von binären Komplexen ermöglichen (siehe Abbildung 5.22). Der am 5'-Ende phosphorylierte *guide* Strang wird im Folgenden als P-as2B-FAM bezeichnet, derjenige ohne Phosphatgruppe für eine eindeutige Zuordnung als OH-as2B-FAM. Beim Hybrid aus P-as2B-FAM und dem nicht-phosphorylierten und unmarkierten *passenger* Strang s2B wird im Folgenden von P-si2B-FAM gesprochen.

Die Position des Fluorophors wurde auf Basis der Röntgenstrukturdaten archaebakterieller Argonaute Proteine (siehe Abschnitte 2.3 und 2.4) derart gewählt, dass eine Interferenz des Fluorophors mit den beiden RNA-Bindetaschen in der Mid bzw. der PAZ Domäne von hAgo2 [28] oder des aktiven Zentrums in der PIWI Domäne [119] vermieden wird.

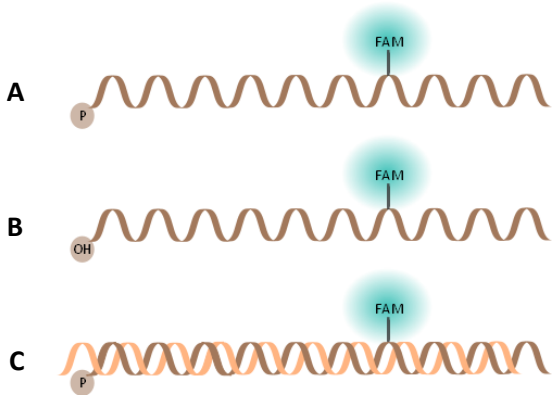


Abbildung 5.22: Übersicht über die verwendeten siRNA-Substrate. (A) Schematische Darstellung des am 5'-Ende phosphorylierten *guide* Stranges P-as2B-FAM. (B) Schematische Darstellung des unphosphorylierten *guide* Stranges OH-as2B-FAM. (C) Schematische Darstellung des Hybrides aus P-as2B-FAM und dem komplementären unphosphorylierten *passenger* Strang s2B. Für Sequenzen siehe Abschnitt 3.8.2.

5.7.2 Affinität von hAgo2 zu verschiedenen siRNA-Substraten

Für die Untersuchung der Substrataffinität von hAgo2 wurden zunächst unter Gleichgewichtsbedingungen (*steady state*) Dissoziationskonstanten bestimmt. Dazu wurde im Wesentlichen Gleichgewichts-Fluoreszenzspektroskopie angewendet (siehe Abschnitt 4.4.2). Um die gewonnenen Daten durch eine unabhängige Methode zu bestätigen, wurden zusätzlich Filterbindungsexperimente (siehe Abschnitt 4.4.2) sowie Gelverzögerungs-Analysen (siehe Abschnitt 4.4.4) durchgeführt.

Bestimmung der Affinität zu ssRNA

Eine Gleichgewichts-Fluoreszenztitration mit NHA-hAgo2 erwies sich als schwierig, da die Verdünnung des Proteins im Messpuffer durch die Titrationsschritte gleichzeitig die Verdünnung von L-Arg bedeutet. Die plötzliche Konzentrationsabnahme dieser das Protein stabilisierenden Substanz führte zur Aggregation. Neben der potentiellen Inaktivierung und damit Verfälschung der Daten hatte die Bildung großer Aggregate zusätzlich zur Folge, dass die Fluoreszenz ab einer bestimmten NHA-hAgo2-Menge in atypischer Weise zunahm. Vermutlich wurde dies dadurch verursacht, dass durch FAM emittiertes Licht an Partikeln gestreut wurde und deshalb die Messung verfälschte. Deshalb wurden Gleichgewichts-Fluoreszenztitrationen zur Ermittlung von K_ds mit GST-hAgo2 durchgeführt.

Bei der Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von GST-hAgo2 mit P-as2B-FAM (siehe Abbildung 5.22 A) konnte eine Gesamtfluoreszenzänderung von ca. 26 % erreicht werden. Die mathematische Auswertung der Titrationskurve mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ergab eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 7,1 ($\pm$ 2,1) nM (siehe Abbildung

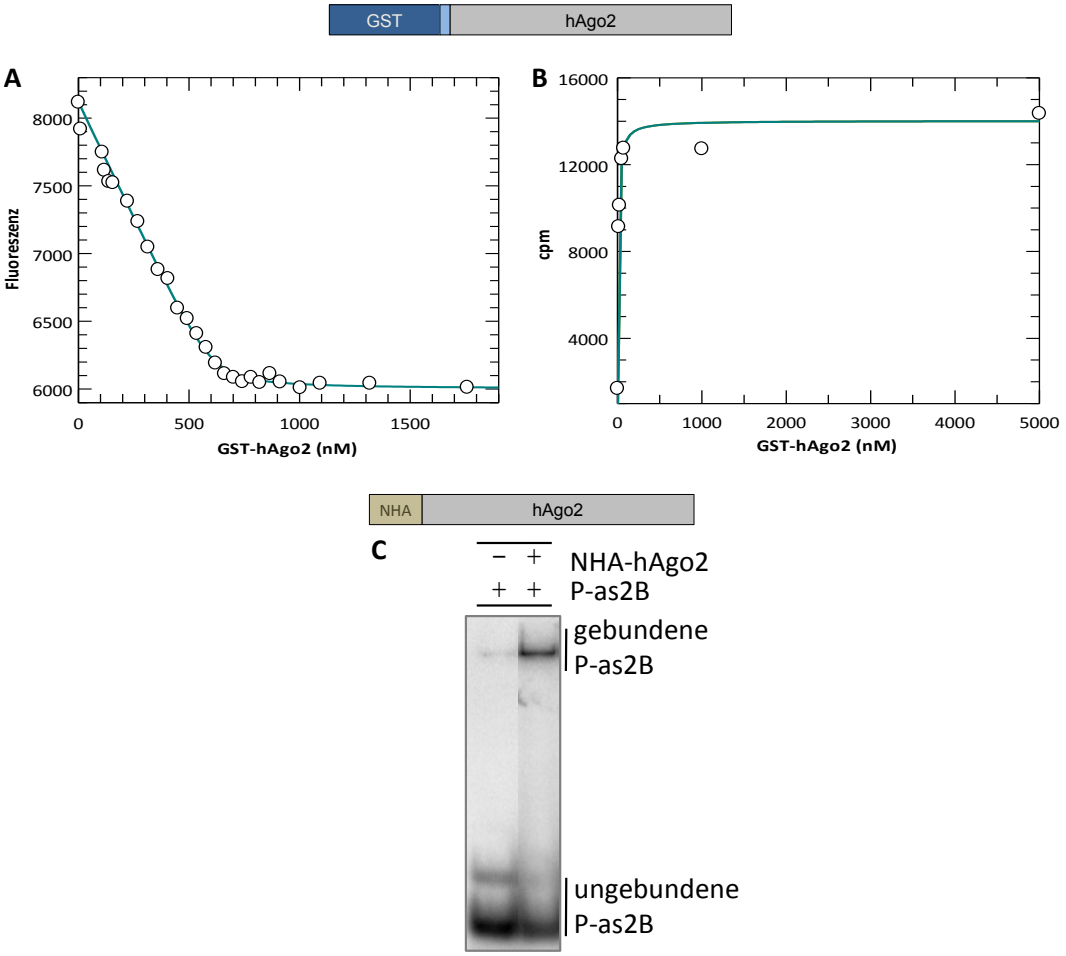


Abbildung 5.23: Bestimmung der Affinität von hAgo2 zu P-as2B-FAM (siehe Abschnitt 4.4.2). (A) Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von 20 nM P-as2B-FAM mit steigenden Konzentrationen GST-hAgo2. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab $K_d = 7{,}1\ (\pm 2{,}1)$ nM. (B) Filterbindungsexperiment von 5 nM P-as2B mit steigenden Konzentrationen GST-hAgo2. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab $K_d = 7{,}0\ (\pm 0{,}9)$ nM. (C) Nicht-denaturierendes 8 % PAA-Gel zur Auftrennung von Ansätzen mit 5 nM am 5'-Ende radioaktiv markierter P-as2B und 0 nM oder 2500 nM NHA-hAgo2. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. cpm: *counts per minute*.

5.23 A).

Um auszuschließen, dass die Fluoreszenzmarkierung von P-as2B-FAM einen Einfluss auf die Bindungsreaktion besitzt, wurde ein Komplex aus 20 nM P-as2B-FAM und 600 nM GST-hAgo2 mit steigenden Konzentrationen P-as2B titriert, um eine Verdrängung zu erwirken. Zwar konnte bei hohen Konzentrationen von P-as2B eine Fluoreszenzzunahme verzeichnet werden, jedoch war die Gesamtsignaländerung zu gering für eine verlässliche mathematische Auswertung. Deshalb wurde alternativ ein Filterbindungsexperiment zur Bestimmung des K_d durchgeführt, bei dem die Markierung des Substrates mit einem sperrigen Fluorophor

nicht nötig ist. Allerdings erwies sich die Aggregationsneigung von hAgo2 als problematisch. Reproduzierbare Ergebnisse konnten nur bei strikter Einhaltung der definierten Bedingungen und sehr gutem Mischen von Protein und Substrat erzielt werden (siehe Abschnitt 4.4.2). Für den Komplex aus GST-hAgo2 und P-as2B konnte eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 7,0 (± 0,9) nM bestimmt werden (siehe Abbildung 5.23 B). Da bei diesem Experiment der oben beschriebene Streulichteffekt durch NHA-hAgo2 nicht zum Tragen kam, konnte mittels Filterbindung ebenfalls für den Komplex aus NHA-hAgo2 und P-as2B eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 23,1 (± 7,9) nM ermittelt werden. Die Abweichung von dem mit GST-hAgo2 ermittelten Wert lässt sich durch eine stärkere Aggregation erklären. Es wurde durch eine Gelverzögerungs-Analyse zusätzlich nachgewiesen, dass durch NHA-hAgo2 P-as2B gebunden wird (siehe Abbildung 5.23 C).

Um die biologische Relevanz der verwendeten *guide* RNA zu testen, wurde ein Standard-Spaltungsassay mit P-as2B-FAM durchgeführt. Es zeigte sich, dass *target* RNA-Spaltung stattfand (siehe Abbildung 5.42). Die Anwesenheit des Fluorophors führte zwar zu einem leicht verminderten Gesamtumsatz, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei P-as2B-FAM um eine funktionelle *guide* RNA handelt.

Um die Affinität von hAgo2 zu einer unphosphorylierten *guide* RNA zu messen, wurde eine Gleichgewichts-Fluoreszenztitration mit OH-as2B-FAM (siehe Abbildung 5.22 B) durchgeführt. Es konnte eine Gesamtfluoreszenzänderung von ca. 26 % erzielt werden. Nach Auswertung der Titrationskurve mittels einer quadratischen Bindungsgleichung wurde eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 106,0 (± 7,7) nM ermittelt (siehe Abbildung 5.24).

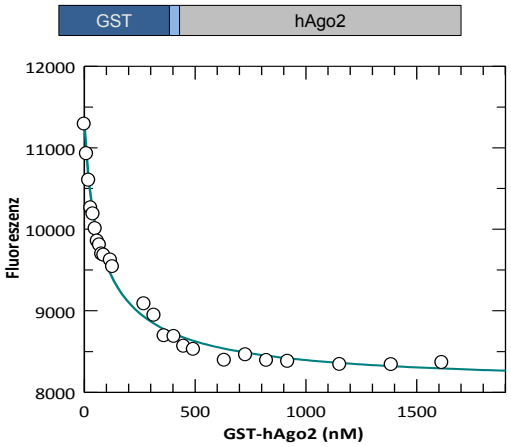


Abbildung 5.24: Bestimmung der Affinität von hAgo2 zu OH-as2B-FAM (siehe Abschnitt 4.4.2). Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von 20 nM OH-as2B-FAM mit steigenden Konzentrationen GST-hAgo2. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab $K_d = 106{,}0\ (\pm\ 7{,}7)$ nM.

Bestimmung der Affinität zu dsRNA

Für den Vergleich der Affinitäten von hAgo2 für einzel- bzw. doppelsträngige siRNA wurde als nächstes die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante für P-si2B (siehe Abbildung 5.22 C) bestimmt. Bei dieser Fluoreszenztitration war die Änderung des Signals mit etwa 23 % schwächer als bei den beiden einzelsträngigen Substraten. Die Auswertung der Daten mittels quadratischer Bindungsgleichung ergab $K_d = 47{,}9\ (\pm 7{,}5)$ nM (siehe Abbildung 5.25).

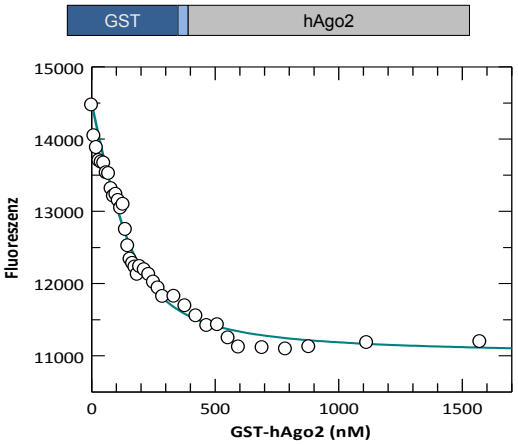


Abbildung 5.25: Bestimmung der Affinität von hAgo2 zu P-si2B-FAM (siehe Abschnitt 4.4.2). Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von 20 nM P-si2B-FAM mit steigenden Konzentrationen GST-hAgo2. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab $K_d = 47{,}9\ (\pm 7{,}5)$ nM.

5.7.3 Kinetik der Bindungsreaktion von hAgo2 und verschiedenen siRNA-Substraten

Mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration konnte die Bildung von Komplexen aus hAgo2 sowie allen drei in Abbildung 5.22 dargestellten siRNAs beobachtet werden. Hierbei war vor allem die relativ hohe Affinität zur doppelsträngigen P-si2B-FAM überraschend. Im Folgenden wurde die Bildung dieser Komplexe in Abhängigkeit der Zeit unter *pre-steady state* Bedingungen im Detail untersucht. Dabei wurden Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten mit Hilfe der *stopped flow* Technik bestimmt (siehe Abschnitt 4.4.3). Mit Hilfe dieser Methode können Reaktionsphasen determiniert werden, die sich in ihrer Ratenkonstante unterscheiden. Dadurch kann ermittelt werden, aus wie vielen Phasen eine Bindungsreaktion mindestens besteht sowie ihre Geschwindigkeit gemessen werden. Die kinetischen Messungen wurden mit NHA-hAgo2 durchgeführt.

Untersuchung der Assoziation und Dissoziation von ssRNA und hAgo2

Zunächst wurde die Komplexbildung von NHA-hAgo2 mit den *guide* Strängen P-as2B-FAM und OH-as2B-FAM untersucht. Je 20 nM Substrat wurden mit einer konstanten Konzentration NHA-hAgo2 im Bereich von 300 – 800 nM rasch gemischt und die Fluoreszenzänderung aufgezeichnet. Für jede Proteinkonzentration wurden die Daten mathematisch mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 5.26 A und C).

Die Kinetik kann am besten mit einer dreifach exponentiellen Gleichung beschrieben werden. Das bedeutet, dass während der Assoziation eines binären Komplexes mindestens drei Phasen

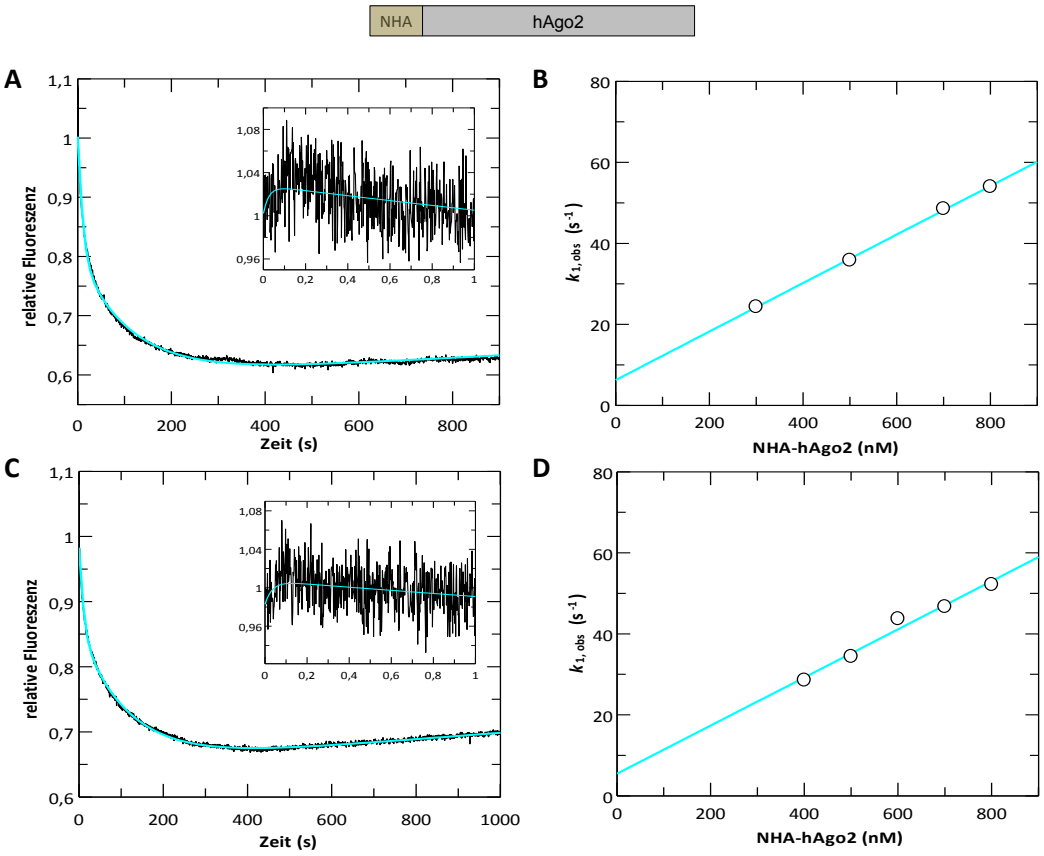


Abbildung 5.26: *Pre-steady state* Assoziationskinetik von NHA-hAgo2 und 5'-phosphorylierter *versus* unphosphorylierter *guide* RNA (siehe Abschnitt 4.4.3). (A) Repräsentative *stopped flow* Messung der Komplexbildung aus 20 nM P-as2B-FAM und 500 nM NHA-hAgo2. Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{1,\,obs} = 35{,}8\,(\pm 8{,}3)\,s^{-1}$, $k_2 = 0{,}11\,(\pm 0{,}0018)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0097\,(\pm 0{,}00005)\,s^{-1}$. (B) Abhängigkeit von $k_{1,\,obs}$ u. a. aus (A) von der NHA-hAgo2-Konzentration. Es ergab sich $k_1 = 0{,}6\,(\pm 0{,}001) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ und $k_{-1} = 6{,}2\,(\pm 0{,}62)\,s^{-1}$. (C) Repräsentative *stopped flow* Messung der Komplexbildung aus 20 nM OH-as2B-FAM und 400 nM NHA-hAgo2. Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{1,\,obs} = 28{,}6\,(\pm 16{,}1)\,s^{-1}$, $k_2 = 0{,}11\,(\pm 0{,}0021)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0087\,(\pm 0{,}00004)\,s^{-1}$. (D) Abhängigkeit von $k_{1,\,obs}$ u. a. aus (C) von der NHA-hAgo2-Konzentration. Es ergab sich $k_1 = 0{,}6\,(\pm 0{,}05) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ und $k_{-1} = 5{,}5\,(\pm 3{,}3)\,s^{-1}$.

mit unterschiedlichen Ratenkonstanten durchlaufen werden müssen. Dabei ist es unerheblich, ob der *guide* Strang an seinem 5'-Ende eine Phosphatgruppe trägt.

Für beide Substrate konnte für die jeweils erste schnelle Phase (siehe Abbildung 5.26 A und C, Darstellung bis 1 s) eine Ratenkonstante pseudo-erster Ordnung ($k_{1,\,obs}$) ermittelt werden. Eine Auftragung der Ratenkonstanten gegen die Proteinkonzentration ergab einen linearen Zusammenhang (siehe Abbildung 5.26 B und D). Aus der Steigung der Geraden wurde die Assoziationsratenkonstante der ersten Phase mit $k_1 = 0{,}6\,(\pm\,0{,}001) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ für den Komplex aus NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM sowie $k_1 = 0{,}6\,(\pm\,0{,}05) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ für den Komplex aus NHA-hAgo2 und OH-as2B-FAM ermittelt. Da die Assoziationsratenkonstante der ersten Phase konzentrationsabhängig ist, repräsentiert sie sehr wahrscheinlich die diffusionskontrollierte Bildung eines Kollisionskomplexes. Die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante der ersten Phase erfolgte aus dem Ordinatenabschnitt und ergab $k_{-1} = 6{,}2\,(\pm\,0{,}62)\,s^{-1}$ für den Komplex aus NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM und $k_{-1} = 5{,}5\,(\pm\,3{,}3)\,s^{-1}$ für den Komplex aus NHA-hAgo2 und OH-as2B-FAM. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass solcherart bestimmte Dissoziationsratenkonstanten oft fehlerbehaftet sind, da sich bereits geringe Abweichungen bei den experimentell bestimmten Raten pseudo-erster Ordnung stark auf den Ordinatenabschnitt auswirken.

Auch für die beiden folgenden Phasen konnten die Ratenkonstanten gemessen werden. Beide sind langsamer und nicht abhängig von der Proteinkonzentration. Sie betragen für den Komplex aus NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM $k_2 = 0{,}26\,(\pm\,0{,}16)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0122\,(\pm\,0{,}0024)\,s^{-1}$. Für den Komplex aus NHA-hAgo2 und OH-as2B-FAM wurden die Ratenkonstanten $k_2 = 0{,}16\,(\pm\,0{,}07)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0104\,(\pm\,0{,}0018)\,s^{-1}$ ermittelt. Die angegebenen Ratenkonstanten stellen Mittelwerte aus je fünf unabhängigen Experimenten dar. Die zweite und dritte Phase könnten konformationelle Umlagerungen von hAgo2 während der Bindung des *guide* Stranges beschreiben, also die Verankerung des 5'-Endes in der Mid Bindetasche und die des 3'-Endes in der PAZ Domäne repräsentieren.

Um die Assoziationsratenkonstanten jeweils biologisch relevanten Prozessen zuordnen zu können, wurden *stopped flow* Messungen mit 5'-phosphorylierten und unphosphorylierten *guide* RNAs durchgeführt, die an verschiedenen Positionen mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen waren (siehe Abbildung 5.27, aus Gründen der Übersichtlichkeit wird in der Darstellung nicht zwischen phosphoryliert und nicht-phosphoryliert unterschieden). Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die Fluorophore FAM und Alexa488 einen gewissen Raumbedarf haben und deshalb mit der Bindung an hAgo2 interferieren können. Wenn bestimmte Phasen der Komplexbildung bei Verwendung einzelner *guide* RNAs nicht mehr stattfinden, lässt dies auf eine Störung durch die Markierung in Abhängigkeit von deren Position schließen, was Aufschluss über die Interaktionsstelle von Protein und Nukleinsäure gibt.

Es wurden Messungen mit je 20 nM Substrat und 300 nM NHA-hAgo2 durchgeführt und die Ratenkonstanten k_1, k_2 und k_3 bestimmt. In allen Fällen kam es zu einer Änderung

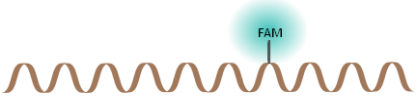
guide RNA	Bezeichnung	Position des Fluorophors	Phase 1	Phase 2	Phase 3
	FAM-asLam	Nukleotid 1	ja	nicht messbar	nicht messbar
	19mer-FAM	Nukleotid 6	ja	ja	ja
	as2B-FAM	Nukleotid 14	ja	ja	ja
	sLam-Alexa488	Nukleotid 21	ja	ja	ja

Abbildung 5.27: Übersicht über die verwendeten *guide* RNAs. Dargestellt sind Bezeichnung, die Position des Fluorophors sowie die beobachtbaren Phasen der Assoziationskinetik bei Bildung des binären Komplexes. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Phosphorylierungsstatus nicht dargestellt. Für Sequenzen siehe Abschnitt 3.8.2.

des Fluoreszenzsignals, die der ersten Phase zugeordnet wurde (siehe Abbildung 5.27). Diese Tatsache untermauert die Annahme, dass es sich bei der ersten Phase um die initiale Bildung eines Kollisionskomplexes handelt, da die Kollision durch die Position der Markierung nicht beeinflusst wird. Im Fall von FAM-asLam konnten die zweite und dritte Phase der Bindung nicht beobachtet werden. Da FAM hier am 5'-Ende des *guide* Stranges positioniert ist, lässt das auf eine Interferenz zwischen FAM und der Mid Bindetasche von hAgo2 schließen. Es kann also abgeleitet werden, dass die zweite Phase die Verankerung des 5'-Endes des *guide* Stranges in der Mid Bindetasche repräsentiert, die auf Grund sterischer Hinderung durch FAM nicht stattfinden kann. Weiterhin zeigt das Experiment, dass es sich bei den Phasen zwei und drei vermutlich um zwei sequentielle Ereignisse handelt, da auch die dritte Phase mit FAM-asLam nicht beobachtet werden konnte. Mit den *guide* Strängen, deren Fluorophore an Position 6, 14 oder 21 positioniert sind, findet eine Bindungsreaktion mit drei Phasen statt. Dabei sind die Ratenkonstanten der jeweiligen Phase im Rahmen einer leichten Abweichung gleich. Also stört eine sperrige Markierung an diesen Positionen nicht die Interaktion zwischen Protein und Nukleinsäure. In den Fällen von 19-mer-FAM und as2B-FAM ist FAM vermutlich in der basischen Bindungsfurche zwischen den beiden hAgo2-Lappen lokalisiert (siehe Abbildung 2.2 B), was offenbar nicht zur Interferenz führt. Im Fall von sLam-Alexa488 muss das Fluorophor in räumliche Nähe zur PAZ Bindetasche kommen. Falls die dritte Phase der Verankerung des 3'-Endes des *guide* Stranges in der PAZ Domäne entspricht, kommt es offenbar nicht zur Interferenz zwischen Fluorophor und Protein, weil bei Verwendung dieses Substrates ebenfalls alle drei Phasen ablaufen.

Für die *guide* RNA as2B-FAM konnte bereits gezeigt werden, dass die 5'-Phosphatgruppe

keine Auswirkung auf die Anzahl und die Geschwindigkeit der Phasen der Assoziation besitzt. Dieses Ergebnis konnte mit den Substraten 19mer-FAM und sLam-Alexa488 bestätigt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Dissoziation des binären Komplexes aus NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM bzw. OH-as2B-FAM unter *pre-steady state* Bedingungen untersucht. Zwar konnte für die erste Phase bereits k_{-1} indirekt ermittelt werden, jedoch wurden die Daten durch ein Experiment bestätigt, bei dem zeitaufgelöst die Verdrängung von as2B-FAM aus dem binären Komplex durch einen 100-fachen Überschuss nicht-markierter asLam beobachtet wurde (siehe Abbildung 5.28).

Zunächst fällt auf, dass die durch Verdrängung hervorgerufene Signalzunahme in beiden Fällen deutlich geringer ist als die Abnahme während der Bildung des binären Komplexes. Dies spricht dafür, dass nur etwa 20 % von P-as2B-FAM bzw. OH-as2B-FAM verdrängt werden können. Durch die geringere Amplitude ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis kleiner als bei der Beobachtung der Assoziation und die ermittelten Werte weisen einen größeren Fehler auf. Allerdings war die Güte der Daten ausreichend für eine mathematische Auswertung.

Es zeigte sich, dass auch die Dissoziation mindestens ein dreiphasiger Prozess ist. Durch Auswertung der experimentellen Daten mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ergaben sich $k_{-1} = 14{,}7\,(\pm 2{,}5)\,s^{-1}$, $k_{-2} = 0{,}17\,(\pm 0{,}02)\,s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0066\,(\pm 0{,}0001)\,s^{-1}$ für den Zerfall eines NHA-hAgo2/P-as2B-FAM-Komplexes. Für die Dissoziation von NHA-hAgo2 und OH-as2B-FAM wurden als Ratenkonstanten $k_{-1} = 10{,}9\,(\pm 15{,}9)\,s^{-1}$, $k_{-2} = 1{,}7\,(\pm 0{,}3)\,s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0094$

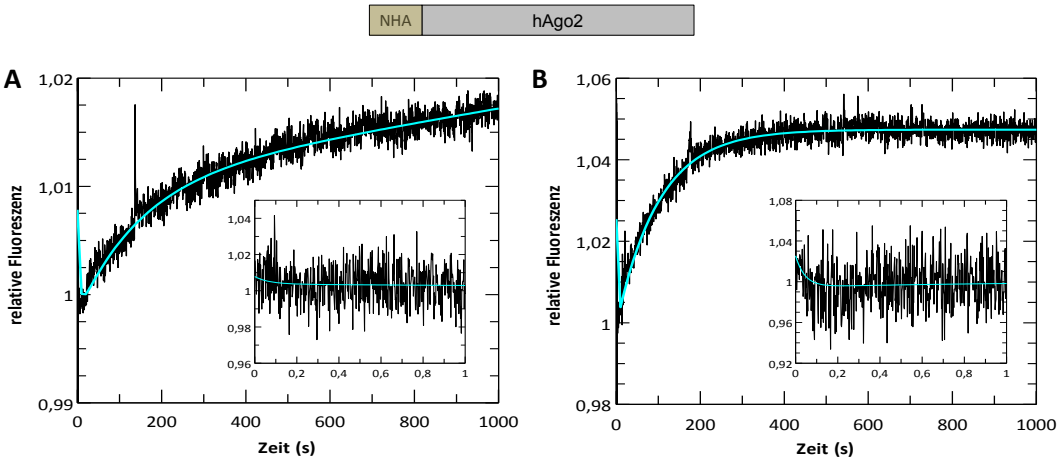


Abbildung 5.28: *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von NHA-hAgo2 und 5'-phosphorylierter *versus* unphosphorylierter *guide* RNA (siehe Abschnitt 4.4.3). (A) *Stopped flow* Messung des Zerfalls von einem Komplex aus 20 nM P-as2B-FAM und 300 nM NHA-hAgo2 in Anwesenheit von 2000 nM asLam. Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{-1} = 14{,}7\,(\pm 2{,}5)\,s^{-1}$, $k_{-2} = 0{,}17\,(\pm 0{,}02)\,s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0066\,(\pm 0{,}0001)\,s^{-1}$. (B) *Stopped flow* Messung des Zerfalls von einem Komplex aus 20 nM OH-as2B-FAM und 300 nM NHA-hAgo2 in Anwesenheit von 2000 nM asLam. Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{-1} = 10{,}9\,(\pm 15{,}9)\,s^{-1}$, $k_{-2} = 1{,}7\,(\pm 0{,}28)\,s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0094\,(\pm 0{,}0004)\,s^{-1}$.

$(\pm 0{,}0004)\,s^{-1}$ ermittelt.

Auch die drei Dissoziationsratenkonstanten sollten einem biologischen Prozess zugeordnet werden. Für die Rückreaktion der ersten Phase, die dem Zerfall eines Kollisionskomplexes entspricht, konnten die bereits durch die Konzentrationsabhängigkeit der ersten Assoziationsphase ermittelten Dissoziationskonstanten k_{-1} (für NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM: $6{,}2\,(\pm 0{,}62)\,s^{-1}$ und für NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM: $5{,}5\,(\pm 3{,}3)\,s^{-1}$) herangezogen werden. Sie waren vergleichbar zu den in diesem Verdrängungsexperiment ermittelten Ratenkonstanten $k_{-1} = 14{,}7\,(\pm 2{,}5)\,s^{-1}$ für NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM bzw. $k_{-1} = 10{,}9\,(\pm 15{,}9)\,s^{-1}$ für NHA-hAgo2 und OH-as2B-FAM. Trotz der bereits oben beschriebenen Ungenauigkeit der ersten Methode weichen die jeweiligen Ratenkonstanten nur etwa um einen Faktor 2 voneinander ab.

Die Phase 2 der Dissoziation von NHA-hAgo2 und OH-as2B-FAM ist 10-fach schneller als diejenige von NHA-hAgo2 und P-as2B-FAM. Da die beiden Substrate sich nur durch die 5'-Phosphatgruppe voneinander unterscheiden, muss dies folglich auch der Grund für die unterschiedliche Dissoziationsratenkonstante sein. Die zweite Phase der Assoziation wurde einer konformationellen Umlagerung während der Verankerung des 5'-Endes des *guide* Stranges in der Mid Bindetasche zugeordnet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die zweite Phase der Dissoziation dem umgekehrten Prozess entspricht, also die Freisetzung des 5'-Endes repräsentiert. Dies würde bedeuten, dass eine *guide* RNA ohne 5'-Phosphatgruppe schlechter in hAgo2 verankert werden kann.

Somit kann postuliert werden, dass die dritte Dissoziationsphase eine konformationelle Änderung des binären Komplexes repräsentiert, die für die Freisetzung des 3'-Endes des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne notwendig ist. Diese Vermutung konnte durch spätere Analysen während der Assoziation eines ternären Komplexes aus GST-hAgo2, P-as2B-FAM und dem als *target* RNA fungierenden s2B-BHQ erhärtet werden (siehe Abschnitt 5.8.3).

Ausgehend von den Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten (es wurden jeweils die direkt mittels Verdrängungsexperiment ermittelten Werte für k_{-1} verwendet) konnte anhand folgender Gleichung die Dissoziationskonstante berechnet werden:

$$K_\mathrm{d} = \prod \frac{k_{-\mathrm{n}}}{k_\mathrm{n}} \tag{5.1}$$

Für den Komplex aus NHA-hAgo2 und P-as2b-FAM ergab sich $K_\mathrm{d} = 37\,\mathrm{nM}$ und für den Komplex aus NHA-hAgo2 und OH-as2b-FAM $K_\mathrm{d} = 864\,\mathrm{nM}$. Die Abweichung dieser Werte von denjenigen durch Gleichgewichts-Fluoreszenztitration ermittelten lässt sich teilweise durch die langsame Diffusion der großen binären Komplexe erklären. Bei der Fluoreszenztitration unter Gleichgewichtsbedingungen fällt diese Verzögerung nicht ins Gewicht, da die Messung des Fluoreszenzsignals erst nach Ende der Komplexbildung erfolgt. Bei den Messungen unter *pre-steady state* Bedingungen hingegen führt die zeitliche Abhängigkeit der Messung dazu, dass die Diffusionsprozesse eine Rolle spielen. Neben der Größe der binären Komplexe muss auch bedacht werden, dass es auf Grund der Aggregationsneigung von hAgo2 zur Bildung von

Oligomeren kommt (siehe Abschnitt 5.5.5), die eventuell die *guide* RNA binden, aber eben sehr langsam diffundieren. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Bindung eines siRNA-Substrates durch hAgo2 weitere konformationelle Änderungen stattfinden, deren Ratenkonstanten mit dem gewählten System nicht beobachtbar sind. Nach Gleichung 5.1 würden unbekannte Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten in den berechneten K_d eingehen, was die Differenz der beiden Werte erklären kann.

Untersuchung der Assoziation und Dissoziation von dsRNA und hAgo2

Analog zu den Studien der Komplexbildung von NHA-hAgo2 und einzelsträngigen *guide* RNAs wurde im Folgenden die Bildung eines binären Komplexes aus NHA-hAgo2 und P-si2B-FAM zeitaufgelöst untersucht (siehe Abbildung 5.29 A). Die Signalabnahme war bei der Bildung dieses Komplexes deutlich geringer als während der Bildung des binären Komplexes mit einzelsträngigen *guide* RNAs. Wegen der geringen Amplitude und dem kleinen Signal-zu-Rausch-Verhältnis weisen die ermittelten Werte einen größeren Fehler auf.

Die Auswertung der experimentellen Daten durch eine dreifach exponentielle Gleichung zeigte den bereits beobachteten dreiphasigen Verlauf der Bindungsreaktion. Die erste schnelle Phase (siehe Abbildung 5.29 A, Darstellung bis 1 s) besitzt eine Ratenkonstante pseudo-erster Ordnung ($k_{1,\,obs}$). Die Ratenkonstanten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und aus dem linearen Zusammenhang (siehe Abbildung 5.29 B) die Assoziationsratenkonstante der ersten Phase mit $k_1 = 1{,}2\,(\pm\,0{,}13) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ ermittelt. Die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante der ersten Phase ergab $k_{-1} = 55{,}8\,(\pm\,6{,}9)\,s^{-1}$. Die zweite und dritte

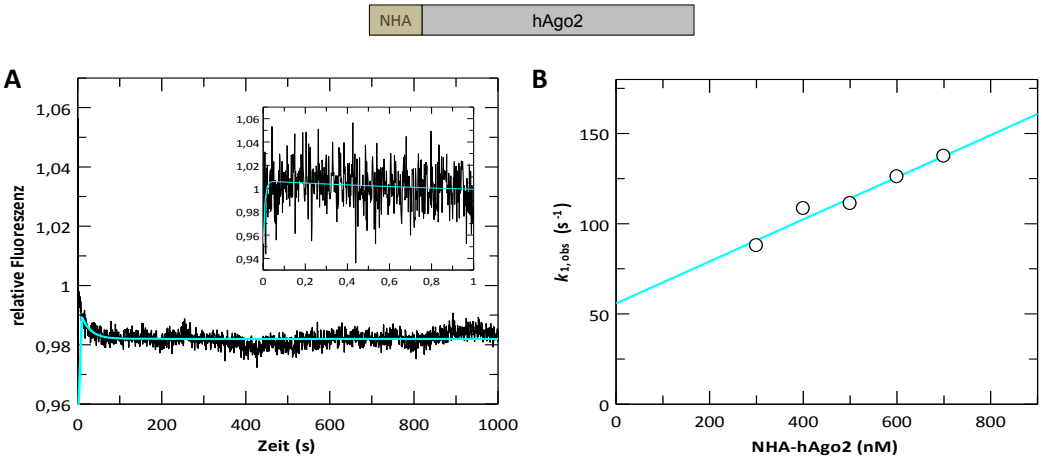


Abbildung 5.29: *Pre-steady state* Assoziationskinetik von NHA-hAgo2 und siRNA (siehe Abschnitt 4.4.3). (A) Repräsentative *stopped flow* Messung der Komplexbildung aus 20 nM P-si2B-FAM und 600 nM NHA-hAgo2. Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{1,\,obs} = 126{,}0\,(\pm\,34{,}7)\,s^{-1}$, $k_2 = 0{,}69\,(\pm\,0{,}17)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0437\,(\pm\,0{,}0145)\,s^{-1}$. (B) Abhängigkeit von $k_{1,\,obs}$ u. a. aus (A) von der NHA-hAgo2-Konzentration. Es ergab sich $k_1 = 1{,}2\,(\pm\,0{,}13) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ und $k_{-1} = 55{,}8\,(\pm\,6{,}9)\,s^{-1}$.

Ratenkonstante betragen $k_2 = 0{,}48\,(\pm\,0{,}23)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0282\,(\pm\,0{,}0184)\,s^{-1}$ (Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten). Die Ratenkonstanten der Assoziation von NHA-hAgo2 mit P-si2B-FAM sind demnach vergleichbar mit denen der Assoziation von NHA-hAgo2 und einer einzelsträngigen *guide* RNA.

Im letzten Schritt wurde die Dissoziation des binären Komplexes aus NHA-hAgo2 und P-si2B-FAM unter *pre-steady state* Bedingungen untersucht. Dazu wurde P-si2B-FAM aus dem binären Komplex durch einen 100-fachen Überschuss nicht-markierter asLam verdrängt und die zeitabhängige Änderung des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet (siehe Abbildung 5.30).

Mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung wurden für den Dissoziationsprozess als Ratenkonstanten $k_{-1} = 22{,}0\,(\pm\,3{,}7)\,s^{-1}$, $k_{-2} = 5{,}7\,(\pm\,2{,}7)\,s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0058\,(\pm\,0{,}0003)\,s^{-1}$ bestimmt. Sie wurden analog zum Zerfall eines Komplexes aus NHA-hAgo2 und einer *guide* RNA (siehe oben) der Dissoziation des Kollisionskomplexes (k_{-1}) und der konformationellen Umlagerung von hAgo2 bei der Freisetzung der siRNA aus der Mid Bindetasche (k_{-2}) bzw. der PAZ Domäne (k_{-3}) zugeordnet.

Die Ratenkonstanten k_{-1} und k_{-3} der Dissoziation sind zwischen dem binären Komplex aus NHA-hAgo2 und *guide* RNA bzw. demjenigen aus NHA-hAgo2 und doppelsträngiger siRNA vergleichbar. Für k_{-1} ist dies zu erwarten, da für den Zerfall des Kollisionskomplexes unerheblich sein sollte, ob die siRNA einzel- oder doppelsträngig ist. Für k_{-3} ist diese Tatsache ebenfalls erklärbar. Die PAZ Domäne besitzt eine Affinität zu dem 2 nt langen Überhang, den eine siRNA charakteristischerweise an ihrem 3'-Ende besitzt [121–123, 125] und der bei den zuvor untersuchten *guide* RNAs identisch ist. Deshalb ist eine Veränderung dieser Interaktion nicht zu erwarten. Bei k_{-2} jedoch ist ein Unterschied um den Faktor 30 feststellbar. Bei der

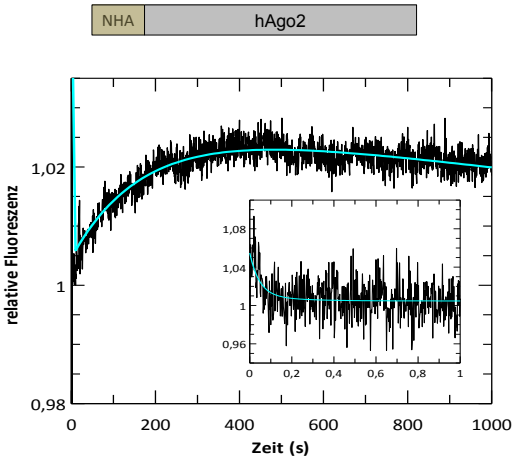


Abbildung 5.30: *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von NHA-hAgo2 und siRNA (siehe Abschnitt 4.4.3). *Stopped flow* Messung des Zerfalls von einem Komplex aus 20 nM P-si2B-FAM und 300 nM NHA-hAgo2 in Anwesenheit von 2000 nM asLam. Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{-1} = 22{,}0\,(\pm\,3{,}7)\,s^{-1}$, $k_{-2} = 5{,}7\,(\pm\,2{,}7)\,s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0058\,(\pm\,0{,}0003)\,s^{-1}$.

Entlassung des *guide* RNA-5'-Endes aus der Mid Bindetasche kommt es zu einer Watson-Crick-Basenpaarung des ersten Nukleotides mit dem dritten Nukleotid des *passenger* Stranges. Die hierbei gewonnene Energie könnte der Grund dafür sein, warum der zweite Dissoziationsschritt beim Zerfall eines Komplexes aus einer doppelsträngigen siRNA und NHA-hAgo2 dramatisch schneller verläuft und außerdem eine Erklärung dafür liefern, warum bisher eine *target* RNA-Spaltung durch mit doppelsträngiger siRNA programmiertem hAgo2 *in vitro* nicht gezeigt werden konnte [35].

Bei der Berechnung der Dissoziationskonstante anhand von Gleichung (5.1) ergab sich $K_\mathrm{d} = 444\,\mathrm{nM}$. Hier findet sich erneut die bereits oben beschriebene Abweichung von dem mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration bestimmten Wert.

5.7.4 Zusammenfassung der biochemischen und kinetischen Parameter bei der Bildung eines binären Komplexes

Für eine vergleichende Übersicht sind die Ergebnisse zur Bindung einzel- und doppelsträngiger siRNA durch hAgo2 an dieser Stelle tabellarisch aufgeführt.

siRNA-Substrat	K_d (nM)			k_1	k_{-1}	k_2	k_{-2}	k_3	k_{-3}
	FT	FB	ber.	($\mathrm{M^{-1}s^{-1}}$)	($\mathrm{s^{-1}}$)	($\mathrm{s^{-1}}$)	($\mathrm{s^{-1}}$)	($\mathrm{s^{-1}}$)	($\mathrm{s^{-1}}$)
P-as2B-FAM	7,1	7,0	37*	$0{,}6 \times 10^8$	6,2	0,26	0,17	0,0122	0,0066
OH-as2B-FAM	106,0	n. b.	864*	$0{,}6 \times 10^8$	5,5	0,16	1,7	0,0104	0,0094
P-si2B-FAM	47,9	n. b.	444*	$1{,}2 \times 10^8$	22,0	0,48	5,7	0,0282	0,0058

Tabelle 5.2: Übersicht über die biochemischen und kinetischen Parameter bei Bildung eines binären Komplexes. Mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration (FT) oder Filterbindungsexperiment (FB) experimentell bestimmte oder berechnete (ber.) Dissoziationskonstanten sowie Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für die Bildung eines binären Komplexes aus NHA-hAgo2 und verschiedenen siRNA-Substraten. * Für die Berechnung der Dissoziationskonstanten wurden jeweils die direkt mittels Verdrängungsexperiment ermittelten Werte für k_{-1} verwendet.

5.8 Charakterisierung der *target* RNA-Bindung durch den binären hAgo2/*guide* RNA-Komplex [5]

5.8.1 Etablierung eines experimentellen Systems zur Untersuchung der *target* RNA-Erkennung und -Bindung

Der nächste Schritt auf dem Weg zur siRNA-vermittelten Spaltung einer geeigneten *target* RNA ist deren Erkennung und Bindung durch den binären Komplex aus hAgo2 und *guide* RNA. Die molekularen Details dieser Bindung sind bisher nicht vollständig verstanden. Um

[5] Die in Abschnitt 5.8 beschriebenen Experimente wurden teilweise in Zusammenarbeit mit S. Willkomm im Rahmen der Betreuung ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Einblicke in diesen Prozess zu erhalten, wurde in einem ersten experimentellen Ansatz das fluoreszenzbasierte System, das für die Charakterisierung der siRNA-Bindung durch hAgo2 verwendet wurde (siehe Abschnitt 5.7), um eine Komponente erweitert. Als Modell für eine *target* mRNA diente der 21 nt umfassende, mit einem Fluoreszenzlöscher gekoppelte Gegenstrang zu as2B-FAM, s2B-BHQ (siehe Abbildung 5.31 A). Werden das Fluorophor FAM und der Löscher BHQ1 in räumliche Nähe zueinander gebracht, wird das von FAM emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 516 nm durch BHQ1 absorbiert. Es kommt zu einer Löschung des Fluoreszenzsignals, wodurch sich die Bildung eines ternären Komplexes verfolgen lässt. Gleichzeitig erlaubt das System vor der Bindung der *target* RNA, die Bildung des binären Komplexes zu kontrollieren, da auch dieser Schritt zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals führt (siehe Abschnitt 5.7). Diese Kontrolle ist wichtig, da eine Fluoreszenzlöschung auch in Abwesenheit von hAgo2 auftritt, wenn P-as2B-FAM und s2B-BHQ hybridisieren. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung eines solchen *molecular beacons* besteht in einer sehr großen Signaländerung, die zu einem großen Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt.

Die Position des Fluoreszenzlöschers wurde nach zwei Kriterien gewählt. Zunächst sollten bei Bindung der *target* RNA durch den binären Komplex FAM und BHQ1 in möglichst große räumliche Nähe gebracht werden, um eine gute Signaländerung zu erzielen. Weiterhin sollte s2B-BHQ nach Möglichkeit ein spaltbares *target* darstellen. Dafür wurden erneut die Röntgenstrukturdaten archaebakterieller Argonaute-Proteine herangezogen [119]. Weiterhin lassen die Studien zur Bildung eines binären Komplexes aus NHA-hAgo2 und *guide* RNAs mit Fluorophoren an verschiedenen Positionen (siehe Abschnitt 5.7) die Annahme zu, dass die Position von BHQ1 am 4. Nukleotid der *target* RNA nicht zu einer Interferenz mit hAgo2 führt.

Um die Funktionalität von s2B-BHQ zu testen, wurde ein Standard-Spaltungsassay (siehe Abschnitt 4.4.1) mit GST-hAgo2 und zwei alternativen *target* RNAs durchgeführt. Statt des 140 nt umfassenden ICAM-1-IVT kamen dabei s2B und s2B-BHQ zum Einsatz. Allerdings zeigte sich nach Auftrennung der Spaltungsansätze per Sequenziergel mit anschließender Autoradiographie, dass die 9 nt langen 5'-Spaltprodukte wegen zu starker RNA-Degradation durch die Nukleaseverunreinigung der Präparation nicht eindeutig zuzuordnen waren. Deshalb wurde dem Spaltungsansatz 1 μg/μl tRNA zugesetzt, um die Degradation der *target* RNAs zu vermeiden. Es zeigte sich, dass Umsatz von s2B-BHQ durch hAgo2 stattfindet (siehe Abbildung 5.42). Die Spaltung ist im Vergleich zu derjenigen von s2B zwar vermindert, doch wird es durch den Komplex mit vergleichbarer Rate umgesetzt. Folglich handelt es sich dabei um eine funktionelle *target* RNA (siehe Abschnitt 5.10).

Zur Bestätigung der mit Hilfe des *molecular beacons* gewonnenen Daten sowie der weiterführenden Untersuchung der Bildung ternärer Komplexe wurden zwei zusätzliche experimentelle Systeme verwendet. Im zweiten Fall wurde der am 5'-Ende phosphorylierte Strang P-s2B als *guide* RNA verwendet, wohingegen as2B-FAM als *target* RNA diente (siehe Abbildung 5.31 B). Beim dritten experimentellen Ansatz wurde der gleiche Strang als *guide* RNA verwen-

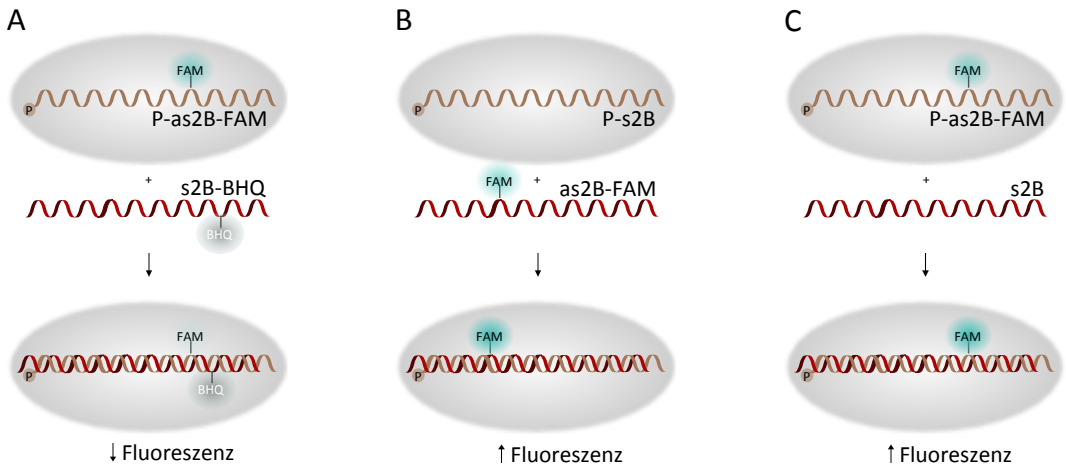


Abbildung 5.31: Schematische Darstellung der Fluoreszenzänderung bei Bildung ternärer Komplexe unter Verwendung dreier experimenteller Ansätze. Nach Assoziation binärer Komplexe aus GST-hAgo2 (dargestellt durch ein graues Oval) und der jeweiligen *guide* RNA werden diese mit der jeweiligen *target* RNA gemischt. (A) *guide* RNA: P-as2B-FAM; *target* RNA: s2B-BHQ. (B) *guide* RNA: P-s2B; *target* RNA: as2B-FAM. (C) *guide* RNA: P-as2B-FAM; *target* RNA: s2B. Die Bildung der ternären Komplexe wurde konzentrationsabhängig (*steady state*, A) oder zeitaufgelöst (*pre-steady state*, A – C) durch Fluoreszenzänderung verfolgt. Für Sequenzen siehe Abschnitt 3.8.2.

det, der bereits beim ersten System zum Einsatz gekommen war (P-as2B-FAM). Allerdings wurde im dritten Fall s2B als *target* RNA verwendet, ohne dass diese einen Fluoreszenzlöscher trug (siehe Abbildung 5.31 C). Beim zweiten und dritten Ansatz führte die Assoziation von binären Komplexen und *target* RNA nicht zu einer Fluoreszenzlöschung, wie dies bei Verwendung des *molecular beacons* beobachtet worden war. Statt dessen führte die veränderte chemische Umgebung nach Assoziation netto zu einer Fluoreszenzsignalzunahme. Folglich konnte bei Untersuchung von Dissoziationsprozessen mit den Systemen zwei und drei eine Netto-Abnahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden.

Zwar sollte es sich bei den drei verwendeten *target* RNAs (s2B-BHQ, as2B-FAM und s2B) um funktionelle *target* RNAs handeln, um die Relevanz des Modellsystems zu gewährleisten. Allerdings war es für die zunächst geplanten Studien zur Assemblierung des ternären Komplexes wichtig, dass es nicht zur Spaltung der *target* RNA kommt, um deren Erkennung und Bindung durch den binären Komplex isoliert betrachten zu können. Deshalb wurde im Folgenden die Tatsache verwendet, dass RNAi ein Prozess ist, der von divalenten Metallkationen abhängt. Durch Entzug von $MgCl_2$ oder die Komplexierung von Mg^{2+} mittels EDTA wird die *target* Spaltung inhibiert, kann aber durch Substitution mit Mg^{2+} wieder hergestellt werden [163, 200]. Entsprechende Bedingungen waren für das hier verwendete System mit rekombinantem GST-hAgo2 bereits getestet worden (siehe Abschnitt 5.5.4). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei der Inkubation eines Standard-Spaltungsassayansatzes in 1 × Ago-Bindungspuffer ohne $MgCl_2$ keine *target* RNA-Spaltung erfolgte. Die Assoziation des binären Komplexes

aus hAgo2 und *guide* RNA bei diesen Bedingungen wurde durch eine entsprechende *stopped flow* Messung belegt, bei der 300 nM NHA-hAgo2 rasch mit 20 nM P-as2B-FAM in 1 × Ago-Bindungspuffer gemischt und die Signaländerung aufgezeichnet wurde. Es konnte eine dreiphasige Bindungsreaktion beobachtet werden, deren Ratenkonstanten quasi identisch mit denjenigen in Anwesenheit von $MgCl_2$ ermittelten waren (1 × Ago-Spaltungspuffer mit 2 mM $MgCl_2$: $k_{1,\,obs} = 24{,}3\,(\pm\,9{,}1)\,s^{-1}$, $k_2 = 0{,}26\,(\pm\,0{,}16)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0122\,(\pm\,0{,}0024)\,s^{-1}$ (siehe Abschnitt 5.7); 1 × Ago-Bindungspuffer ohne $MgCl_2$: $k_{1,\,obs} = 25{,}4\,(\pm\,7{,}2)\,s^{-1}$, $k_2 = 0{,}11\,(\pm\,0{,}02)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0124\,(\pm\,0{,}0007)\,s^{-1}$). Somit konnten Bedingungen gefunden werden, bei denen es zur Assemblierung des ternären Komplexes ohne gleichzeitige Spaltung der *target* RNA kommt. Die Studien zur Charakterisierung der Erkennung und Bindung von *target* RNA wurden folglich in 1 × Ago-Bindungspuffer ohne Mg^{2+} durchgeführt. Für die Bildung binärer Komplexe wurden GST-hAgo2 und der jeweilige *guide* Strang (siehe Abbildung 5.31) verwendet.

5.8.2 Bestimmung der Affinität des binären Komplexes zur *target* RNA

Für die Messung der Affinität des binären Komplexes zur *target* RNA wurde mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration unter *steady state* Bedingungen die Dissoziationskonstante bestimmt. Hierfür wurde das *molecular beacon* (siehe Abbildung 5.31 A) verwendet. Zunächst wurden 20 nM P-as2B-FAM mit 600 nM GST-hAgo2 gemischt und bis zur Abnahme des Fluoreszenzsignals um ca 25 % inkubiert, um die Bildung von binären Komplexen zu gewährleisten (siehe Abschnitt 5.7.2). Danach wurde der binäre Komplex mit steigenden Konzentrationen s2B-BHQ titriert. Durch den Einsatz des Fluoreszenzlöschers konnte hierbei eine Signaländerung von annähernd 100 % erreicht werden. Durch mathematische Auswertung der Titrationskurve mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung wurde eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 0,18 (± 0,04) nM ermittelt (siehe Abbildung 5.32).

Die Wiederholung des Experiments mit einem binären Komplex aus 20 nM P-as2B-FAM und 1000 nM GST-hAgo2 brachte das gleiche Ergebnis. Außerdem wurde s2B-BHQ in Abwesenheit von P-as2B-FAM mit GST-hAgo2 titriert, was keinen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal ergab. Weiterhin wurde ein Hybrid aus P-as2B-FAM und s2B-BHQ mit steigenden Konzentrationen GST-hAgo2 gemischt, was ebenfalls keine Signaländerung zur Folge hatte. Deshalb ist davon auszugehen, dass überschüssiges Protein im Titrationsansatz keinen Einfluss auf die beobachtete Signaländerung besitzt.

Die Gleichgewichts-Fluoreszenztitration wurde in Abwesenheit von GST-hAgo2 wiederholt und so die Affinität der beiden komplementären Stränge P-as2B-FAM und s2B-BHQ zueinander bestimmt. Der K_d betrug 0,38 (± 0,13) nM. Da die beiden in An- bzw. Abwesenheit von GST-hAgo2 ermittelten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten einander gleichen, lässt dies den Schluss zu, dass die Bindung hauptsächlich durch die Watson-Crick-Basenpaarung der beiden RNAs vermittelt wird. Das Protein scheint nicht direkt an der Interaktion des binären Komplexes mit der *target* RNA beteiligt zu sein. Da s2B-BHQ 21 nt lang ist, kann es

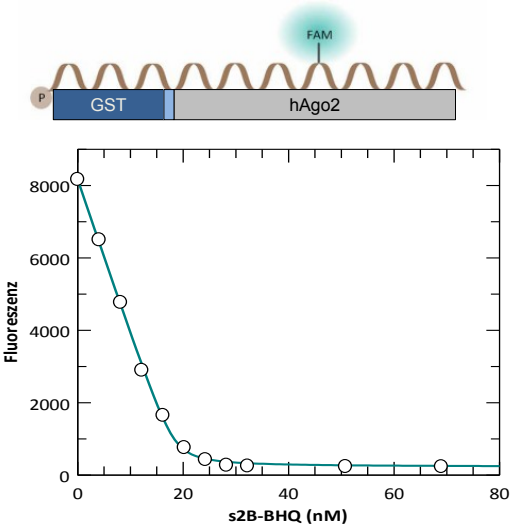


Abbildung 5.32: Bestimmung der Affinität des binären Komplexes zur *target* RNA (siehe Abschnitt 4.4.2). Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von einem binären Komplex aus 20 nM P-as2B-FAM und 600 nM GST-hAgo2 mit steigenden Konzentrationen s2B-BHQ. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab einen $K_d = 0{,}18\ (\pm 0{,}04)$ nM.

in der Tat nicht zu einer Interaktion mit GST-hAgo2 außerhalb der basischen Bindungsfurche zwischen den beiden Lappen kommen, da dieses *target* nicht darüber hinausragt. Für *T. thermophilus* Ago im ternären Komplex mit einer 21 nt langen *guide* DNA und 20 nt langen *target* RNA kommt es innerhalb dieser Bindungsfurche nicht zur Bildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der *target* RNA und Ago [119].

5.8.3 Kinetik der Bindungsreaktion von binärem Komplex und *target* RNA

Untersuchung der Assoziation von binärem Komplex und *target* RNA

Im Folgenden wurde die Bildung des ternären Komplexes unter *pre-steady state* Bedingungen untersucht. Hierfür kam erneut die *stopped flow* Technik zum Einsatz. Für die Beobachtung der Assoziation des ternären Komplexes wurde zunächst das *molecular beacon* System verwendet (siehe Abbildung 5.31 A). 600 nM GST-hAgo2 wurden mit 20 nM P-as2B-FAM gemischt und für mindestens 15 min bei 25 °*C* inkubiert, um die Bildung binärer Komplexe zu gewährleisten. Danach wurden die binären Komplexe rasch mit s2B-BHQ konstanter Konzentration gemischt und die Änderung des Fluoreszenzsignals verfolgt. Für jede *target* RNA-Konzentration wurden die Daten mathematisch mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 5.33 A).

Die Kinetik wird am besten durch eine dreifach exponentielle Gleichung beschrieben. Die erste schnelle Phase (siehe Abbildung 5.33 A, Darstellung bis 0,8 s) besitzt eine Ratenkonstan-

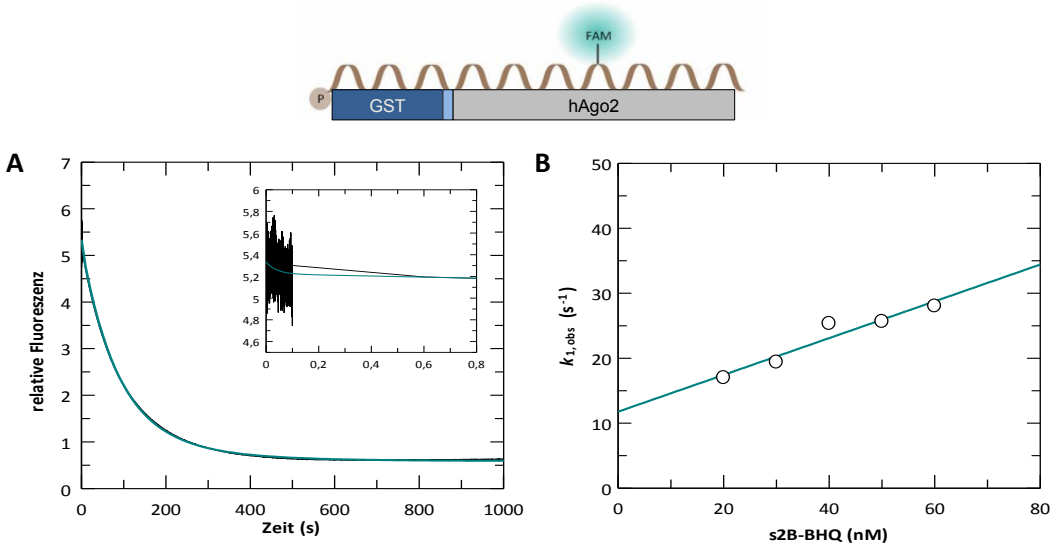


Abbildung 5.33: *Pre-steady state* Assoziationskinetik von binärem GST-hAgo2/P-as2B-FAM-Komplex und s2B-BHQ als *target* RNA (siehe Abschnitt 4.4.3). (A) Repräsentative *stopped flow* Messung der Bildung des ternären Komplexes aus 20 nM P-as2B-FAM sowie 600 nM GST-hAgo2 und 50 nM s2B-BHQ. Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{1,\,obs} = 25{,}7\,(\pm 1{,}9)\,s^{-1}$, $k_2 = 0{,}0123\,(\pm 0{,}00004)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0054\,(\pm 0{,}00005)\,s^{-1}$. (B) Abhängigkeit von $k_{1,\,obs}$ u. a. aus (A) von der s2B-BHQ-Konzentration. Es ergab sich $k_1 = 2{,}8\,(\pm 0{,}47) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ und $k_{-1} = 11{,}8\,(\pm 2{,}0)\,s^{-1}$.

te pseudo-erster Ordnung ($k_{1,\,obs}$). Sie ist linear abhängig von der *target* RNA-Konzentration (siehe Abbildung 5.33 B), woraus sich $k_1 = 2{,}8\,(\pm 0{,}47) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ ergibt. Analog zur Bildung des binären Komplexes (siehe Abschnitt 5.7.3) repräsentiert diese konzentrationsabhängige Phase aller Wahrscheinlichkeit nach die diffusionskontrollierte Bildung eines Kollisionskomplexes. Die Dissoziationsratenkonstante wurde näherungsweise aus dem Ordinatenabschnitt bestimmt und ergab $k_{-1} = 11{,}8\,(\pm 2{,}0)\,s^{-1}$.

Die zweite und dritte Phase sind konzentrationsunabhängig und besitzen kleinere Ratenkonstanten ($k_2 = 0{,}0131\,(\pm 0{,}0019)\,s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0048\,(\pm 0{,}0009)\,s^{-1}$, Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten). Vermutlich handelt es sich bei diesen Phasen um konformationelle Umlagerungen während der Assemblierung des ternären Komplexes zur Ausbildung einer katalytisch kompetenten Einheit.

Die Assoziation der ternären Komplexe wurde weiterhin mit den beiden anderen experimentellen Ansätzen (siehe Abschnitt 5.8.1) untersucht. Es wurden jeweils 20 nM *guide* RNA mit 600 nM GST-hAgo2 gemischt und für 15 min bei 25 °*C* inkubiert, so dass sich binäre Komplexe bildeten. Anschließend wurden diese rasch mit 20 nM der jeweiligen *target* RNA gemischt und die Fluoreszenzsignalzunahme beobachtet. Die Daten wurden mathematisch mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. Mit beiden Systemen konnten die bereits gewonnenen Ergebnisse zur Assoziation ternärer Komplexe bestätigt werden (siehe Tabelle 5.3).

guide RNA	*target* RNA	$k_{1,\,obs}$ (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_3 (s^{-1})	System
P-as2B-FAM	s2B-BHQ	17,0	0,0111	0,0034	siehe Abbildung 5.31 A
P-s2B	as2B-FAM	32,5	0,0110	0,0030	siehe Abbildung 5.31 B
P-as2B-FAM	s2B	34,3	0,0112	0,0025	siehe Abbildung 5.31 C

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Ratenkonstanten der Assoziationsreaktion von binärem GST-hAgo2/*guide* RNA-Komplex und *target* RNA mit drei unabhängigen experimentellen Ansätzen.

Um zu überprüfen, ob die Assoziation des ternären Komplexes auf der Komplementarität von *guide* und *target* RNA beruht, wurde eine Kontrollmessung durchgeführt, bei der 600 nM GST-hAgo2 in einem Fall mit der *guide* RNA P-s2B, im anderen Fall mit P-asGL3 für 15 min bei 25°*C* präinkubiert wurde, bevor die binären Komplexe rasch mit der nur zu P-s2B komplementären *target* RNA as2B-FAM gemischt wurde. Bei Komplementarität beider Nukleinsäuren konnte der bereits beschriebene Verlauf der Bindungskurve beobachtet werden. Im Fall der nicht-komplementären Stränge trat die erste schnelle Phase auf, wohingegen die Phasen zwei und drei nicht zu beobachten waren (siehe Abbildung 5.34 A und B). Die Ratenkonstante der schnellen Phase bei nicht-komplementärer *guide* und *target* RNA beträgt 24,0 ($\pm$ 8,9) s^{-1}. Dieses Ergebnis stellt einen weiteren Beleg dafür dar, dass es sich bei der ersten schnellen Phase bei der Assoziation ternärer Komplexe um die Bildung von Kollisionskomplexen handelt. Die Phasen zwei und drei erfordern demnach die Watson-Crick-Basenpaarung von *guide* und *target* RNA und laufen vermutlich sequentiell ab.

Als weitere Kontrolle wurde die Assoziation von *guide* und *target* RNA in Abwesenheit von GST-hAgo2 untersucht. Dafür wurden je 20 nM P-s2B und as2B-FAM rasch miteinander gemischt und die Änderung des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet. Die Auswertung der experimentellen Daten mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ergab kein sinnvolles Ergebnis. Die Auswertung anhand einer zweifach exponentiellen Gleichung zeigte, dass es sich bei der hAgo2-unabhängigen Hybridisierung von P-s2B und as2B-FAM um einen zweiphasigen Prozess handelt. Es ergaben sich $k_{1,\,obs} = 17{,}3\ (\pm 5{,}2)\ s^{-1}$ und $k_2 = 0{,}0056\ (\pm 0{,}00001)\ s^{-1}$ als Ratenkonstanten. Bei der ersten Phase handelt es sich vermutlich um die Kollision der beiden Stränge, da $k_{1,\,obs}$ der proteinunabhängigen Hybridisierung vergleichbar ist mit der GST-hAgo2-vermittelten Bindung der *target* RNA durch den binären Komplex. Die zweite in diesem Kontrollexperiment beobachtete Phase repräsentiert vermutlich die Bildung der Doppelhelix. Ihre Ratenkonstante ist etwa um den Faktor 2 langsamer als diejenige der zweiten Phase der proteinvermittelten *target* RNA-Bindung. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei dieser zweiten Phase um die Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren im *seed* Bereich handelt. Da die dritte Phase in Abwesenheit von GST-hAgo2 nicht zu beobachten ist, scheint diese einer konformationellen Änderung des Proteins zuzuordnen zu sein.

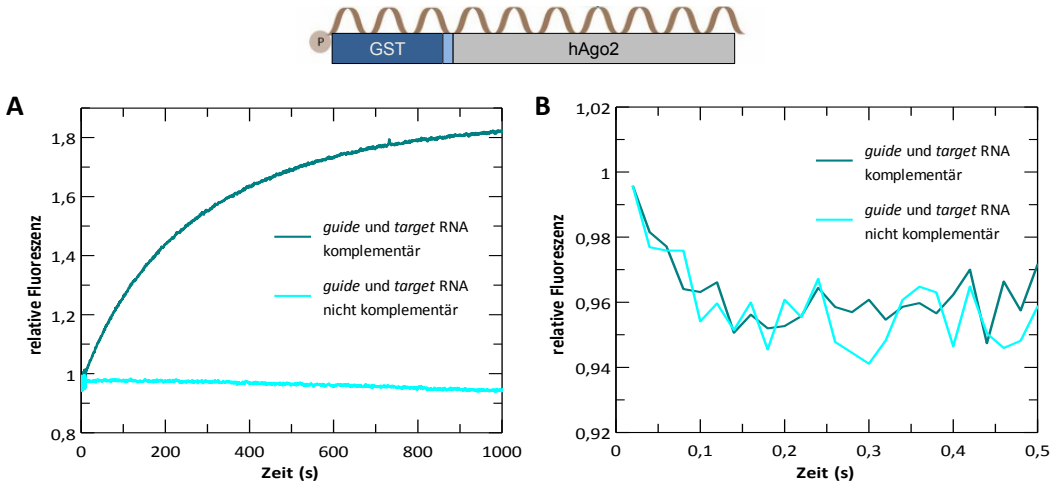


Abbildung 5.34: *Pre-steady state* Assoziationskinetik von binärem GST-hAgo2/*guide* RNA-Komplex und komplementärer bzw. nicht-komplementärer *target* RNA (siehe Abschnitt 4.4.3). (A) *Stopped flow* Messung der Bildung des ternären Komplexes aus 20 nM P-s2B bzw. P-asGL3 sowie 600 nM GST-hAgo2 und 20 nM as2B-FAM. Die Daten wurden im Fall der komplementären Stränge mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{1,\,obs} = 32{,}5\ (\pm 7{,}4)\ s^{-1}$, $k_2 = 0{,}0110\ (\pm 0{,}0003)\ s^{-1}$ und $k_3 = 0{,}0030\ (\pm 0{,}00002)\ s^{-1}$. Im Fall der nicht-komplementären Stränge war nur die erste Phase mit einer Ratenkonstante $k_{1,\,obs} = 24{,}0\ (\pm 8{,}9)\ s^{-1}$ zu beobachten. (B) Vergrößerung der ersten 0,5 s der Messung aus (A) zur Darstellung der ersten Phase, die sowohl bei der Verwendung komplementärer als auch nicht-komplementärer *guide* und *target* RNA auftritt.

Untersuchung der Dissoziation von binärem Komplex und *target* RNA

Im nächsten Schritt wurde die Dissoziation des ternären Komplexes unter *pre-steady state* Bedingungen beobachtet. Dazu wurde die *target* RNA durch einen 100-fachen Überschuss nicht-markierten Kompetitors aus dem ternären Komplex verdrängt und die Änderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Das *molecular beacon* (siehe Abbildung 5.31 A) war hierfür nicht geeignet, da die Zugabe eines großen Überschusses Kompetitor-RNA zur Änderung des Fluoreszenzsignals führte. Somit kam es zur Überlagerung von verschiedenen Prozessen, die eine Auswertung der Daten nicht möglich machte. Aus diesem Grund wurde die Dissoziation ternärer Komplexe mit dem System 3 (siehe Abbildung 5.31 C) untersucht.

Zunächst wurden 600 nM GST-hAgo2 mit *guide* RNA für 10 min bei 25 °*C* inkubiert, woraufhin 20 nM *target* RNA hinzu gegeben wurde. Die ternären Komplexe wurden rasch mit 2000 nM unmarkierter *guide* RNA gemischt und die zeitabhängige Signaländerung aufgezeichnet. Für die Beobachtung schneller Ratenkonstanten wurde das Experiment mit Hilfe einer *stopped flow* Anlage durchgeführt, während die Messung sehr langsamer Ratenkonstanten durch ein Fluoreszenzspektrometer erfolgte (siehe Abbildung 5.35).

Die für den Zerfall des ternären Komplexes per dreifach exponentieller Gleichung ermittelten Geschwindigkeitsratenkonstanten betragen $k_{-1} = 2{,}1\ (\pm 0{,}25)\ s^{-1}$, $k_{-2} = 0{,}0024\ (\pm 0{,}0002)\ s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0003\ (\pm 0{,}00006)\ s^{-1}$ für das mittels *stopped flow* Anlage durchgeführte Experiment.

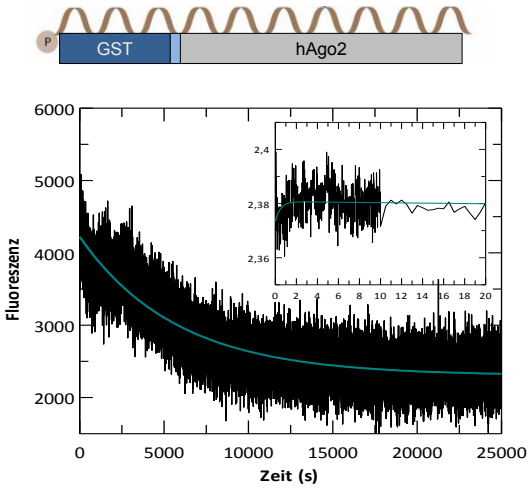


Abbildung 5.35: *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von binärem Komplex und *target* RNA (siehe Abschnitt 4.4.3). Messung des Zerfalls von ternären Komplexen aus 20 nM P-as2B-FAM und 600 nM GST-hAgo2 sowie 20 nM s2B in binäre GST-hAgo2/*guide* RNA-Komplexe und die freie *target* RNA in Anwesenheit von 2000 nM as2B. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers oder einer *stopped flow* Anlage (Darstellung bis 20 s). Die Daten wurden mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{-1} = 2{,}1\ (\pm 0{,}25)\ s^{-1}$, $k_{-2} = 0{,}0024\ (\pm 0{,}0002)\ s^{-1}$ und $k_{-3} = 0{,}0003\ (\pm 0{,}00006)\ s^{-1}$ (*stopped flow*) bzw. $0{,}0002\ s^{-1}$ (Fluoreszenzspektrometer).

Die dritte, langsame Phase war nach Beendigung des maximalen Messzeitraumes (1.000 s) nicht abgeschlossen, weshalb das Experiment wiederholt und die Fluoreszenzänderung über einen Zeitraum von 34.000 s mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet wurde. Mit dieser Technik konnten auf Grund geringerer Sensitivität die ersten beiden Phasen nicht beobachtet werden. Allerdings wurde die Existenz der dritten, langsamen Phase mit einer Ratenkonstante von $0{,}0002\ s^{-1}$ bestätigt. Vermutlich repräsentiert k_{-1} den Zerfall von Kollisionskomplexen; diejenige mittels Konzentrationsabhängigkeit von $k_{1,\ obs}$ mathematisch ermittelte Ratenkonstante beträgt $11{,}8\ s^{-1}$. Die zweite und dritte Phase bei der Dissoziation ternärer Komplexe entsprechen vermutlich konformationellen Umlagerungen und stellen die Rückreaktionen der Phasen zwei und drei der Assoziation dar. Da die dritte Phase nur in Anwesenheit von GST-hAgo2, nicht jedoch bei seiner Abwesenheit, auftritt, handelt es sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach um eine konformationelle Umlagerung des Proteins. Die zweite Phase könnte die Entwindung der komplementären *guide* und *target* Stränge darstellen. Es wurde eine mögliche Dissoziation von *guide* und *target* RNA in Abwesenheit von GST-hAgo2 untersucht, jedoch konnte keine Signaländerung festgestellt werden. Demnach handelt es sich beim hier beobachteten Zerfall ternärer Komplexe um einen proteinvermittelten Prozess.

Die Interpretation der biochemischen und kinetischen Daten wird gestützt durch die strukturellen Informationen des *T. thermophilus* Agos sowie weiteren biochemischen Daten aus der Literatur. Die Erkennung der *target* RNA durch den binären Komplex erfolgt vermutlich über

den *seed* Bereich [259]. Dabei wird im binären Komplex der *guide* Strang derart positioniert, dass die Basen 2 – 8 optimal zugänglich sind für die *target* RNA [28]. Dies stellt die Ausgangssituation der hier gezeigten Experimente zur Erkennung und Bindung der *target* RNA durch den binären Komplex dar. Bei perfekter Komplementarität, wie es hier der Fall ist, bilden *guide* und *target* Strang ein Hybrid, das weniger als eine Umdrehung umfasst. Dieser Zustand wird gut durch einen Komplex aus dem *T. thermophilus* Ago, einer 21 nt langen *guide* DNA und einer 12 nt langen *target* RNA repräsentiert. In diesem Komplex bleibt das 3'-Ende des *guide* Stranges gebunden (siehe Abbildung 2.8 C) [120]. Der Vergleich der Röntgenstruktur des binären *T. thermophilus* Ago/*guide* DNA-Komplexes [28] und des den 12 nt langen *target* RNA Strang enthaltenden ternären Komplexes (siehe Abbildung 2.8 B und C) macht deutlich, dass bei der Bildung dieses ternären Komplexes eine konformationelle Umlagerung von Ago erfolgt [120]. Hierbei kommt es zur Erweiterung der basischen Bindungsfurche, so dass genug Raum für die Bindung der *target* RNA geschaffen wird. Die zweite hier beobachtete Phase repräsentiert möglicherweise diese konformationelle Änderung des ternären Komplexes. Die zugehörigen Ratenkonstanten wären $k_2 = 0{,}0131\,\mathrm{s}^{-1}$ und $k_{-2} = 0{,}0024\,\mathrm{s}^{-1}$.

Wenn über den *seed* Bereich hinaus eine kritische Anzahl an Basenpaarungen ausgebildet wird, kommt es zur Freisetzung des 3'-Endes des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne und zur Hybridisierung von *guide* und *target* RNA unter Einnahme einer A-Konformation. Dieser Zustand wird repräsentiert durch einen ternären Komplex, bei dem *T. thermophilus* Ago an eine 21 nt lange *guide* DNA und eine 15 nt lange *target* RNA gebunden vorliegt (siehe Abbildung 2.8 D) [120]. Auch dieser Prozess ist mit einer konformationellen Änderung verbunden. Es kommt vornehmlich zu einer Rotation der PAZ Domäne sowie einer positionellen Verschiebung der Bereiche L1 und L2 der PIWI Domäne. Die dritte Phase könnte dieser konformationellen Umlagerung entsprechen. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass die dritte Phase bei der Dissoziation des binären Komplexes eine sehr ähnliche Ratenkonstante aufweist wie die dritte Phase bei der Assoziation des ternären Komplexes ($k_{-3,\,\mathrm{binär}} = 0{,}0066\,\mathrm{s}^{-1}$; $k_{3,\,\mathrm{ternär}} = 0{,}0048\,\mathrm{s}^{-1}$). Es besteht also die Möglichkeit, dass zunächst die Verankerung des 3'-Endes des *guide* Stranges in der PAZ Domäne erfolgen muss. Als Gründe wären eine erhöhte Stabilität des binären Komplexes, besserer Schutz vor Exonukleasen in der Zelle oder ein molekularer Schalter während der *target* RNA-Erkennung denkbar. Sobald über eine perfekte Komplementarität des *seed* Bereiches die gebundene RNA als spaltbares *target* für den binären Komplex identifiziert wurde, kommt es zur Freisetzung des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne. Die einhergehenden konformationellen Änderungen führen aller Wahrscheinlichkeit nach dazu, dass ein katalytisch kompetenter Komplex gebildet wird. Das hier beschriebene kinetische Modell der *target* RNA-Erkennung und -Bindung ist daher sehr konsistent mit den strukturellen Daten der prokaryonten Argonaute Proteine.

Ausgehend von den Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten konnte unter Verwendung von Gleichung 5.1 die Dissoziationskonstante berechnet werden. Sie beträgt 0,09 nM

und ist somit konsistent mit derjenigen mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration ermittelten (0,18 nM; siehe Abschnitt 5.8.2).

5.8.4 Zusammenfassung der biochemischen und kinetischen Parameter bei der Bildung eines ternären Komplexes

Für eine bessere Übersicht sind die Ergebnisse zur Bindung der *target* RNA durch den binären hAgo2/*guide* RNA-Komplex an dieser Stelle tabellarisch aufgeführt.

target RNA	K_d (nM)		k_1	k_{-1}	k_2	k_{-2}	k_3	k_{-3}
	FT	ber.	($M^{-1}s^{-1}$)	(s^{-1})	(s^{-1})	(s^{-1})	(s^{-1})	(s^{-1})
s2B-BHQ	0,18	0,09 *	$2{,}8 \times 10^8$	11,8	0,0131		0,0048	
s2B				2,1		0,0024		0,0003

Tabelle 5.4: Übersicht über die biochemischen und kinetischen Parameter bei Bildung eines ternären Komplexes. Mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration (FT) experimentell bestimmte oder berechnete (ber.) Dissoziationskonstanten sowie Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für die Bildung eines ternären Komplexes aus binärem GST-hAgo2/*guide* RNA-Komplex und *target* RNA. * Für die Berechnung der Dissoziationskonstante wurde der direkt mittels Verdrängungsexperiment ermittelte Wert für k_{-1} verwendet.

5.9 Charakterisierung der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 [6]

Der zentrale Prozess bei der siRNA-vermittelten RNAi ist die sequenzspezifische Spaltung der *target* RNA an der kanonischen Position gegenüber dem Phosphatrückgrat zwischen dem 10. und 11. Nukleotid des *guide* Stranges. Im Folgenden wurde dieser Prozess im Detail untersucht. Dabei kamen sowohl Standard-Spaltungsassays als auch modifizierte Spaltungsassays unter Verwendung von GST-hAgo2 zum Einsatz, um diverse Fragestellungen zu beleuchten (siehe Abschnitt 4.4.1).

Bereits in Abschnitt 5.5.2 konnte gezeigt werden, dass die in dieser Studie verwendeten rekombinanten Proteine GST-hAgo2 und NHA-hAgo2 Spaltungsaktivität besitzen (siehe Abbildung 5.12 A, C und D). Dabei zeigte GST-hAgo2 mit über 90 % einen bemerkenswert hohen Umsatz der *target* RNA. Dies eröffnete die Möglichkeit für vergleichende Experimente, bei denen nur ein geringer Umsatz stattfand, so wie die Analyse der Spaltungsreaktion zu frühen Zeitpunkten oder der Einsatz von doppelsträngiger siRNA.

[6] Die in Abschnitt 5.9 beschriebenen Experimente wurden teilweise in Zusammenarbeit mit S. Willkomm im Rahmen der Betreuung ihrer Masterarbeit durchgeführt.

5.9.1 Untersuchung der *target* RNA-Spaltung auf die Existenz einer *burst* Phase

RISC bzw. Ago sind in der Lage, multiple Zyklen von Katalyse zu durchlaufen (*multiple turnover*) [61, 62]. Dabei können von einem RISC mehr als 50 *target* RNAs gespalten werden [63]. Auch in den hier beschriebenen Studien konnte *multiple turnover* unter Standard-Spaltungsassay-Bedingungen beobachtet werden, obwohl die *target* RNA gegenüber der maximal möglichen Konzentration an aktivem binären hAgo2/*guide* RNA-Komplexen im 40-fachen Unterschuss vorlag (2,5 nM *target* RNA *versus* 100 nM binärer Komplex). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass vermutlich nicht alle binären Komplexe enzymatisch aktiv sind, da die verschiedenen Proteinpräparationen einen Teil nicht vollständig translatierter hAgo2-Moleküle beinhaltet (siehe Abschnitt 5.4).

Wie bereits in Abschnitt 5.5.2 ausgeführt, ist die siRNA-vermittelte Spaltung von *target* RNA durch hAgo2 ein ungewöhnlich langsamer Prozess. Zunächst wurde untersucht, ob unter den gewählten Bedingungen eine Phase zu beobachten war, bei der es zu einer raschen Zunahme von Spaltprodukten kam (*burst* Phase). Zu diesem Zweck wurde ein Standard-Spaltungsassay durchgeführt und die Reaktion zu verschiedenen frühen Zeitpunkten gestoppt. Der Umsatz wurde ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen (siehe Abbildung 5.36).

Die Daten wurden alternativ mit Hilfe einer einfach oder zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet. Für die einfach exponentielle Auswertung ergab die Geschwindigkeitskonstante

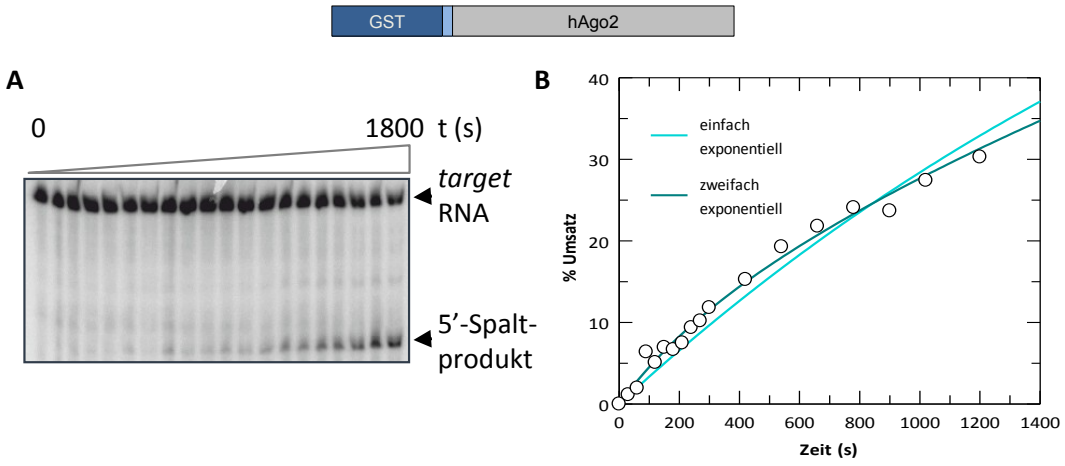


Abbildung 5.36: Kinetik der *guide* RNA-vermittelten Spaltungsreaktion von *target* RNA durch GST-hAgo2 (siehe Abschnitt 4.4.1). (A) Standard-Spaltungsassay mit 3,7 μM GST-hAgo2 mit anschließender denaturierender PAGE und Detektion mittels Autoradiographie. (B) Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mathematisch ausgewertet. Die Auswertung mittels einfach exponentieller Gleichung ergab die Ratenkonstante $k = 0{,}0004\,(\pm 0{,}00001)\,s^{-1}$ mit eine Amplitude von 91,2 ($\pm$ 1,8) %. Die Auswertung mittels zweifach exponentieller Gleichung ergab zwei Ratenkonstanten $k_1 = 0{,}0040\,(\pm 0{,}0027)\,s^{-1}$ mit eine Amplitude von 6,4 ($\pm$ 3,6) % und $k_2 = 0{,}0003\,(\pm 0{,}00004)\,s^{-1}$ mit einer Amplitude von 85,1 ($\pm$ 3,7) %. t: Zeit.

$k = 0{,}0004\,(\pm\,0{,}00001)\,s^{-1}$, die derjenigen der Gesamtreaktion (*multiple turnover*) entspricht. Die Amplitude betrug 91,2 (± 1,8) %. Die Auswertung der Daten durch eine zweifach exponentielle Gleichung führte zu zwei verschiedenen Ratenkonstanten, $k_1 = 0{,}0040\,(\pm\,0{,}0027)\,s^{-1}$ mit einer Amplitude von 6,4 (± 3,6) % sowie $k_2 = 0{,}0003\,(\pm\,0{,}00004)\,s^{-1}$ mit einer Amplitude von 85,1 (± 3,7) %. Dieses Ergebnis deutet auf die Existenz einer *burst* Phase hin, wobei ihre Amplitude auf Grund der geringen Konzentration initial gebildeter ternärer Komplexe klein ist. Ihre Ratenkonstante würde die *single turnover* Reaktion repräsentieren. Allerdings muss dieser Wert unter Vorbehalt betrachtet werden, da die Amplitude der *burst* Phase nahe der Detektionsgrenze des experimentellen Systems liegt.

5.9.2 Vergleichende Analyse der *target* RNA-Spaltung bei Verwendung unterschiedlicher siRNA-Substrate

In Abschnitt 5.7.2 wurde gezeigt, dass GST-hAgo2 neben der Bindung einer 5'-phosphorylierten *guide* RNA auch in der Lage ist, unphosphorylierte *guide* RNA und doppelsträngige siRNA zu binden. Im Folgenden wurde untersucht, ob eine *target* RNA-Spaltung bei Verwendung dieser siRNA-Substrate stattfindet.

Hierzu wurden Standard-Spaltungsassays durchgeführt, bei denen P-as2B, OH-as2B und P-si2B in Kombination mit GST-hAgo2 verwendet wurden. Als Negativkontrollen dienten die nicht zur *target* RNA komplementären siRNA-Substrate P-asLam, OH-asLam und P-siLam. Aus Abbildung 5.37 A wird ersichtlich, dass neben der *target* RNA-Spaltung durch den binären GST-hAgo2/P-as2B-Komplex auch Umsatz durch GST-hAgo2/OH-as2B und GST-hAgo2/P-si2B stattfindet.

Die Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und jeweils der maximale Umsatz sowie die Ratenkonstante der Gesamtreaktion durch Angleichen der Daten an eine exponentielle Gleichung ermittelt (siehe Abbildung 5.37 B). Die Reaktion findet mit vergleichbarer Ratenkonstante statt, unabhängig davon, mit welchem siRNA-Substrat GST-hAgo2 beladen wurde. Dies deutet darauf hin, dass in allen drei Fällen die Spaltung nach dem gleichen Mechanismus stattfindet. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der maximale *target* RNA-Umsatz. Der Umsatz durch GST-hAgo2/P-as2B ist mit 85,8 (± 3,8) % am größten. Ohne die 5'-Phosphatgruppe am *guide* Strang nimmt der maximale Umsatz im Vergleich zu GST-hAgo2/P-as2B um etwa 9 % auf 78,4 (± 6,3) % ab. Erstaunlicherweise gelang auch die Spaltung einer *target* RNA unter Verwendung von P-si2B als siRNA-Substrat, wobei die Programmierung von rekombinantem hAgo2 mit doppelsträngiger siRNA in einem *in vitro* Spaltungsansatz bisher als unmöglich galt [35]. Der hier erzielte maximale *target* RNA-Umsatz beträgt 27,6 (± 3,0) % und liegt damit um etwa 68 % niedriger als derjenige durch GST-hAgo2/P-as2B.

Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis durch eine möglicherweise unvollständige Hybridisierung von P-as2B und s2B und damit durch die Anwesenheit von einzelsträngigem P-as2B im Spaltungsansatz erzielt wurde, erfolgte die radioaktive 5'-Endmarkierung beider Einzelsträn-

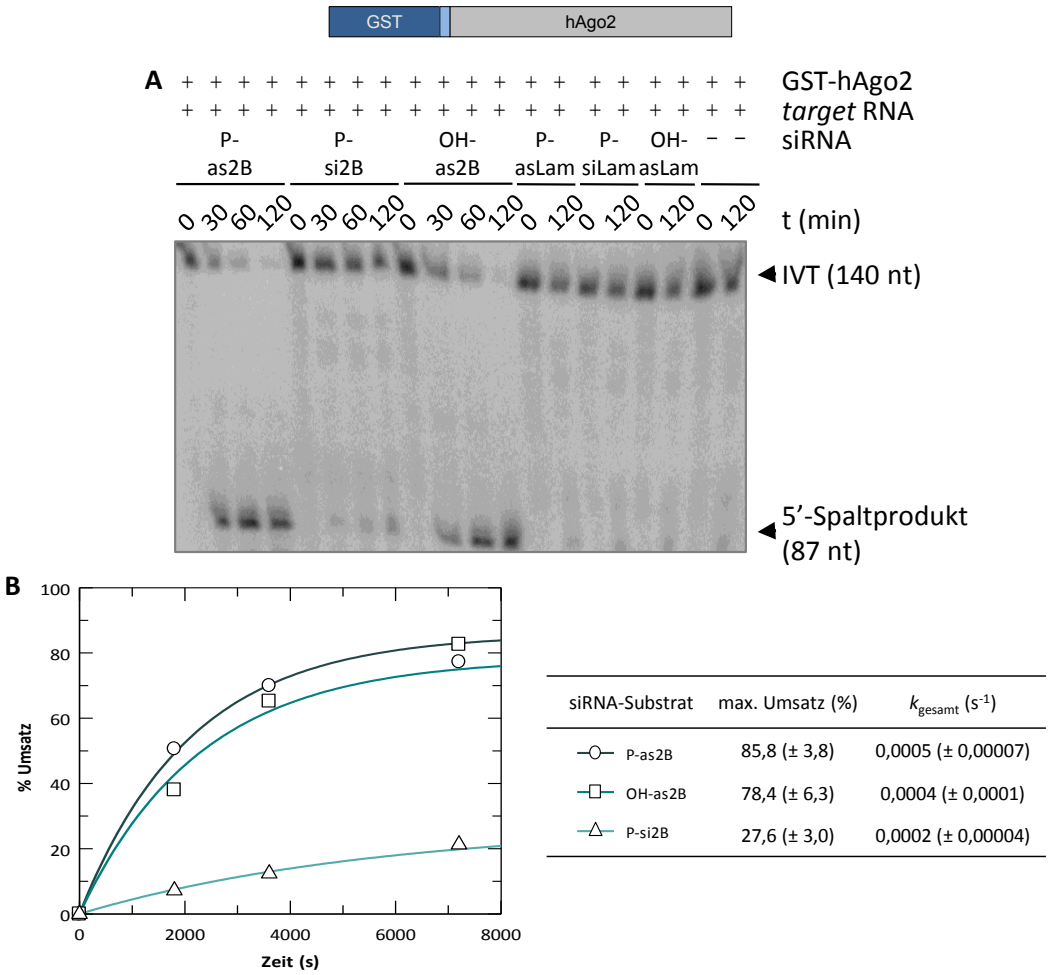


Abbildung 5.37: Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 nach Programmierung mit drei verschiedenen siRNA-Substraten (siehe Abschnitt 4.4.1). (A) Standard-Spaltungsassays mit 3,7 μM GST-hAgo2 und je 100 nM P-as2B, OH-as2B oder P-si2B als siRNA bzw. den entsprechenden Negativkontroll-siRNAs mit anschließender denaturierender PAGE und Detektion mittels Autoradiographie. (B) Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und die korrespondierenden Raten $k_{\text{gesamt, P-as2B}} = 0{,}0005\,(\pm\,0{,}00007)\,s^{-1}$, $k_{\text{gesamt, OH-as2B}} = 0{,}0004\,(\pm\,0{,}0001)\,s^{-1}$ sowie $k_{\text{gesamt, P-si2B}} = 0{,}0002\,(\pm\,0{,}00004)\,s^{-1}$ durch Anpassung der experimentellen Daten an eine einfach exponentielle Gleichung ermittelt. t: Zeit. IVT: ICAM-1 *in vitro* Transkript als *target* RNA.

ge und die Kontrolle des Hybridisierungserfolges auf einem nicht-denaturierenden PAA-Gel. Es zeigte sich, dass die beiden komplementären Stränge vollständig hybridisierten. Für eine weitere Bestätigung des beobachteten Ergebnisses wurde ein Spaltungsassay durchgeführt, bei dem statt des 140 nt langen ICAM-1-IVT die 21 nt lange, zum *guide* Strang vollständig komplementäre RNA s2B als *target* RNA diente. Es wurden 3,7 μM GST-hAgo2 mit 100 nM P-si2B und 2,5 nM radioaktiv markierter s2B in 1 × Ago-Bindungspuffer in Anwesenheit von 1 μg/μl tRNA gemischt und für 8 min bei 25 $°C$ präinkubiert, um die Assemblierung von ternären Komplexen zu ermöglichen. Zum Reaktionsstart wurde dem Ansatz 0,5 mM $MgCl_2$

zugefügt. Nach Beendigung der Reaktion zu den gewünschten Zeitpunkten, Trennung der Ansätze mittels Sequenziergel und anschließender Autoradiographie wurden die ermittelten *target* RNA-Umsätze gegen die Zeit aufgetragen. Die mathematische Auswertung der experimentellen Daten erbrachte einen maximalen Umsatz von 29,1 (± 6,0) % bei einer Ratenkonstanten von 0,0002 (± 0,00006) s^{-1}. Somit konnte die durch eine doppelsträngige siRNA vermittelte *target* RNA-Spaltung durch GST-hAgo2 reproduziert werden.

5.9.3 Michaelis-Menten-Kinetik der Spaltungsreaktion

Für eine kinetische Charakterisierung des *target* RNA-Umsatzes durch einen binären GST-hAgo2/P-as2B-Komplex wurde die Spaltung von ICAM-1-IVT in Abhängigkeit von der *guide* RNA-Konzentration untersucht. Es wurden je 2,5 μM GST-hAgo2 mit 2,5 nM *target* RNA und 15 – 400 nM P-as2B als limitierenden Faktor für die Bildung binärer Komplexe inkubiert. Die Ratenkonstante jeder Reaktion wurde mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ermittelt (siehe Abbildung 5.38 A) und gegen die Konzentration von binärem Komplex aufgetragen. Es ergab sich für $V_{max} = 0{,}0009\ (\pm 0{,}0002)\ nMs^{-1}$ und für $K_m = 21{,}4\ (\pm 13{,}1)$ nM (siehe Abbildung 5.38 B).

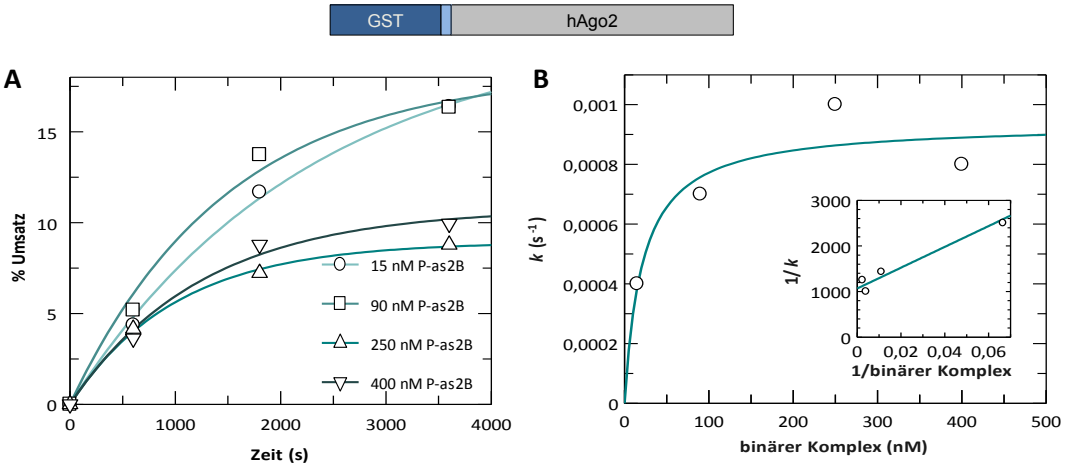


Abbildung 5.38: Michaelis-Menten-Kinetik der *guide* RNA-vermittelten Spaltungsreaktion von *target* RNA durch GST-hAgo2 (siehe Abschnitt 4.4.1). (A) Mathematische Auswertung der *target* RNA-Spaltung durch 2,5 μM GST-hAgo2 und 15 – 400 nM *guide* RNA zur Ermittlung der korrespondierenden Ratenkonstanten. (B) Die ermittelten Ratenkonstanten wurden gegen die Konzentration des binären Komplexes aufgetragen und $V_{max} = 0{,}0009\ (\pm 0{,}0002)\ nMs^{-1}$ sowie $K_m = 21{,}4\ (\pm 13{,}1)$ nM ermittelt.

5.9.4 Untersuchungen zur Bestimmung der Ratenkonstante der Phosphodiesterhydrolyse

Laut dem Modell von Rana unterliegt der Teilprozess Erkennung und Bindung der *target* RNA – Spaltung – Freisetzung der Produkte kinetischer Kontrolle (siehe Abbildung 2.9 B) [22]. Vermutlich stellt die Freisetzung der Spaltprodukte hierbei den limitierenden Faktor dar [63]. Dies impliziert, dass durch die Gesamtreaktion nicht die Geschwindigkeitskonstante des katalytischen Schrittes, also der Phosphodiesterhydrolyse, ermittelt werden kann. Zu diesem Zweck muss ein experimentelles System entwickelt werden, dass die Assemblierung ternärer Komplexe ohne die gleichzeitige Spaltung der *target* RNA erlaubt. Dies war bereits im Rahmen der Charakterisierung der *target* RNA-Bindung durch den binären Komplex erfolgt (siehe Abschnitt 5.8.1). Weiterhin muss die Spaltung der *target* RNA zu einem beliebigen Zeitpunkt induzierbar sein. Geeignete Bedingungen wurden im Rahmen der Untersuchung zur Mg^{2+}-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion ermittelt (siehe Abschnitt 5.5.4). Die letzte Anforderung an das experimentelle System besteht darin, multiplen Umsatz zu unterbinden. Dies kann durch die Verwendung einer kompetierenden RNA erfolgen, die zu Beginn der Spaltungsreaktion in großem Überschuss zugesetzt wird und binäre Komplexe absättigen kann. Es wurde ein etwa 150 nt langer Poly-A-Strang eingesetzt, der im 500-fachen Überschuss zum binären Komplex vorlag. Dadurch konnten sowohl nicht aktive binäre Komplexe als auch freies Protein abgesättigt werden. Abbildung 5.39 gibt einen Überblick über den experimentellen Aufbau.

In einem ersten Experiment konnte bestätigt werden, dass der größte Anteil der beobachtbaren *target* RNA-Spaltung auf *multiple turnover* zurückzuführen ist und dieser durch den

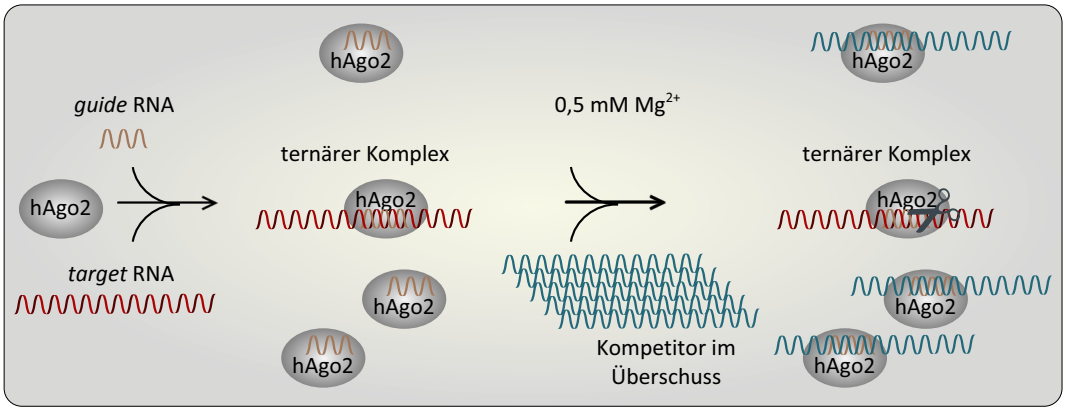


Abbildung 5.39: Schema des experimentellen Aufbaus zur Untersuchung des katalytischen Schrittes der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2. Zunächst erfolgt die Assemblierung von hAgo2, *guide* und *target* RNA. Da die Konzentration der *target* RNA geringer als diejenige von Protein und *guide* RNA ist, entstehen neben ternären auch binäre Komplexe ohne gebundene *target* RNA. Zum Start der Phosphodiesterhydrolyse wird dem Ansatz 0,5 mM $MgCl_2$ zugesetzt. Gleichzeitig erfolgt die Zugabe eines großen Überschusses kompetierender RNA, die binäre Komplexe absättigt. Dadurch wird multipler Umsatz verhindert.

Einsatz der kompetierenden Poly-A-RNA unterbunden wird. Hierzu wurden 3,7 μM GST-hAgo2 mit 100 nM P-as2B und 2,5 nM radioaktiv markiertem ICAM-1-IVT in 1 × Ago-Bindungspuffer für ca. 15 min bei 25 $°C$ inkubiert. Zum Reaktionsstart wurden 0,5 mM $MgCl_2$ sowie 45 μM Poly-A-RNA zugegeben. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die Ansätze durch ein denaturierendes Sequenziergel aufgetrennt. In einem Kontrollansatz, bei dem keine Poly-A-RNA zugesetzt worden war, war Umsatz der *target* RNA beobachtbar. Im Gegensatz dazu konnte bei Einsatz der kompetierenden RNA kein Umsatz detektiert werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Kompetition radioaktiv markierter *target* RNA mit der nicht radioaktiven Poly-A-RNA erfolgreich war. Vermutlich ist die Konzentration der initial gebildeten Komplexe und dadurch die Spaltung der *target* RNA so gering, dass sie mit dem verwendeten System nicht zu detektieren war.

Zur Optimierung des Experiments wurde die Konzentration von hAgo2 auf 14,8 μM und der *guide* RNA auf 240 nM erhöht, um eine größere Konzentration von aktiven binären Komplexen zu erhalten, die initial die *target* RNA binden können. Weiterhin wurde die *target* RNA-Konzentration von 2,5 nM auf 240 nM erhöht, um die Detektionsgrenze der mittels Autoradiographie visualisierten RNA-Banden im Sequenziergel zu überschreiten. Das erneut durchgeführte Experiment zeigte jedoch ebenfalls keinen Erfolg (siehe Abbildung 5.40). Zwar konnte nun auch bei Einsatz der kompetierenden Poly-A-RNA ein *target* RNA-Umsatz detektiert werden, jedoch ist die Amplitude der Spaltung zu gering. Eine mathematische Auswertung

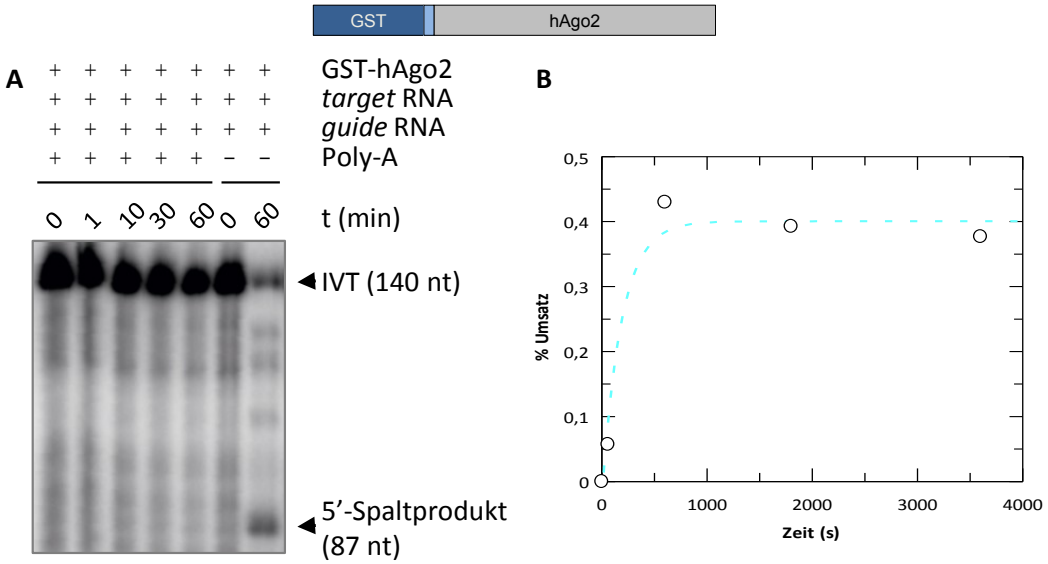


Abbildung 5.40: Spaltungsaktivität präassemblierter ternärer Komplexe in An- und Abwesenheit kompetierender RNA. Durchführung siehe Text. (A) Spaltungsassay mit 14,8 μM GST-hAgo2, 240 nM P-as2B und 240 nM ICAM-1-IVT nach Präassemblierung mit anschließender denaturierender PAGE und Detektion mittels Autoradiographie. (B) Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen, jedoch ist der Gesamtumsatz von 0,4 % zu gering für eine mathematische Auswertung. t: Zeit. IVT: ICAM-1 *in vitro* Transkript als *target* RNA.

der experimentellen Daten war nicht möglich. Weitere Experimente zeigten, dass sowohl eine stärkere Erhöhung der GST-hAgo2-Konzentration als auch der der *target* RNA zu Aggregation führte. Deshalb ist die Etablierung eines sensitiveren Systems oder die drastische Steigerung des *single turnover* Umsatzes notwendig, um die präliminären Daten aus Abschnitt 5.9.1 zu bestätigen und eine robuste Geschwindigkeitsratenkonstante der Phosphodiesterhydrolyse zu ermitteln.

5.10 Charakterisierung der Produktfreisetzung nach *target* RNA-Spaltung

5.10.1 Experimentelles System zur Untersuchung der Freisetzung von Spaltprodukten

Da hAgo2 ein zum multiplen Umsatz fähiges Enzym ist, muss für die Regeneration des *target* RNA-bindenden binären Komplexes nach der Phosphodiesterhydrolyse die Freisetzung der Spaltprodukte erfolgen. Nach heutigem Kenntnisstand stellt dieser Prozess den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der siRNA-vermittelten RNAi dar. In *D. melanogaster* Embryolysat kann die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion durch Zugabe von ATP zu einem *in vitro* Spaltungsansatz um den Faktor 4 gesteigert werden [63]. Bei der Verwendung von rekombinantem GST-hAgo2 statt einem Zelllysat konnte ATP die Reaktion nicht beschleunigen [62]. Es muss also im RISC eine Komponente geben, die ATP-abhängig die Spaltproduktfreisetzung beschleunigt, und diese ist nicht identisch mit hAgo2.

Für die Untersuchung der Freisetzung von Spaltprodukten aus dem ternären Komplex nach der Katalyse wurde erneut das fluoreszenzbasierte System verwendet, das aus dem *guide* Strang P-as2B-FAM und der *target* RNA s2B-BHQ besteht (siehe Abbildung 5.41). Ein ternärer Komplex aus GST-hAgo2, P-as2B-FAM und s2B-BHQ wurde in Anwesenheit von $MgCl_2$ inkubiert, um Spaltprodukte zu bilden. Durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses as2B wurden die aus dem ternären Komplex dissoziierenden Spaltprodukte gebunden und eine Reassoziation ausgeschlossen. Dieser Prozess wurde durch die Zunahme des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Zeit beobachtet.

Um die Spaltung von s2B-BHQ bei der beschriebenen experimentellen Anordnung zu testen, wurden Spaltungsassays durchgeführt, bei denen s2B bzw. s2B-BHQ am 5'-Ende radioaktiv markiert und als *target* RNA eingesetzt wurden. Als *guide* RNA wurde jeweils entweder P-as2B oder P-s2B-FAM verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass Umsatz von s2B-BHQ stattfindet, wenn P-as2B oder P-as2B-FAM als *guide* Strang verwendet wurden (siehe Abbildung 5.42 A). In beiden Fällen ist jedoch der maximale Umsatz geringer als der von s2B. Weil die enzymatische Aktivität von GST-hAgo2 mit seiner Lagerung über mehrere Monate abnimmt, wurde der maximale Umsatz von s2B-BHQ zu demjenigen von s2B ins Verhältnis gesetzt (siehe Abbildung 5.42 B).

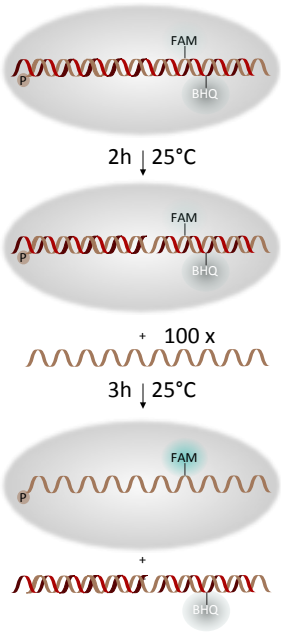
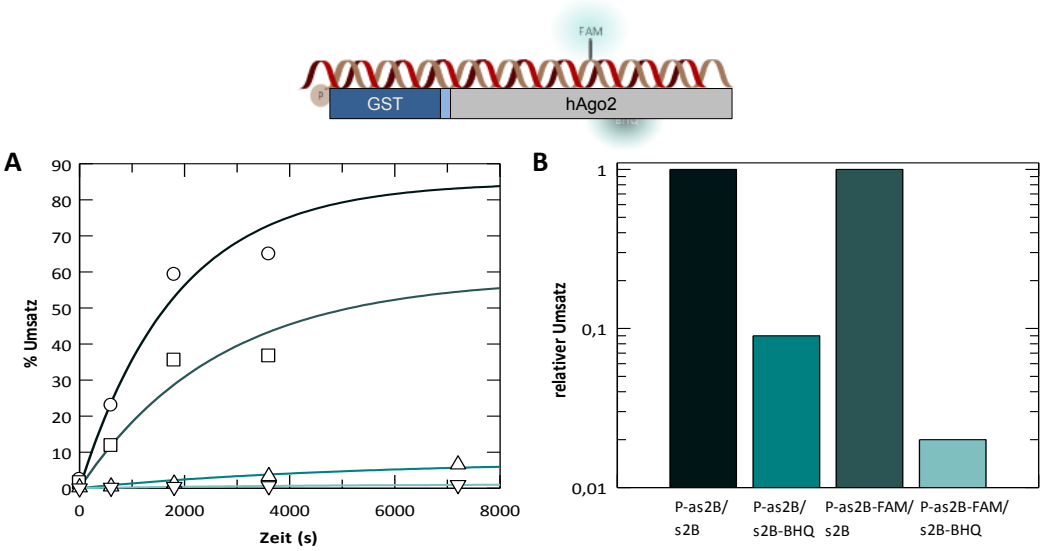


Abbildung 5.41: Schema des experimentellen Aufbaus zur Untersuchung der Produktfreisetzung nach *target* RNA-Spaltung durch hAgo2. Nach schrittweiser Assemblierung von binärem und ternärem Komplex unter Beobachtung der jeweiligen Fluoreszenzabnahme kam es zur Bildung von *target* RNA-Spaltprodukten. Durch Zugabe von 100-fachem Überschuss *guide* RNA zur Kompetition des binären Komplexes wurden die aus dem ternären Komplex dissoziierenden Spaltprodukte gebunden. Der Prozess konnte anhand der Signalzunahme bei räumlicher Trennung von Fluorophor FAM und Fluoreszenzlöscher BHQ beobachtet werden. Für Sequenzen siehe Abschnitt 3.8.2.

Die Ratenkonstanten aller Reaktionen sind gleich, weshalb angenommen werden kann, dass die Spaltungsreaktionen nach demselben Mechanismus ablaufen.

Es muss bei der Messung der Reaktionsgeschwindigkeit der Produktfreisetzung also davon ausgegangen werden, dass zwei Populationen von ternären Komplexen vorliegen: solche, die aus GST-hAgo2, *guide* RNA und gespaltener *target* RNA bestehen und solche, bei denen keine *target* RNA-Spaltung erfolgt ist (siehe Abschnitt 5.10.2). Dieser Sachverhalt würde allerdings auch im Fall einer vollständigen *target* RNA-Spaltung gelten, da die Dissoziation der Spaltprodukte bereits während der Spaltungsreaktion auftritt und unter den vorliegenden *multiple turnover* Bedingungen neue *target* RNA von den binären Komplexen gebunden wird.



guide RNA/*target* RNA Kombination	max. Umsatz (%)	k_{gesamt} (s^{-1})
P-as2B/ s2B	84,9 (± 5,9)	0,0005 (± 1 x 10^{-4})
P-as2B-FAM/ s2B	58,4 (± 5,5)	0,0004 (± 9 x 10^{-5})
P-as2B/ s2B-BHQ	7,6 (± 0,7)	0,0002 (± 5 x 10^{-5})
P-as2B-FAM/ s2B-BHQ	1,2 (± 0,1)	0,0002 (± 4 x 10^{-5})

guide RNA/*target* RNA Kombination	Umsatz von s2B-BHQ relativ zu s2B
P-as2B/ s2B	1
P-as2B/ s2B-BHQ	0,09
P-as2B-FAM/ s2B	1
P-as2B-FAM/ s2B-BHQ	0,02

Abbildung 5.42: *target* RNA-Umsatz bei Einsatz verschiedener Nukleinsäurekombinationen (siehe Abschnitt 4.4.1). (A) Bei allen verwendeten Nukleinsäure-Kombinationen findet sequenzspezifische Spaltung der jeweiligen *target* RNA mit vergleichbarer Rate, aber unterschiedlichem maximalen Umsatz statt. (B) Balkendiagramm zur Darstellung des relativen Umsatzes von s2B-BHQ bei der P-as2B- bzw. P-as2B-FAM-vermittelten *target* RNA-Spaltung. Die Werte wurden jeweils auf den Umsatz von s2B normiert. s2B-BHQ wird unter Verwendung von P-as2B zu 9 % umgesetzt im Vergleich zu s2B. Mit P-as2B-FAM als *guide* Strang wird s2B-BHQ im Vergleich zu s2B zu 2 % gespalten.

5.10.2 Kinetik der Spaltproduktfreisetzung

Zunächst wurden binäre Komplexe gebildet, indem 600 nM GST-hAgo2 mit 20 nM P-as2B-FAM für 10 min bei 25 °C in Ago-Spaltungspuffer präinkubiert und die durch die Assoziation verursachte Fluoreszenzabnahme mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers kontrolliert wurde. Die Spaltungsreaktion wurde durch Zugabe von 20 nM s2B-BHQ gestartet, wodurch es zeitgleich zur fast vollständigen Fluoreszenzlöschung kam. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 25 °C, um die Bildung von ternären Komplexen mit gebundenen Spaltprodukten zu ermöglichen. Die Zugabe von 2000 nM as2B als Kompetitor des binären Komplexes führte zur Bindung von aus dem ternären Komplex dissoziierenden BHQ-markierten Nukleinsäuren. Die resultierende Fluoreszenzsignalzunahme wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet (siehe Abbildung 5.43).

Wie unter Abschnitt 5.10.1 dargestellt, ist davon auszugehen, dass im experimentellen Ansatz ternäre Komplexe vorhanden sind, die gespaltene oder ungespaltene *target* RNA enthalten. Wenn beide mit unterschiedlicher Geschwindigkeit freigesetzt würden, müsste dies durch eine entsprechende Auswertung der experimentellen Daten durch eine zweifach exponentielle Gleichung zwei verschiedene Ratenkonstanten ergeben. Allerdings wird die Dissoziationskinetik in Abbildung 5.43 am besten durch eine einfach exponentielle Gleichung beschrieben. Folglich kommt es zur Freisetzung von gespaltener und ungespaltener *target* RNA mit der gleichen Geschwindigkeit ($k = 0{,}0003\,(\pm\,0{,}000008)\,\mathrm{s}^{-1}$). Die Ratenkonstante gleicht k_{-3} bei der Dissoziation ternärer Komplexe ($k_{-3,\,\mathrm{ternär}} = 0{,}0003\,\mathrm{s}^{-1}$), was diese Annahme erhärtet. Bemerkenswerterweise entspricht sie außerdem fast exakt derjenigen der Gesamtreaktion ($k_{\mathrm{gesamt}} = 0{,}0004\,(\pm\,0{,}00002)\,\mathrm{s}^{-1}$). Damit kann die Annahme bestätigt werden, dass es sich bei der Freisetzung der Spaltprodukte nach erfolgter Phosphodiesterhydrolyse um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion handelt.

Um die Stabilität der ternären Komplexe näher zu untersuchen, wurden sie einer schrittweisen Temperaturerhöhung unterzogen, um die Hybride aus P-as2B-FAM und s2B-BHQ bzw. dem BHQ-tragenden 5'-Spaltprodukt zu schmelzen. In beiden Fällen sollte ein Anstieg des Fluoreszenzsignals zu verzeichnen sein. Die berechneten Schmelztemperaturen betragen $\mathrm{T}_{\mathrm{melt,\ 19mer}} = 53{,}2\,°C$ bzw. $\mathrm{T}_{\mathrm{melt,\ 9mer}} = 30{,}0\,°C$.

Es wurden 600 nM GST-hAgo2 mit 20 nM P-as2B-FAM für 10 min bei 25 $°C$ in 1 × Ago-Spaltungspuffer präinkubiert, die Assoziation durch die Fluoreszenzabnahme kontrolliert und

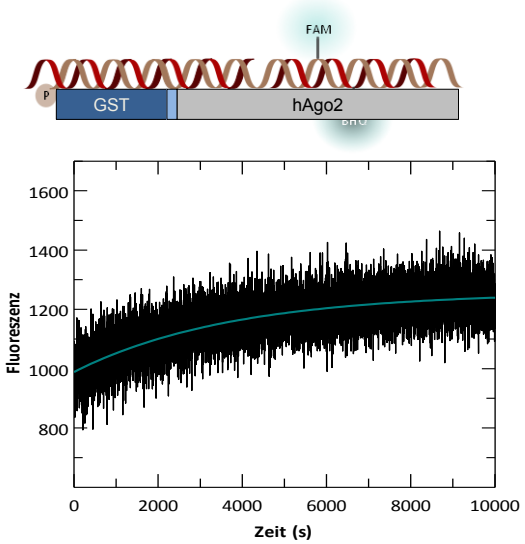


Abbildung 5.43: Kinetik der Freisetzung von 5'-Spaltprodukten nach *guide* RNA-vermittelter *target* RNA-Spaltung durch GST-hAgo2. Durchführung siehe Text. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe einer einfach exponentiellen Gleichung ausgewertet. Als Ratenkonstante ergab sich $k = 0{,}0003\,(\pm\,0{,}000008)\,\mathrm{s}^{-1}$.

die Spaltungsreaktion durch Zugabe von 20 nM s2B-BHQ gestartet. Nach Inkubation für 2 h bei 25 °C wurde die Temperatur um je 1 °C erhöht und das Fluoreszenzsignal protokolliert.

In einem Temperaturbereich von 25 – 60 °C konnte keine Änderung des Fluoreszenzsignals verzeichnet werden. Folglich kann durch eine Temperaturerhöhung weder die Freisetzung der gespaltenen noch der ungespaltenen *target* RNA induziert werden, die basierend auf der berechneten Schmelztemperatur in Abwesenheit von GST-hAgo2 bei Temperaturen über 30 °C respektive 53,2 °C nicht mit einem komplementären RNA-Strang hybridisieren würde.

Daraus lässt sich schließen, dass GST-hAgo2 einen stabilisierenden Einfluss auf die hybridisierten Nukleinsäuren besitzt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der sehr langsamen Dissoziationsrate von ternären Komplexen, die gespaltene oder ungespaltene *target* RNA enthalten und ein weiterer Hinweis auf die Existenz eines die Spaltproduktfreisetzung erleichternden Faktors. Die Identität dieses Faktors muss allerdings noch aufgeklärt werden.

5.11 Charakterisierung der siRNA-Bindung durch hTRBP [7]

Als Bestandteil des minimalen RLC spielt hTRBP eine Rolle bei der RNAi [79, 216, 235, 256]. Allerdings ist bisher nicht vollständig geklärt, worin die Aufgabe dieses dsRNA-bindenden Proteins besteht. Es besteht die Möglichkeit, dass hTRBP die Beladung von hAgo2 mit doppelsträngiger siRNA erleichtert. Daher ist die Untersuchung der Bindung von hTRBP an doppelsträngige siRNA ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Beladung des RISC.

5.11.1 Affinität von hTRBP zu verschiedenen siRNA-Substraten

Bestimmung der Affinität zu intern markierter dsRNA und ssRNA

Für die Untersuchung der Affinität von hTRBP-His zu verschiedenen siRNA-Substraten wurden Dissoziationskonstanten durch Gleichgewichts-Fluoreszenzspektroskopie bestimmt (siehe Abschnitt 4.4.2). Als Substrat diente zunächst die doppelsträngige si2B-FAM, die bereits für Gelverzögerungs-Analysen verwendet worden war (siehe Abschnitt 5.6.2). Als apparente Dissoziationskonstante konnte $K_{\mathrm{d,\,app}} = 120\,(\pm 45)$ nM ermittelt werden. Als Kontrolle diente die einzelsträngige *guide* RNA as2B-FAM. Die apparente Dissoziationskonstante für dieses Substrat ist näherungsweise mindestens 50-fach größer. Abbildung 5.44 zeigt die Titrationskurven von si2B-FAM (A) und as2B-FAM (B) mit hTRBP-His.

Bei der Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von hTRBP-His mit si2B-FAM (siehe Abbildung 5.44 A) konnte eine Gesamtfluoreszenzänderung von ca. 16 % erzielt werden. Die mathematische Auswertung der Titrationskurve mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ergab eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 126,8 (± 8,0) nM. Bei der Titration von as2B-FAM mit hTRBP-His konnte auf Grund der geringen Affinität von hTRBP-His zu

[7] Die in Abschnitt 5.11 beschriebenen Experimente wurden teilweise in Zusammenarbeit mit J. Heidemann im Rahmen der Betreuung seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

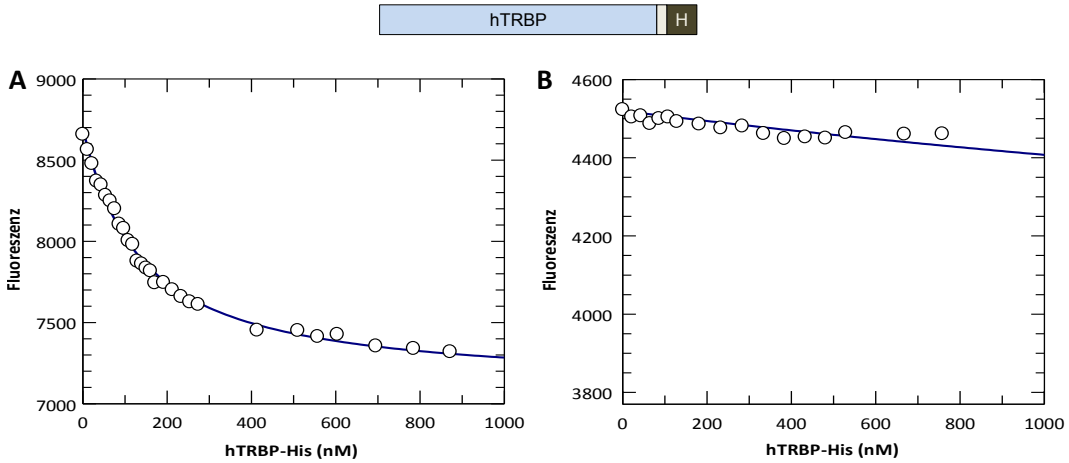


Abbildung 5.44: Bestimmung der Affinität von hTRBP-His zu intern markierter einzelsträngiger und doppelsträngiger siRNA (siehe Abschnitt 4.4.2). (A) Titrationskurve einer Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von 20 nM si2B-FAM mit steigenden Konzentrationen hTRBP-His. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab $K_d = 126{,}8\ (\pm\, 8{,}0)$ nM. (B) Titrationskurve einer Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von 20 nM as2B-FAM mit steigenden Konzentrationen hTRBP-His. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab $K_d > 5000$ nM.

einzelsträngiger RNA keine maximale Fluoreszenzabnahme erreicht werden. Wenn man jedoch analog zur Titration von si2B-FAM mit hTRBP-His eine Signaländerung von etwa 16 % zugrunde legt, beträgt $K_d > 5000$ nM (siehe Abbildung 5.44 B). Somit konnten die mittels Gelverzögerungs-Analysen gewonnenen Daten bestätigt werden.

Wie bereits unter Abschnitt 5.6.2 ausgeführt, steht die hier beobachtete relativ geringe Affinität von hTRBP-His zu doppelsträngiger siRNA im Kontrast zu publizierten Daten, die eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante im subnanomolaren Bereich beschreiben [204, 258]. Um zu untersuchen, ob die Fluoreszenzmarkierung von si2B-FAM einen Einfluss auf die Bindungsreaktion besitzt, wurde ein Komplex aus 20 nM si2B-FAM und 200 nM hTRBP-His mit steigenden Konzentrationen si2B titriert, um eine Verdrängung zu erwirken. Zwar konnte bei hohen Konzentrationen von si2B eine Fluoreszenzzunahme verzeichnet werden, jedoch war die Gesamtsignaländerung zu schwach für eine verlässliche mathematische Auswertung. Deshalb wurde alternativ die Gleichgewichts-Fluoreszenztitration mit der endständig markierten siRNA FAM-siLam (siehe Abschnitt 3.8.2) durchgeführt, um eine Aussage über den Einfluss der Fluorophor-Position auf die Bindungsreaktion treffen zu können.

Bestimmung der Affinität zu endständig markierter dsRNA

Es wurden 30 nM FAM-siLam mit steigenden Konzentrationen hTRBP-His titriert und die resultierende Fluoreszenzsignalabnahme dokumentiert. Die maximale Signalabnahme betrug etwa 22 %. Durch Anpassung der experimentellen Daten an eine quadratische Bindungs-

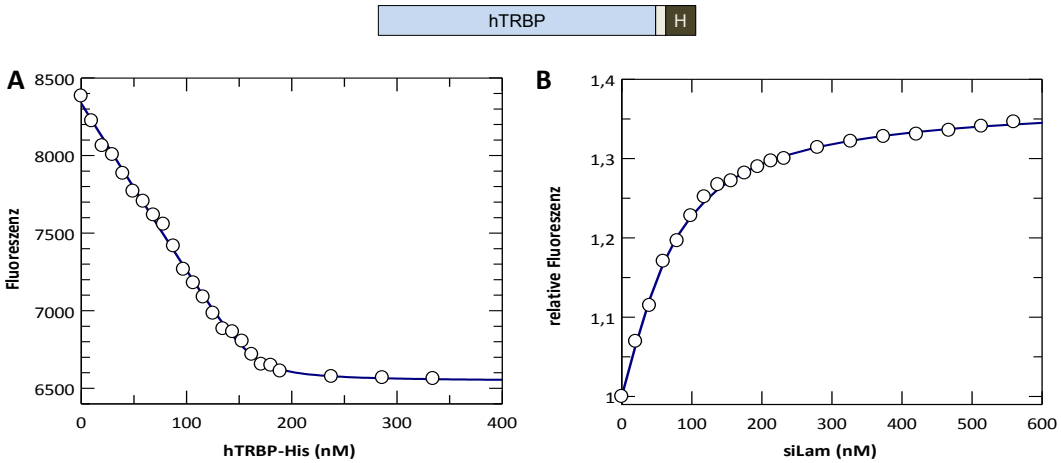


Abbildung 5.45: Bestimmung der Affinität von hTRBP-His zu endständig markierter doppelsträngiger siRNA (siehe Abschnitt 4.4.2). (A) Titrationskurve einer Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von 30 nM FAM-siLam mit steigenden Konzentrationen hTRBP-His. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung und ergab $K_d = 1{,}5\ (\pm 0{,}61)$ nM. (B) Titrationskurve einer Verdrängungstitration eines Komplexes aus 30 nM FAM-siLam und 400 nM hTRBP-His mit steigenden Konzentrationen unmarkierter siLam. Die Auswertung der Daten erfolgte durch ein iteratives Verfahren und ergab $K_d = 1{,}0\ (\pm 0{,}11)$ nM für die unmarkierte siLam.

gleichung ergab sich $K_d = 1{,}5\ (\pm 0{,}61)$ nM (siehe Abbildung 5.45 A). Diese Gleichgewichts-Dissoziationskonstante unterscheidet sich deutlich von derjenigen mittels si2B-FAM gemessenen ($K_d = 126{,}8$ nM für si2B-FAM *versus* $K_d = 1{,}5$ nM für FAM-siLam), was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die Position des Fluorophors bei dem Substrat si2B-FAM einen inhibierenden Einfluss auf die Bindungsreaktion mit hTRBP-His ausübt.

Es wurde eine Verdrängungstitration durchgeführt, bei dem zu einem Komplex aus 30 nM FAM-siLam und 400 nM hTRBP-His schrittweise siLam hinzu titriert wurde. Die Titrationskurve wurde durch ein iteratives Verfahren mit Hilfe des Programms Scientist ausgewertet (siehe Anhang A.1.2). Für das unmarkierte Substrat siLam ergab sich hieraus als Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $K_d = 1{,}04\ (\pm 0{,}11)$ nM (siehe Abbildung 5.45 B). Da sich die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für markiertes und unmarkiertes siLam kaum unterscheiden ($K_d = 1{,}5$ nM für FAM-siLam *versus* $K_d = 1{,}0$ nM für siLam), scheint die endständig an die siRNA gekoppelte FAM-Markierung keinen Einfluss auf die Bindungsreaktion zwischen hTRBP-His und dieser siRNA zu besitzen.

5.11.2 Kinetik der Bindungsreaktion von hTRBP und siRNA

Da sich FAM-siLam als ein Bindungspartner herausgestellt hat, bei dem die Reaktion nicht durch das Fluorophor beeinflusst wird (siehe Abschnitt 5.11.1), wurden die Untersuchungen der Bindungsreaktion unter *pre-steady state* Bedingungen mit FAM-siLam durchgeführt. Zur Abtrennung großer Aggregate wurde hTRBP-His für 1 h bei 4 °C und 150.000 × g zentrifugiert

und die im Überstand befindlichen Proteine zur Messung der Bindungskinetik verwendet.

Bestimmung der Assoziation und Dissoziation von dsRNA und hTRBP

Je 50 nM FAM-siLam wurden mit einer konstanten Konzentration hTRBP-His im Bereich von 100 – 800 nM mit Hilfe einer *stopped flow* Apparatur rasch gemischt und die Fluoreszenzänderung aufgezeichnet. Für jede Proteinkonzentration wurden die Daten mathematisch mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 5.46 A).

Die Auswertung der experimentellen Daten durch eine zweifach exponentielle Gleichung zeigte einen zweiphasigen Verlauf der Bindungsreaktion. Die erste schnelle Phase besitzt eine Ratenkonstante pseudo-erster Ordnung ($k_{1,\,obs}$). Die Ratenkonstanten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und aus dem linearen Zusammenhang (siehe Abbildung 5.46 B) die Assoziationsratenkonstante der ersten Phase mit $k_1 = 1{,}9\,(\pm\,0{,}04) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ ermittelt. Die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante der ersten Phase ergab $k_{-1} = 10{,}4\,(\pm\,2{,}0)\,s^{-1}$. Die zweite Ratenkonstante der Assoziation beträgt $k_2 = 2{,}6\,(\pm\,1{,}2)\,s^{-1}$ (Mittelwert aus acht unabhängigen Experimenten).

Bei der ersten Phase handelt es sich um einen konzentrationsabhängigen Prozess. Dies impliziert, dass sie die diffusionskontrollierte Bildung eines Kollisionskomplexes repräsentiert. Die zweite Phase ist unabhängig von der hTRBP-His-Konzentration und beschreibt vermutlich die konformationelle Umlagerung des Proteins während der siRNA-Bindung.

Im nächsten Schritt wurde die Dissoziation des Komplexes aus hTRBP-His und FAM-siLam unter *pre-steady state* Bedingungen untersucht. Dazu wurde FAM-siLam durch schnelle Zu-

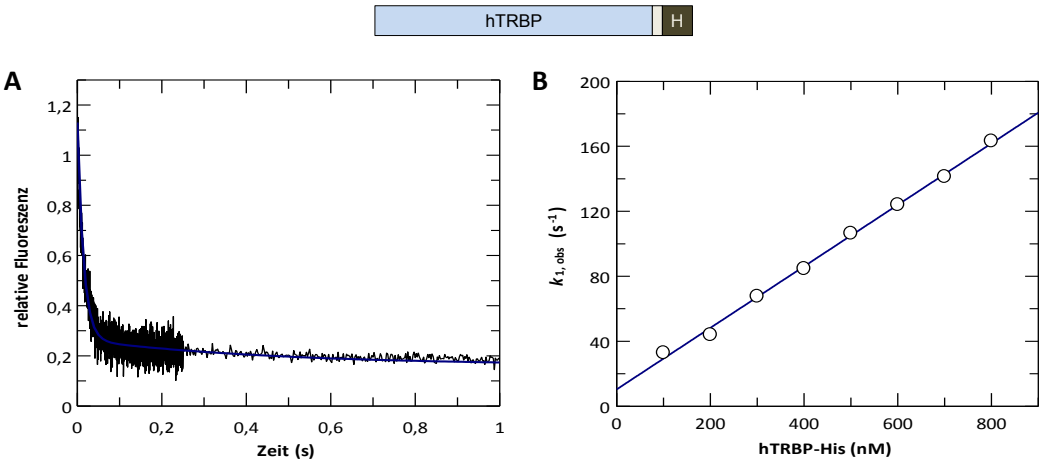


Abbildung 5.46: *Pre-steady state* Assoziationskinetik von hTRBP-His und siRNA (siehe Abschnitt 4.4.3). (A) Repräsentative *stopped flow* Messung der Komplexbildung aus 50 nM FAM-siLam und 300 nM hTRBP-His. Die Daten wurden mit einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{1,\,obs} = 67{,}7\,(\pm\,0{,}61)\,s^{-1}$ und $k_2 = 2{,}2\,(\pm\,0{,}13)\,s^{-1}$. (B) Abhängigkeit von $k_{1,\,obs}$ u. a. aus (A) von der hTRBP-His-Konzentration. Es ergab sich $k_1 = 1{,}9\,(\pm\,0{,}04) \times 10^8\,M^{-1}s^{-1}$ und $k_{-1} = 10{,}4\,(\pm\,2{,}0)\,s^{-1}$.

gabe eines Überschusses nicht-markierter siLam aus dem Komplex verdrängt und die zeitabhängige Änderung des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet (siehe Abbildung 5.47).

Es zeigte sich, dass auch die Dissoziation mindestens ein zweiphasiger Prozess ist. Durch Auswertung der experimentellen Daten mit einer zweifach exponentiellen Gleichung ergaben sich $k_{-1} = 3{,}2\,(\pm\,0{,}03)\,\mathrm{s}^{-1}$ und $k_{-2} = 0{,}15\,(\pm\,0{,}0042)\,\mathrm{s}^{-1}$ für den Zerfall eines hTRBP-His/FAM-siLam-Komplexes.

Für die Rückreaktion der ersten Phase, die dem Zerfall eines Kollisionskomplexes entspricht, konnte die bereits durch die Konzentrationsabhängigkeit der ersten Assoziationsphase ermittelte Dissoziationskonstante k_{-1} $(10{,}4\,(\pm\,2{,}0)\,\mathrm{s}^{-1})$ als Orientierungshilfe dienen. Sie ist vergleichbar mit der ersten mittels Verdrängungsexperiment ermittelten Dissoziationskonstante $k_{-1} = 3{,}2\,(\pm\,0{,}03)\,\mathrm{s}^{-1}$. Die Dissoziationskonstante der zweiten Phase repräsentiert demnach wahrscheinlich eine konformationelle Umlagerung von hTRBP-His beim Zerfall des Komplexes mit FAM-siLam. Bei der Berechnung der Dissoziationskonstante anhand von Gleichung (5.1) ergab sich $K_\mathrm{d} = 1{,}0\,\mathrm{nM}$.

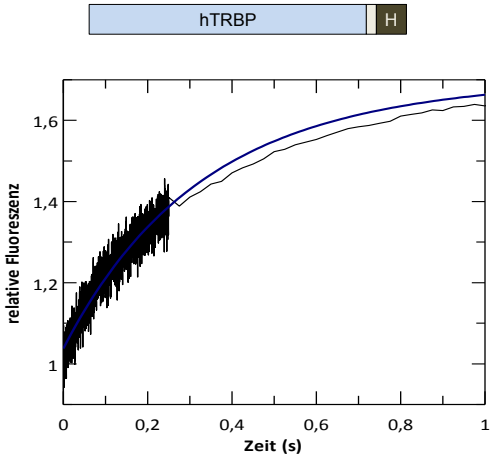


Abbildung 5.47: *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von hTRBP-His und siRNA (siehe Abschnitt 4.4.3). *Stopped flow* Messung des Zerfalls von einem Komplex aus 50 nM FAM-siLam und 350 nM hTRBP-His in Anwesenheit von 5000 nM siLam. Die Daten wurden mit einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben $k_{-1} = 3{,}2\,(\pm\,0{,}03)\,\mathrm{s}^{-1}$ und $k_{-2} = 0{,}15\,(\pm\,0{,}0042)\,\mathrm{s}^{-1}$.

5.11.3 Zusammenfassung der biochemischen und kinetischen Parameter bei der Bildung eines hTRBP-His/siRNA-Komplexes

Für eine vergleichende Übersicht sind die Ergebnisse zur Bindung von siRNA durch hTRBP-His an dieser Stelle tabellarisch aufgeführt.

siRNA-Substrat	K_d (nM)		k_1	k_{-1}	k_2	k_{-2}
	FT	ber.	($M^{-1}s^{-1}$)	(s^{-1})	(s^{-1})	(s^{-1})
FAM-siLam	1,5	1,0 *	$1{,}9 \times 10^8$	3,2	2,6	0,15

Tabelle 5.5: Übersicht über die biochemischen und kinetischen Parameter bei Bildung eines hTRBP-His/siRNA-Komplexes. Mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration (FT) experimentell bestimmte oder berechnete (ber.) Dissoziationskonstanten sowie Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für die Bildung eines Komplexes aus hTRBP-His und siRNA. * Für die Berechnung der Dissoziationskonstante wurde der direkt mittels Verdrängungsexperiment ermittelte Wert für k_{-1} verwendet.

5.12 Untersuchung des Einflusses von hTRBP auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung [8]

In Abschnitt 5.11 konnte gezeigt werden, dass hTRBP doppelsträngige siRNA bindet. Weiterhin gelang in Abschnitt 5.9.2 die *target* RNA-Spaltung durch hAgo2, nachdem dieses mit doppelsträngiger siRNA programmiert worden war. Diese beiden Voraussetzungen schufen die Möglichkeit, den Einfluss von hTRBP-His auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 zu untersuchen. Als Abschluss dieser Arbeit wurden initiale Experimente durchgeführt, um diese Fragestellung zu untersuchen.

Es wurde ein modifizierter Spaltungsassay durchgeführt, bei dem in 1 × Ago-Bindungspuffer 3,7 μM GST-hAgo2 mit 100 nM P-si2B und 2,5 nM radioaktiv markierter s2B als *target* RNA in Anwesenheit von 1 μg/μl tRNA inkubiert wurde. In einem parallelen Ansatz wurde die siRNA zuvor mit 3,7 μM hTRBP-His für 8 min bei 25 $°C$ präinkubiert, bevor beide Komponenten mit dem restlichen Spaltungsansatz gemischt wurden, um die Bindung der siRNA an hTRBP-His zu erlauben. Nach 8 min wurde in beiden Fällen die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mM $MgCl_2$ gestartet. Das weitere Verfahren entsprach einem Standard-Spaltungsassay (siehe Abschnitt 4.4.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 5.48 dargestellt.

Es zeigte sich, dass in Ab- und Anwesenheit von hTRBP-His Spaltung von *target* RNA durch hAgo2 stattfindet und diese durch siRNA vermittelt wird (siehe Abbildung 5.48 A). Dieses Ergebnis erwies sich als reproduzierbar. Die Banden der Produkte weisen im ersten Fall eine Länge von 9 nt auf und entsprechen damit dem erwarteten Produkt. Im zweiten Fall finden sich neben dem kanonisch gespaltenen Produkt eine Bande geringerer und zwei

[8] Die in Abschnitt 5.12 beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit S. Willkomm und J. Heidemann im Rahmen der Betreuung ihrer Master- bzw. Bachelorarbeit durchgeführt.

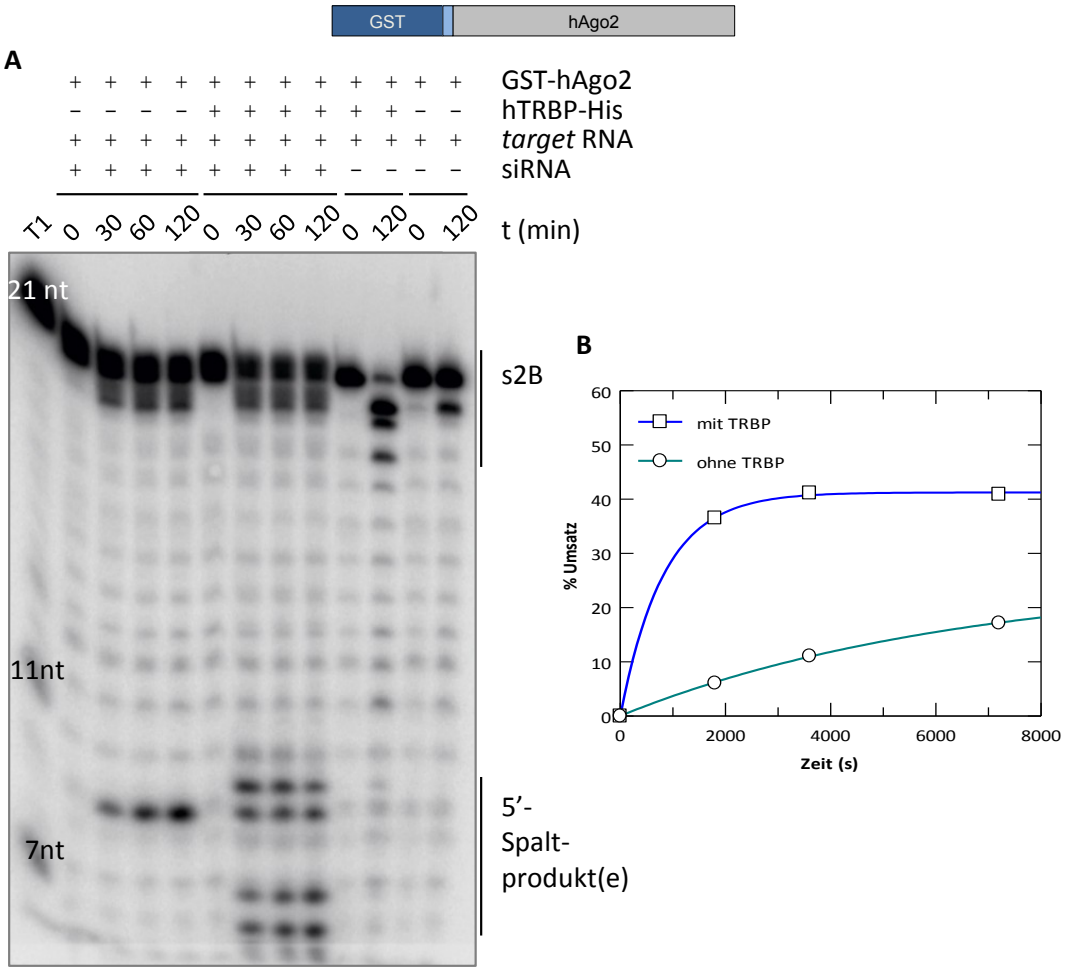


Abbildung 5.48: Einfluss von hTRBP-His auf die Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 nach seiner Programmierung mit doppelsträngiger siRNA (siehe Abschnitt 4.4.1). (A) Modifizierter Spaltungsassay mit 3,7 μM GST-hAgo2, 100 nM P-si2B und 2,5 nM s2B. In einem Ansatz erfolgte die Präinkubation von siRNA und 3,7 μM hTRBP-His für 8 min bei 25 °C, bevor *target* RNA und GST-hAgo2 zugegeben wurden. Der andere Ansatz wurde in Abwesenheit von hTRBP-His präinkubiert. Es folgten eine Auftrennung durch denaturierende PAGE und Detektion mittels Autoradiographie. Als Kontrolle wurde *target* RNA mit GST-hAgo2 und hTRBP-His gleichzeitig oder nur mit GST-hAgo2 ohne siRNA inkubiert. (B) Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und die korrespondierenden Raten ($k_{\text{-hTRBP-His}} = 0{,}0002\ (\pm\, 0{,}00006)\ \text{s}^{-1}$ bzw. $k_{\text{+hTRBP-His}} = 0{,}0012\ (\pm\, 0{,}00006)\ \text{s}^{-1}$) und die maximalen Umsätze (max. $\text{Umsatz}_{\text{-hTRBP-His}} = 25{,}6\ (\pm\, 0{,}04)\ \%$ bzw. max. $\text{Umsatz}_{\text{+hTRBP-His}} = 41{,}2\ (\pm\, 0{,}32)\ \%$) durch Anpassung der experimentellen Daten an eine einfach exponentielle Gleichung ermittelt. T1: durch T1-Verdauung hergestellter Größenmarker. t: Zeit.

Banden höherer elektrophoretischer Mobilität. Dies muss auf die Anwesenheit von hTRBP-His zurückzuführen sein. Die Proteinpräparation enthält eine Nuklease-Verunreinigung, wie ein Kontrollansatz zeigt. Dadurch kann es zu einer Verkürzung der siRNA vor der Ladung auf hAgo2 gekommen sein, wodurch sich die Spaltstelle innerhalb der Sequenz verschiebt. Da auch die *target* RNA während der Inkubationszeit teilweise hAgo2-unabhängig degradiert

wird, stehen diese kürzeren Versionen ebenfalls für die Spaltung durch hAgo2 zur Verfügung. Außerdem kann das 9 nt lange Spaltprodukt degradiert werden. Das Spaltprodukt von 10 nt Länge könnte durch eine unkorrekte Positionierung des *guide* Stranges innerhalb des aktiven Komplexes zu erklären sein, wodurch sich ebenfalls die Spaltstelle verschieben würde.

Die Quantifizierung des Umsatzes ergab sowohl einen Unterschied des maximalen Umsatzes als auch der Geschwindigkeitsratenkonstante der Spaltungsreaktion (siehe Abbildung 5.48 B). In Abwesenheit von hTRBP-His beträgt der maximale Umsatz 25,6 (±0,04) % und wird durch denjenigen in Anwesenheit von hTRBP-His mit 41,2 (±0,32) % um ein Drittel übertroffen. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird um das 6-fache von 0,0002 (±0,00006) s^{-1} auf

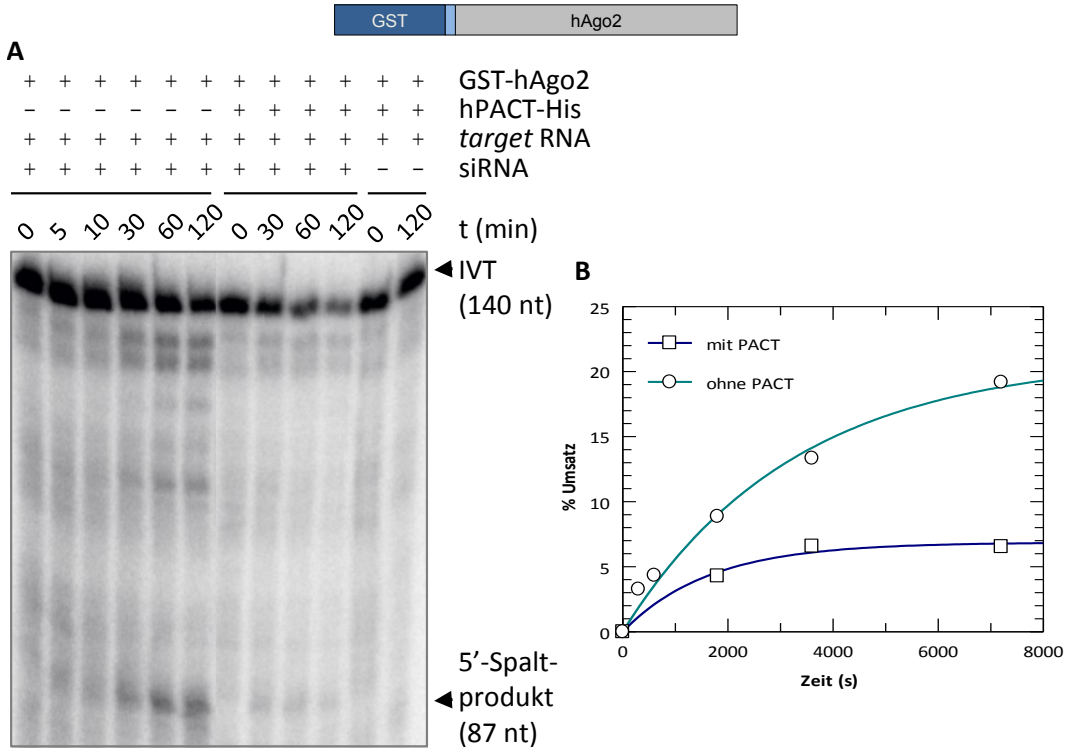


Abbildung 5.49: Einfluss von hPACT-His auf die Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 nach seiner Programmierung mit doppelsträngiger siRNA (siehe Abschnitt 4.4.1). (A) Modifizierter Spaltungsassay mit 3,7 μM GST-hAgo2, 100 nM P-si2B und 2,5 nM ICAM-1-IVT. In einem Ansatz erfolgte die Präinkubation von siRNA und 3,7 μM hPACT-His für 8 min bei 25 °C, bevor *target* RNA und GST-hAgo2 zugegeben wurden. Der andere Ansatz wurde in Abwesenheit von hPACT-His präinkubiert. Es folgten eine Auftrennung durch denaturierende PAGE und Detektion mittels Autoradiographie. Als Kontrolle wurde *target* RNA mit GST-hAgo2 und hPACT-His gleichzeitig (Kontrolle 1) oder nur mit GST-hAgo2 (Kontrolle 2) ohne siRNA inkubiert. (B) Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und die korrespondierenden Raten ($k_{\text{-hPACT-His}} = 0{,}0003\,(\pm 6 \times 10^{-5})\ s^{-1}$ bzw. $k_{\text{+hPACT-His}} = 0{,}0006\,(\pm 1 \times 10^{-4})\ s^{-1}$) und die maximalen Umsätze (max. $\text{Umsatz}_{\text{-hPACT-His}} = 21{,}1\,(\pm 1{,}87)\,\%$ bzw. max. $\text{Umsatz}_{\text{+hPACT-His}} = 6{,}9\,(\pm 0{,}46)\,\%$) durch Anpassung der experimentellen Daten an eine einfach exponentielle Gleichung ermittelt. t: Zeit. IVT: ICAM-1 *in vitro* Transkript als *target* RNA.

0,0012 ($\pm$ 0,00006) s^{-1} gesteigert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass hTRBP-His die *target* RNA-Spaltung durch mit doppelsträngiger siRNA programmiertes hAgo2 erleichtert.

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde das Experiment statt mit hTRBP-His mit hPACT-His wiederholt. Es wurde freundlicherweise von J. Heidemann zur Verfügung gestellt. Beide Proteine weisen vor allem in ihren dsRNA-bindenden Motiven hohe Homologien untereinander auf (siehe Abschnitt 2.6.1). Statt s2B wurde als *target* RNA das ICAM-1-IVT eingesetzt. Abbildung 5.49 zeigt das Ergebnis des Experiments.

Im Gegensatz zu hTRBP-His führt die Anwesenheit von hPACT-His im Spaltungsansatz nicht zu einer Steigerung der *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 (siehe Abbildung 5.49 A). Im Gegenteil scheint der Prozess durch hPACT-His gehemmt zu werden, was die Spezifität des zuvor durch hTRBP-His beobachteten fördernden Effektes unterstreicht. Auch dieses Ergebnis ließ sich reproduzieren. Der maximale Umsatz der *target* RNA-Spaltung ist im Reaktionsansatz mit hPACT-His mit 6,9 ($\pm$ 0,46) % im Vergleich zum Reaktionsansatz ohne hPACT-His mit 21,1 ($\pm$ 1,9) % um zwei Drittel vermindert (siehe Abbildung 5.49 B). Die korrespondierenden Geschwindigkeitsratenkonstanten ($k_{\text{-hPACT-His}} = 0{,}0003\,(\pm\,0{,}00006)\,s^{-1}$ bzw. $k_{\text{+hPACT-His}} = 0{,}0006\,(\pm\,0{,}0001)\,s^{-1}$) weisen keine große Abweichung auf. hPACT-His scheint also die *target* RNA vor der Spaltung durch hAgo2 zu schützen.

Offensichtlich sind in beiden Experimenten Effekte durch unspezifische RNA-Degradation zu beobachten, was die Quantifizierung erschwert und die ermittelten Werte beeinflusst. Deshalb können die Ergebnisse nur als erste Hinweise auf den möglichen Einfluss von hTRBP-His und hPACT-His auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 dienen. Weitere Experimente werden in Zukunft nötig sein, um die Rolle der beiden dsRNA-bindenden Proteine in der RNAi im Detail zu untersuchen.

6 Diskussion

Das Protein hAgo2 stellt die Schlüsselkomponente der RNA-Interferenz in menschlichen Zellen dar. Es ist in der Lage, mehrere Substrate sequentiell zu binden und die endonukleolytische Spaltung einer sequenzspezifisch gebundenen *target* RNA zu katalysieren. Damit ist es das einzige der vier humanen Ago Proteine, das die siRNA-vermittelte RNAi durchführen kann. Dabei eröffnet die Programmierung dieses Enzyms mit unzähligen verschiedenen siRNAs oder miRNAs die Möglichkeit, die Expression von mRNAs in Abhängigkeit des Entwicklungsstatus des Organismus, des Zellzyklusstatus oder als Antwort auf zelluläre Reize gezielt und effektiv zu regulieren. Dadurch wird hAgo2 zu einem zellulären Universalwerkzeug.

Obwohl die RNAi ein Arbeitsgebiet darstellt, das sich in den letzten Jahren rasant entwickelt hat, existieren in Bezug auf das detaillierte Verständnis der elementaren Schritte bei der Programmierung von hAgo2, der Erkennung und Bindung einer *target* RNA, ihrer Spaltung und der Regeneration des katalytisch kompetenten Komplexes nur ein lückenhaftes Verständnis. Wichtige Fragen bleiben bislang ungeklärt. Dazu gehört eine umfassende Studie der biochemischen und kinetischen Parameter bei der siRNA-vermittelten RNAi. Ein Grund hierfür ist die schwierige Expression und Reinigung sowie die äußerst problematische Handhabung von hAgo2 in *in vitro* Systemen. Als Voraussetzung für die Charakterisierung von rekombinantem hAgo2 konnte zunächst ein System entwickelt werden, das es erlaubt, im Milligramm-Maßstab Protein mit hoher Aktivität zu isolieren und dabei auf stabilisierende Chemikalien bei der Lagerung zu verzichten. Weiterhin konnten Erkenntnisse über die Stabilität von hAgo2 gewonnen werden. Damit war es möglich, die siRNA-vermittelte Erkennung und Spaltung von *target* RNA durch hAgo2 zu untersuchen. Diese Dissertation stellt die erste Arbeit dar, die derartige Studien in umfassender und detaillierter Form beschreibt. Darüber hinaus konnte die siRNA-Bindung durch rekombinantes hTRBP untersucht werden. Zusammen mit Experimenten, bei denen ein Einfluss von hTRBP und hPACT auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 nachgewiesen werden konnte, stellen diese Studien eine Basis für die Zuordnung einer Funktion dieses dsRNA-bindenden Proteins innerhalb der RNAi dar. Im Folgenden werden die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, diskutiert.

6.1 Untersuchung der siRNA-vermittelten RNAi mit Hilfe von rekombinanten Komponenten

In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse mit Hilfe von *in vitro* durchgeführten Experimenten unter Verwendung von (semi-) artifiziellen Komponenten gewonnen. Zunächst wurde mit bakteriell exprimiertem, rekombinantem hAgo2 und hTRBP gearbeitet. Außerdem dienten synthetisch hergestellte siRNAs als Substrate. Weiterhin wurden entweder synthetisch hergestellte oder *in vitro* transkribierte RNAs als Modell einer *target* RNA verwendet. Die Verwendung eines *in vitro* Modellsystems bringt mit sich, dass die experimentellen Daten sich von solchen unterscheiden können, die innerhalb einer Zelle oder eines Organismus gewonnen wurden. Gründe hierfür sind die nicht-physiologischen Konditionen des Puffersystems, artifizielle Konzentrationen der beteiligten Komponenten, die die tatsächlichen zellulären Konzentrationen i. d. R. um ein Vielfaches überschreiten sowie die Abwesenheit von Faktoren, die den Prozess beeinflussen können. Allerdings erlauben *in vitro* Systeme die gezielte Untersuchung bestimmter Komponenten sowie die Simulation von Zuständen, wie dies in einer Zelle nicht möglich ist.

In dieser Arbeit wurde bakteriell exprimiertes rekombinantes hAgo2 als Modellsystem für den gesamten RISC gewählt. Diese vereinfachende Annahme wurde bereits in vorherigen Arbeiten getroffen [62, 168, 199, 200]. Dabei erfüllt das mit einer siRNA programmierte Protein die wichtigsten Spezifitäten des Komplexes. Die katalysierte Spaltung der *target* RNA findet sequenzspezifisch an der kanonischen Spaltstelle gegenüber des Phosphatrückgrates zwischen dem 10. und 11. Nukleotid des *guide* Stranges statt [31], wie dies auch für den RISC gezeigt wurde. Das nicht-programmierte oder mit einer siRNA programmierte hAgo2, die keine Erkennungssequenz innerhalb der *target* RNA besitzt, katalysiert auch nicht die Spaltung der angebotenen *target* RNA (siehe Abschnitt 5.5.2). Wie beim RISC auch ist der *target* RNA-Umsatz durch rekombinantes hAgo2 abhängig von der Mg^{2+}-Konzentration im Spaltungsansatz (siehe Abschnitt 5.5.4). Außerdem ist hAgo2 ebenso wie der RISC ein zum multiplen Umsatz fähiges Enzym (siehe Abschnitt 5.9.1) [61, 62]. Die kinetischen Parameter der *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 bzw. den RISC sind vergleichbar (siehe Abschnitt 6.3.3). Aus diesen Gründen stellt hAgo2 ein probates Modellsystem für den zellulären oder rekombinanten RISC dar.

Die Reinigung von bakteriell exprimiertem hAgo2 wird selten in der Literatur beschrieben [62, 255]. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Reinigung von in *E. coli* Zellen exprimiertem hAgo2 problematisch ist. Zwar verspricht diese Reinigungsstrategie im Allgemeinen eine große Ausbeute, allerdings kommt es nicht zu einer posttranslationalen Modifikation wie beispielsweise einer Glykosylierung oder Phosphorylierung, was eventuell zur Instabilität des Proteins beiträgt. Die Problematik wurde bei der Expression und Reinigung deutlich. In parallel durchgeführten Arbeiten innerhalb der AG Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far konnten für die anderen humanen Ago Proteine 1, 3 und 4 ähnliche Schwierigkeiten bei der bakteriellen Ex-

pression, Reinigung und Handhabung beobachtet werden. Dennoch gelang die Isolierung von rekombinantem hAgo2 nach Expression in *E. coli* Zellen mit sehr hoher Ausbeute und großer enzymatischer Aktivität. Diese ist eine wichtige Voraussetzung für Studien, bei denen geringe Unterschiede beobachtet werden. Beispielsweise war es bislang nicht möglich, rekombinantes hAgo2 mit einer doppelsträngigen siRNA zu programmieren und im Anschluss die Spaltung einer *target* RNA zu beobachten [35, 199]. In der Studie von Liu *et al.* konnte bei vergleichenden Analysen der *target* RNA-Spaltung nach Programmierung mit einzel- bzw. doppelsträngiger siRNA im Falle einer *guide* RNA ein Umsatz von schätzungsweise unter 10 % erzielt werden. Deshalb steht zu vermuten, dass nach Programmierung mit einem Doppelstrang der Umsatz für eine Detektion zu gering war [35]. Das in dieser Arbeit gewonnene GST-hAgo2 weist einen maximalen Umsatz von über 90 % auf (siehe Abbildung 5.12 C und D) und stellt damit nach bisherigem Kenntnisstand das bislang aktivste rekombinante hAgo2 dar.

Während dieser Arbeit konnten Erkenntnisse zur Handhabung von hAgo2 gewonnen werden, die für die Interpretation der damit generierten Daten wichtig sind. Es zeigte sich, dass hAgo2 nur eingeschränkt lagerfähig ist. Zum Einen mussten häufige Frier-Tau-Zyklen vermieden werden, zum Anderen nahm die Aktivität von GST-hAgo2 und NHA-hAgo2 während der Lagerung bei $-20\,°C$ über mehrere Monate kontinuierlich ab, bis schließlich nur noch ein maximaler *target* RNA-Umsatz von ca. 30 % beobachtet werden konnte. Deshalb wurden vergleichende Analysen unter den einzelnen Proteinpräparationen stets kurz nach ihrer Isolierung durchgeführt (siehe Abschnitt 5.5.2). Die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Faktoren fanden entweder im selben Experiment oder stets mit frischen Aliquots hAgo2 statt. Trotz der beschriebenen Einschränkungen sind somit Studien über einen langen Zeitraum möglich. Dies ist nicht der Fall für bakteriell exprimiertes murines Ago2 (mAgo2), das von der Arbeitsgruppe um Salvatore innerhalb von 24 – 36 h verwendet werden musste [257].

Unabhängig von den Erfolgen bei der Weiterentwicklung vorhandener Expressions- und Reinigungssysteme für rekombinantes hAgo2 bestehen auch für das hier verwendete hAgo2 nach wie vor zwei Hauptprobleme. Es liegen neben vollständig translatiertem Protein eine Vielzahl kürzerer Versionen vor, wie dies bereits früher beschrieben wurde [255]. Diese konnten durch die gewählte Reinigungsstrategie nicht entfernt werden. Allerdings stellt im Fall von GST-hAgo2 das vollständig translatierte Protein das Hauptprodukt dar (siehe Abbildung 5.10 B). Durch Western-Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Proteinbanden mit höherer elektrophoretischer Mobilität um kürzere hAgo2-Versionen handelt, die am C-Terminus deletiert sind (siehe Abbildung 5.4 B und D). Die verwendeten Proteinpräparationen besitzen im Vergleich zu anderen Studien einen ähnlichen Reinheitsgrad [62, 238, 255, 257].

Das zweite Problem besteht in der Löslichkeit von hAgo2. Bereits bei der Reinigung von GST-hAgo2 lag ein Teil des Proteins in partiell aggregierter Form vor. Im Gegensatz zu NHA-hAgo2 sind allerdings keine störenden chemischen Substanzen für die Stabilisierung nötig. Bei NHA-hAgo2 ergab sich das Problem, dass der Einsatz in einem Experiment die Verdünnung

des benötigten L-Arg zur Folge hatte und deshalb in kurzer Zeit zur Präzipitation von hAgo2 führte. Um eine schnelle Aggregation von GST-hAgo2 zu verhindern, wurde darauf verzichtet, die die Löslichkeit erhöhende N-terminale GST-Markierung durch Proteaseverdauung zu entfernen, obwohl diese Möglichkeit durch die gewählte Klonierungsstrategie gegeben ist (siehe Abschnitt 5.3.2). Es konnte bereits früher durch Rivas *et al.* gezeigt werden, dass GST allein keine *target* RNA-Spaltung vermitteln kann. In der gleichen Arbeit wurde die erste bakterielle Expressionsstrategie für hAgo2 beschrieben. Im Gegensatz zu dieser konnte in der vorliegenden Arbeit auf die Koexpression von Hsp90 verzichtet werden [62].

Neben der bakteriellen Expression von hAgo2 besteht die Möglichkeit der Expression in Insektenzellen [199, 256], was eine korrekte posttranslationale Modifikation ermöglicht. Weiterhin gibt es die Möglichkeit, hAgo2 aus humanen Zellextrakten mittels immun- oder affinitätsbasierten Techniken zu isolieren [35, 79, 168, 200, 260]. Beide Strategien versprechen eine bessere Löslichkeit sowie eine vollständige Translation. Jedoch sind die Ausbeuten derart exprimierter Proteine oft sehr gering. Außerdem besteht das Risiko der Koisolierung von zellulären Faktoren, wie es bereits mehrfach beschrieben ist [168, 200]. Bei dem durch die Arbeitsgruppen um Martinez und Ameres verwendeten affinitätsgereinigten minimalen RISC ergibt sich eine zusätzliche Einschränkung für die Untersuchung der siRNA-Bindung durch hAgo2. Sie isolierten hAgo2 durch Bindung an mit einer Biotin-Markierung versehenen siRNA, so dass eine *in vitro* Studie der siRNA-Bindung unmöglich ist [168, 200]. Ein derart isolierter minimaler RISC kann nicht mit einzelsträngiger oder doppelsträngiger siRNA erneut geladen werden [261].

Im zellulären Umfeld bindet ein programmierter RISC in Abhängigkeit der *guide* RNA-Sequenz eine mRNA, um ihre Translation zu verhindern. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Spaltungssystem wurde als *target* RNA entweder eine 140 nt lange, *in vitro* transkribierte RNA oder eine 21 nt lange synthetische RNA als Modell für eine *target* mRNA verwendet. In beiden Fällen fehlen die für eine mRNA typischen Enden, die 5'-terminale m^7G *cap* Struktur sowie der 3'-terminale Poly-A-Schwanz. Außerdem sind beide Modell-RNAs kürzer als ein zelluläres mRNA-Transkript. Dennoch stellen die beiden verwendeten RNAs spaltbare *targets* für hAgo2 dar (siehe Abschnitte 5.5.2 und 5.9). In der Literatur wird eine Beteiligung der m^7G *cap* Struktur bei der *target* RNA-Erkennung und -Bindung kontrovers diskutiert [158]. Djuranovic *et al.* beschrieben eine allosterische Ligandenbindungsstelle innerhalb der *D. melanogaster* Ago1 Mid Domäne, die zusätzlich zur Bindetasche für das 5'-Ende des *guide* Stranges existiert. Diese kann u. a. das *cap* Analogon m^7GpppG binden und erhöht dadurch die Affinität zu einer miRNA [157]. Auch für hAgo2 ist eine mögliche Bindung der *cap* Struktur, ähnlich der durch eIF4E, beschrieben. Hierfür werden vor allem zwei Phenylalanine verantwortlich gemacht [162]. Allerdings zeigen neuere strukturelle Studien der humanen Mid Domäne, dass die entsprechenden Aminosäuren sich nicht an der Proteinoberfläche befinden [128]. Die Beteiligung der m^7G *cap* Struktur an der siRNA- oder miRNA-Bindung durch

hAgo2 ist deshalb fraglich.

6.2 Stabilität von rekombinantem hAgo2 und hTRBP

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die untersuchten RISC-Komponenten hAgo2 und hTRBP *in vitro* zur Bildung von Multimeren neigen. Für hAgo2 ist dieser Umstand in der Literatur bislang nicht ausführlich beschrieben. Für hTRBP konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung von oligomeren Strukturen von der Proteinkonzentration abhängt [204]. In jedem Fall wird die Frage nach einer biologischen Relevanz für die Tendenz zur Bildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgeworfen.

Ein Hinweis auf die physiologische Rolle dieses *in vitro* beobachteten Phänomens liegt in der Vielzahl der Proteine, mit denen hAgo2 und hTRBP wechselwirken. Für hAgo2 ist bislang u. a. die Wechselwirkung mit den an der RNAi beteiligten Proteinen Dicer, TRBP und PACT [79, 146–148], den GW182-Paralogen TNRC6A und B [147, 149, 150], DCP1a und 2 [85], TTP [151], der Methyltransferase PRMT5 [147], dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E sowie Rck/p54 [152] nachgewiesen. hTRBP kann neben hAgo2, PACT und Dicer [216, 217, 234] die PKR [262] und das mit dem Zytoskelett assoziierte Protein Merlin [263] binden. Außerdem wiesen Laraki *et al.* nach, dass TRBP und PACT Homodimere bilden [217]. Es ist davon auszugehen, dass sowohl hAgo2 als auch hTRBP weitere Interaktionspartner besitzen, deren Identität noch nicht bekannt ist. Diese Vielzahl an Wechselwirkungen deutet darauf hin, dass die Proteine in einem zellulären Signalnetzwerk eingebunden sind und ihre Funktion durch die Interaktion mit verschiedenen Faktoren individuell moduliert werden kann. Möglicherweise kommt einer Homodimerisierung von hAgo2 und hTRBP eine ähnliche Rolle zu.

6.2.1 Der Oligomerisierungszustand von hAgo2 wird durch RNAs beeinflusst

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Oligomerisierungszustand von NHA-hAgo2 *in vitro* untersucht (siehe Abschnitt 5.5.5). Dadurch konnten zum Einen Hinweise für die richtige Handhabung von hAgo2 und darüber hinaus mit Hilfe von Dynamischer Lichtstreuung Erkenntnisse über enzymatisch aktives hAgo2 gewonnen werden. Zuvor war durch Größenausschlusschromatographie ermittelt worden, dass ein Teil von NHA-hAgo2 in Lösung als große Komplexe vorliegt, die mindestens 10 – 13 Monomere umfassen. Zur Informationsgewinnung dienten zwei Messgrößen. Im ersten Fall lieferten Regularisierungs-Histogramme Informationen über die Zusammensetzung der Lösung. Dadurch wurde die Anzahl verschiedener Populationen ermittelt und diese bezüglich ihrer hydrodynamischen Radien (R_h), ihrer Polydispersität und dem Anteil an der Gesamtmasse charakterisiert. Zum Anderen wurde der durchschnittliche hydrodynamische Radius aller Populationen (R_d) für die Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Proteinlösung herangezogen.

Es gelang die Isolierung einer homogenen Population NHA-hAgo2, dessen enzymatische Aktivität bestätigt wurde (siehe Abbildungen 5.16 und 5.13). Die Zusammensetzung dieser Population war während der Lagerung bei $4\,°C$ über mehrere Wochen stabil. Dies eröffnete die Möglichkeit, den Oligomerisierungszustand von hAgo2 isoliert oder in Anwesenheit von *guide* und *target* RNA, also während der Ausübung seiner enzymatischen Aktivität, zu beobachten. Der hydrodynamische Radius dieser Population betrug $8-10\,\mathrm{nm}$. Zunächst zeigte sich, dass sich durch Inkubation von *guide* und *target* RNA eine Population mit größerem hydrodynamischem Radius ($17-21\,\mathrm{nm}$) bildete, die die in Abwesenheit von Nukleinsäuren beobachtete kleinere Population vollständig ersetzte. Zusammen mit dem Nachweis des *target* RNA-Umsatzes impliziert dies, dass diese Population Komplexe aus NHA-hAgo2, *guide* und *target* RNA beinhaltet.

Die Stabilität von NHA-hAgo2 wurde in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit untersucht. In beiden Fällen konnte die Oligomerisierungstendenz des Proteins durch RNAs beeinflusst werden.

Die Thermostabilität des Proteins in Lösung wird durch *target* RNA erhöht. Die Inkubation von NHA-hAgo führte zu einer Zunahme der durchschnittlichen Radiengröße mit zunehmender Temperatur, was auf die Aggregation des Proteins hin deutet. Im Falle der Koinkubation mit *target* RNA wird die durchschnittliche Radienzunahme deutlich um den Faktor 4 reduziert (siehe Abbildung 5.17 D). Dieser Effekt wird in Anwesenheit einer komplementären *guide* RNA aufgehoben, da es in diesem Fall zur Bildung spaltungsaktiver Komplexe und somit zum *slicing* der *target* RNA kommt. Die Anwesenheit einer *guide* RNA allein reicht nicht aus, um die Thermostabilität von NHA-hAgo2 zu erhöhen. Interessanterweise hebt die Anwesenheit einer nicht-komplementären *guide* RNA den schützenden Effekt der *target* RNA ebenfalls auf, obwohl es in diesem Fall nicht zum *slicing* kommt.

Bei $25\,°C$ zeigt die *guide* RNA einen stabilisierenden Effekt auf die enzymatisch aktive NHA-hAgo2-Population (siehe Abbildung 5.17 C). Bei der Inkubation von NHA-hAgo2 mit *guide* und *target* RNA bleibt die Zusammensetzung der Populationen in Lösung stabil. Bei Entzug der *guide* RNA findet jedoch eine Zunahme der durchschnittlichen Radien in Abhängigkeit der Zeit statt. Nach etwa $1\,\mathrm{h}$ ist hierbei eine Plateauphase erreicht. Die durchschnittliche Radiengröße in An- bzw. Abwesenheit von *guide* RNA unterscheidet sich um den Faktor 4. Somit wird deutlich, dass NHA-hAgo2 in Lösung durch die Anwesenheit von RNAs stabilisiert werden kann.

6.2.2 Der Oligomerisierungszustand von hTRBP ist RNA-unabhängig

In Abschnitt 5.6.2 wurde die siRNA-Bindungseigenschaft von hTRBP-His untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Protein die siRNA in mehreren distinkten Komplexen bindet, die durch Banden verschiedener elektrophoretischer Mobilität sowie großen Oligomeren, die die Porenweite des Gels überschreiten, repräsentiert wird. Mittels fraktionierter Zentrifugation wurde

die Verteilung von verschiedenen Proteinpopulationen analysiert (siehe Abschnitt 5.6.3). Anhand dieser Daten zeigte sich, dass etwa 75 % von hTRBP-His in Komplexen vorliegen, deren Radius größer als 50 nm ist. Oligomere Strukturen dieser Größenordnung sind auf Grund ihrer Größe nicht in der Lage, in ein nicht-denaturierendes Gel einzuwandern, wie es im Fall der Gelverzögerungs-Analysen verwendet wurde. Diese Spezies ist deshalb vermutlich identisch mit derjenigen, die sich bei den Gelverzögerungs-Analysen innerhalb der Geltaschen befindet.

Gredell *et al.* beschrieben in Gelverzögerungs-Analysen ebenfalls das Phänomen mehrerer distinkter Banden, und postulierten, dass es sich bei den verschiedenen Banden um siRNA-bindende Mono-, Di- und Tetramere handeln könnte [237]. Durch eine Zentrifugation für 1 h bei 4 $°C$ und 150.000 × g wurden diejenigen Proteinpopulationen isoliert, deren Radien weniger als 50 nm betrugen und anhand von Dynamischer Lichtstreuung analysiert (siehe Abschnitt 5.6.3). Es wurden zwei Populationen detektiert, die auf Grund ihrer Molekülradien vermutlich Mono- bis Dimere sowie Di- bis Tetramere enthalten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Arbeiten von Gredell *et al.* und den Daten der Gelverzögerungs-Analysen dieser Arbeit.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde eine Größenausschlusschromatographie von hTRBP-His in An- und Abwesenheit von siRNA durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6.3). In Abwesenheit von siRNA konnte gezeigt werden, dass hTRBP nur zu einem geringen Teil in mono- bis tetramerer Form vorliegt. Der weitaus größere Teil eluierte in Proteinkomplexen, die mindestens 30 Moleküle umfassten. Nach Beladung von hTRBP-His mit siRNA wurde eine weitere Größenausschlusschromatographie durchgeführt und beide Chromatogramme verglichen. Die Bindung der siRNA zeigte dabei keinen Einfluss auf die Verteilung der mono- bis oligomeren Strukturen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Daten der Gelverzögerungs-Analysen (siehe Abschnitt 5.6.2).

Die Ergebnisse von Gelverzögerungs-Analysen, fraktionierter Zentrifugation, DLS und Größenausschlusschromatographie geben einen ersten Einblick in das komplexe Oligomerisierungsverhalten von hTRBP. In Kombination implizieren die gezeigten Daten, dass das Protein parallel in monomerem, dimerem, oligomerem und aggregiertem Zustand in Lösung vorliegt. Dabei ist ein Einfluss der Proteinkonzentration denkbar [204]. Interessanterweise scheint die Bindung von siRNA mehrheitlich unabhängig von der Größe der Proteinkomplexe zu sein.

6.3 Charakterisierung der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkungsweise der zentralen Komponente des humanen RISC, hAgo2, detailliert untersucht. Zu diesem Zweck wurde die siRNA-abhängige Spaltung von *target* RNA in Teilreaktionen untergliedert und diese individuell charakterisiert. Dazu gehören die Bindung des *guide* Stranges, die Erkennung und Bindung der *target* RNA, ihre Spaltung und die Freisetzung der gespaltenen Fragmente aus dem ternären Komplex (siehe

Abbildung 2.7). Zu diesen vier Teilprozessen wurden quantitative biochemische und kinetische Analysen durchgeführt. Mittels Protein/RNA-Bindungsstudien wurden Substratbindungsparameter wie die Affinität von hAgo2 für siRNA bzw. die Affinität des binären Komplexes zur *target* RNA gemessen. Die Bindungsreaktionen wurden anschließend in Bezug auf die Anzahl der Phasen charakterisiert sowie die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt. Die sequenzspezifische *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 wurde untersucht und schließlich die Freisetzung der Spaltprodukte charakterisiert. Mit Hilfe der experimentell ermittelten Parameter wurde ein minimales kinetisches Modell der siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten *target* RNA-Spaltung etabliert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zu den einzelnen Teilprozessen diskutiert.

6.3.1 Die Beladung von hAgo2 mit siRNA ist abhängig von der Beschaffenheit des 5'-Endes des *guide* Stranges

Als erster der vier oben beschriebenen Teilprozesse wurde die Beladung von hAgo2 mit drei verschiedenen siRNA-Substraten untersucht. Während dieses Schrittes wird hAgo2 programmiert. Da die Erkennung und Spaltung der *target* RNA in Abhängigkeit des *guide* Stranges vollzogen wird, ist die initiale Beladung von hAgo2 von grundlegender Bedeutung für die RNAi.

Die kleinen regulatorischen siRNAs und miRNAs teilen im zellulären Kontext drei Eigenschaften: Sie sind etwa 19 – 25 nt lang. Außerdem tragen ihre 5'-Enden eine Phosphatgruppe und ihre 3'-Enden weisen jeweils einen Überhang von 2 nt Länge auf [30–33]. Bislang wurde angenommen, dass rekombinantes hAgo2 *in vitro* im Gegensatz zum RISC innerhalb einer Zelle oder bei Verwendung von Zellextrakt nur durch eine einzelsträngige *guide* RNA programmierbar ist [35, 199]. Basierend auf diesen Eigenschaften wurden drei siRNA-Substrate gewählt, um mechanistische Einsicht in die Beladung von rekombinantem hAgo2 zu erhalten. Alle drei Substrate trugen aus experimentellen Gründen eine FAM-Markierung an Nukleotid 14 des jeweiligen *guide* Stranges. Bei den siRNAs handelte es sich um den am 5'-Ende phosphorylierten *guide* Strang P-as2B-FAM, den sequenzidentischen, unphosphorylierten *guide* Strang OH-as2B-FAM sowie die doppelsträngige siRNA P-si2B-FAM, welche aus P-as2B-FAM und dem komplementären Gegenstrang s2B besteht und derart hybridisiert ist, dass an den 3'-Enden je zwei 2 nt lange Überhänge existieren (siehe Abschnitt 3.8.2 und Abbildung 5.22).

hAgo2 zeigt eine Präferenz für einzelsträngige, am 5'-Ende phosphorylierte RNA

Die Messung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für einen Komplex aus GST-hAgo2 und P-as2B-FAM enthüllte eine hohe Affinität des Proteins zu einem am 5'-Ende phosphorylierten *guide* Strang ($K_d = 7{,}1\,\text{nM}$). In der Literatur sind bereits einige K_ds für vergleichbare Komplexe beschrieben [199, 260]. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert ist mit diesen teilweise gut vergleichbar (siehe Tabelle 6.1). Die Abweichungen könnten auf die Verwendung

unterschiedlicher Expressions- und Isolierungssysteme sowie die unter verschiedenen Proteinpräparationen üblichen leichten Unterschiede zurückzuführen sein. Da mit verschiedenen Substraten gearbeitet wurde, lässt sich auch ein Einfluss der Sequenz, Länge oder Synthetisierung nicht ausschließen. Ein möglicher Einfluss des 5'-terminalen Nukleotides kann allerdings ausgeschlossen werden, da alle untersuchten Substrate an dieser Stelle ein U aufweisen [128]. Natürlich muss bei den Arbeiten von Tan *et al.* beachtet werden, dass die Daten mit murinem statt humanem Ago2 erhoben wurden. Beide Proteine sind zu 99 % identisch [260].

K_d (nM)	experimentelles System		Referenz
	Protein	Substrat	
7,1	bakteriell exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2	P-as2B-FAM (21 nt)	Abschnitt 5.7.2
83	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2	19-as (19 nt)	[199]
61	aus HeLa-Zellen immunpräzipitiertes HA-hAgo2	19-as (19 nt)	[199]
9,8	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes GST-mAgo2	let-7a (22 nt)	[260]

Tabelle 6.1: Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem (h) oder murinem (m) Ago2 und am 5'-Ende phosphorylierter einzelsträngiger *guide* RNA.

Eine feste Bindung der *guide* RNA durch hAgo2 scheint biologisch sinnvoll. Schließlich ist der programmierte RISC ein zum multiplen Umsatz fähiger Enzymkomplex [61–63]. Nach der Programmierung muss der *guide* Strang für die Erkennung und Bindung der *target* RNA an hAgo2 gebunden bleiben. Auch nach ihrer Spaltung und der Produktfreisetzung müssen hAgo2 und *guide* RNA assoziiert bleiben. Eine feste Assoziation der beiden Bindungspartner ist bereits beobachtet worden. Weder unter Hochsalzbedingungen (2,5 M KCl oder 2,5 M NaCl) noch bei der Verwendung von 1 M Harnstoff konnte die Dissoziation des RISC und einer gebundenen siRNA bewirkt werden [35, 168]. Weiterhin scheint es bisher unmöglich, einen programmierten RISC durch eine kompetierende siRNA zu reprogrammieren [264, 265]. Ob die Anwesenheit einer spezifischen *target* RNA einen Einfluss auf die siRNA-Bindung ausübt, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die Entfernung der Phosphatgruppe am 5'-Ende der *guide* RNA führte zu einer signifikant verringerten Affinität. Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante für einen Komplex aus GST-hAgo2 und OH-as2B-FAM ist um ein 15-faches geringer ($K_d = 106$ nM) als für denjenigen aus GST-hAgo2 und der sequenzidentischen P-as2B-FAM ($K_d = 7{,}1$ nM). Dies bietet eine Erklärung, warum die Spaltungsaktivität von Ago2 bei einer Programmierung mit un-

phosphorylierter *guide* RNA als vermindert beschrieben wurde [35, 199]. Weiterhin ist dieses Ergebnis konsistent mit strukturellen Daten prokaryonter Ago Proteine im Komplex mit einer an ihrem 5'-Terminus phosphorylierten *guide* DNA [119]. Diese Daten implizieren, dass die Phosphatgruppe durch ein Mg^{2+}-Ion sowie einige konservierte Aminosäuren koordiniert wird und dadurch für die korrekte Positionierung des *guide* Stranges verantwortlich ist (siehe Abbildung 2.5 B). Tabelle 6.2 zeigt einen Vergleich des in dieser Arbeit ermittelten K_ds mit einer vergleichbaren Konstante aus der Literatur. Wie bereits oben diskutiert, lässt sich die Abweichung beider Werte durch Unterschiede im experimentellen System erklären. In beiden Fällen ist der K_d jedoch höher als bei einem Komplex, der aus hAgo2 und einer am 5'-Ende phosphorylierten *guide* RNA besteht. Im hier untersuchten Fall unterscheiden sich beide um den Faktor 15. Im Fall von Lima *et al.* ist die Abweichung mit einem Faktor 5 geringer ausgeprägt. In beiden Fällen wird jedoch die wichtige Rolle der kritischen Phosphatgruppe bei der Verankerung des *guide* RNA-5'-Endes deutlich.

K_d (nM)	experimentelles System		Referenz
	Protein	Substrat	
106	bakteriell exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2	OH-as2B-FAM (21 nt)	Abschnitt 5.7.2
395	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2	19-as (19 nt)	[199]

Tabelle 6.2: Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem (h) Ago2 und am 5'-Ende nicht-phosphorylierter einzelsträngiger *guide* RNA.

Im zellulären Kontext tragen miRNAs und siRNAs auf Grund ihrer Biogenese durch Dicer eine 5'-Phosphatgruppe [31–33]. Es ist nicht bekannt, ob endogen siRNA- oder miRNA-Substrate existieren, die dieses Charakteristikum nicht aufweisen. Falls dies der Fall sein sollte, wäre eine gezielte Dephosphorylierung als regulatorischer Prozess vorstellbar, um ungewünschte siRNAs oder miRNAs in geringerem Maß in den RISC einzubauen. Jedoch sind diese Annahmen spekulativ.

Bislang galt die Programmierung von rekombinantem hAgo2 mit einer doppelsträngigen siRNA als unmöglich. Der Umsatz von *target* RNA fand – im Gegensatz zur Beladung mit einem einzelsträngigen *guide* Strang – bei den Arbeitsgruppen um Liu und Lima nicht statt [35, 199]. Außerdem gelang nicht eine UV-induzierte Vernetzung von hAgo2 mit einer doppelsträngigen siRNA, wohingegen dies für eine einzelsträngige *guide* RNA gezeigt werden konnte [200]. Bei den Studien zur Substrataffinität zeigte GST-hAgo2 eine unerwartet hohe Affinität zur doppelsträngigen P-si2B ($K_d = 47{,}9$ nM). Damit ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante für einen Komplex aus GST-hAgo2 und die doppelsträngige P-si2B-FAM nur etwa 7-fach größer als diejenige für den die einzelsträngige P-as2B-FAM enthaltenden Komplex. Sie ist

weiterhin kleiner als diejenige für den Komplex aus GST-hAgo2 und der unphosphorylierten einzelsträngigen OH-as2B-FAM. Dieses Ergebnis impliziert, dass die Beladung von rekombinantem hAgo2 *in vitro* entgegen der bisher gängigen Meinung doch möglich ist.

Bislang existieren nur wenige Daten zur Affinität von hAgo2 zu einem doppelsträngigen siRNA-Substrat. Lima *et al.* untersuchten die Affinität von GST-hAgo2 zu einem doppelsträngigen 19-mer (siehe Tabelle 6.3), allerdings wies das verwendete Substrat keine Überhänge am 3'-Ende auf [199]. Da die PAZ Domäne genau jene Überhänge bevorzugt bindet [121–123, 125], scheint die geringe Affinität für dieses Substrat nicht überraschend. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert zeigt die Bedeutung der 2 nt langen Überhänge an den 3'-Enden einer siRNA.

K_d (nM)	experimentelles System		Referenz
	Protein	Substrat	
47,9	bakteriell exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2	P-si2B-FAM (21 nt)	Abschnitt 5.7.2
6297	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2	19-as/19-s (19 nt)	[199]
>1000	aus HeLa-Zellen immunpräzipitiertes HA-hAgo2	19-as/19-s (19 nt)	[199]

Tabelle 6.3: Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem (h) Ago2 und doppelsträngiger phosphorylierter siRNA.

Da die Beladung des RISC innerhalb der Zelle durch eine doppelsträngige siRNA erfolgt, hAgo2 *in vitro* jedoch eine Präferenz für einzelsträngige RNA zeigt [35, 199, 200], muss vermutet werden, dass ein bisher nicht identifizierter Faktor existiert, der die *in vivo* Beladung erleichtert. Es ist denkbar, dass diese Aufgabe durch dsRNA-bindende Proteine wie PACT und TRBP wahrgenommen wird. Da TRBP Teil des RLC ist, wird bereits seit einiger Zeit eine mögliche Funktion bei der Übergabe einer durch Dicer prozessierten doppelsträngigen siRNA an hAgo2 diskutiert [34, 238, 256].

Die effektive hAgo2-Beladung erfordert die Verankerung des *guide* Strang-5'-Endes

Neben einer vergleichenden Analyse der Substratbindungsparameter unter Gleichgewichtsbedingungen können auch *pre-steady state* Untersuchungen Aufschluss über den Mechanismus der hAgo2-Beladung liefern. Nach eigenem Kenntnisstand stellt diese Arbeit die ersten transientenkinetischen Analysen der siRNA-Bindung durch rekombinantes humanes Ago2 vor.

Die Beladung von hAgo2 durch einzel- oder doppelsträngige siRNA ist ein Prozess, der

mindestens drei Phasen mit sich unterscheidenden Geschwindigkeitsratenkonstanten durchläuft (siehe Abschnitt 5.7.3). Die Assoziationsratenkonstante der ersten Phase ist abhängig von der Konzentration des Proteins und stellt daher aller Wahrscheinlichkeit nach die diffusionskontrollierte Bildung eines initialen Kollisionskomplexes dar. Dabei ist es unerheblich, ob die siRNA einzel- oder doppelsträngig ist oder sie eine Phosphatgruppe am 5'-Ende trägt. Der einzige mögliche Grund für unterschiedliche Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten besteht in einer unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeit der beteiligten Komponenten. Da in allen drei Fällen hAgo2 einer der Bindepartner ist, müssen Unterschiede der Geschwindigkeitsratenkonstanten demnach auf die siRNA-Substrate zurückzuführen sein. Die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten des ersten Bindungsschrittes für Komplexe aus GST-hAgo2 und P-as2B-FAM bzw. OH-as2B-FAM sind praktisch identisch. Im Fall von GST-hAgo2 und der doppelsträngigen P-si2B-FAM verläuft die Assoziation und Dissoziation etwas schneller (siehe Tabelle 5.2). Möglicherweise findet deshalb die Diffusion von P-si2B-FAM schneller statt als bei den einzelsträngigen siRNA-Substraten.

Die zweite und dritte beobachtete Phase sind nicht von der Proteinkonzentration abhängig. Deshalb ist anzunehmen, dass sie konformationelle Umlagerungen des Komplexes beschreiben, die für die Beladung von hAgo2 notwendig sind. Für die Bindung einer *guide* DNA durch *T. thermophilus* Ago sind dies die Verlängerung der basischen Bindungsfurche durch eine Rotation der Mid Domäne sowie eine Drehung der PAZ Domäne, was in der Verengung des Kanals und dadurch in einer festen Bindung des *guide* Stranges resultiert (siehe Abbildung 2.8) [28, 153]. Die Geschwindigkeitsratenkonstanten des zweiten Assoziationsschrittes ähneln sich untereinander, im Gegensatz zu den entsprechenden Dissoziationsratenkonstanten, die um den Faktor 10 voneinander abweichen (siehe Tabelle 5.2). Da sich die Substrate P-as2B-FAM und OH-as2B-FAM nur durch die 5'-terminale Phosphatgruppe unterscheiden, müssen unterschiedliche kinetische Parameter auf dieses Merkmal zurückzuführen sein. Da die Phosphatgruppe für die Verankerung des *guide* Stranges in der Mid Bindetasche zuständig ist (siehe Abbildung 2.5 B) [119], impliziert dies, dass die zweite Phase bei der hAgo2-Beladung die Bindung des 5'-Endes des *guide* Stranges repräsentiert. Bei Abwesenheit der kritischen Phosphatgruppe ist dieser Prozess erschwert, was zu einer beschleunigten Dissoziation führt und unter Gleichgewichtsbedingungen in einer verminderten Affinität resultiert. Auch der Vergleich von Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten des zweiten Schrittes von GST-hAgo im Komplex mit P-as2B-FAM bzw. P-si2B-FAM zeigt einen signifikanten Unterschied bei der Rückreaktion um den Faktor 30, während die Hinreaktion bei Bindung einer einzel- oder doppelsträngigen siRNA vergleichbar schnell abläuft (siehe Tabelle 5.2). Bei einer doppelsträngigen siRNA ist das 5'-terminale Nukleotid des *guide* Stranges mit dem dritten Nukleotid des *passenger* Stranges gepaart. Es wäre zu erwarten, dass für die Verankerung zum Einen Energie aufgewendet werden muss, um die Watson-Crick-Basenpaarung aufzubrechen. Zum Anderen weist ein gebundener *guide* Strang einen Knick im Phosphat-

rückgrat zwischen seinem ersten und zweiten Nukleotid auf [119]. Da die Ratenkonstanten des zweiten Bindungsschrittes jeweils sehr ähnlich sind, scheint dies jedoch keinen limitierenden Faktor für die Reaktion darzustellen. Statt dessen ist ein signifikanter Unterschied bei der Dissoziation zu beobachten. Möglicherweise wird die Rückreaktion durch den energetischen Vorteil beschleunigt, der die Paarung des frei werdenden 5'-terminalen Nukleotides des *guide* Stranges mit der *passenger* RNA begleitet.

In einem binären Komplex aus *T. thermophilus* Ago und einer 21 nt langen *guide* DNA liegt nicht nur das 5'-Ende gebunden vor. Es ist auch eine Verankerung des 3'-Endes in der PAZ Domäne erforderlich [28, 120]. Eventuell beschreibt die dritte beobachtete Phase konformationelle Änderungen im Komplex, die mit diesem Prozess einhergehen. Die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten des dritten Bindungsschrittes für die drei Substrate P-as2B-FAM, OH-as2B-FAM und P-si2B-FAM sind sich sehr ähnlich (siehe Tabelle 5.2). Die beiden einzelsträngigen siRNAs unterscheiden sich nicht in ihrem 3'-terminalen Bereich. Wenn man die letzten beiden Nukleotide des *guide* Stranges von P-si2B-FAM betrachtet, so sind auch diese nicht nur sequenzidentisch, sondern auf Grund der Überhänge ungepaart. Die PAZ Domäne weist eine unspezifische Affinität für einzelsträngige siRNAs auf [121–123, 125] und bindet nicht mehr als 2 nt (siehe Abbildung 2.4 B). Deshalb sind unterschiedliche Ratenkonstanten bei der Verankerung des 3'-Endes in der PAZ Domäne auch nicht zu erwarten.

Die Unterschiede zwischen Assoziation und Dissoziation spiegeln sich auch in Daten von Lima *et al.* wider, die die Kinetik der Bindungsreaktion von GST-hAgo2 und einer 19 nt langen, phosphorylierten *guide* RNA unter Gleichgewichtsbedingungen untersuchten [199]. Sie bestimmten für die Assoziation eine Ratenkonstante zweiter Ordnung von $1{,}2 \times 10^5\ M^{-1}s^{-1}$ und für die Dissoziation eine Ratenkonstante von $0{,}0068\ s^{-1}$. Da die Untersuchungen nicht im *pre-steady state* durchgeführt wurden, konnten Assoziation und Dissoziation nicht in Teilprozesse aufgelöst werden, wie dies in dieser Arbeit geschehen ist. Außerdem konnte auch in dieser Studie eine 15-fache Beschleunigung der Dissoziation beobachtet werden, wenn bei einer sequenzidentischen *guide* RNA die 5'-terminale Phosphatgruppe entfernt wurde [199].

Durch die Maskierung bestimmter Bereiche von einzelsträngigen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten *guide* RNAs konnte die Interpretation der experimentellen Daten erhärtet werden. Bei der Maskierung des 5'-Endes durch ein sperriges Fluorophor war die Bildung von Kollisionskomplexen beobachtbar. Dieser Prozess lief mit vergleichbarer Geschwindigkeit ab. Allerdings wurde die *guide* RNA nicht korrekt gebunden – die Phasen zwei und drei waren nicht zu beobachten. Dies ist konsistent mit Studien, bei denen die Maskierung des *guide* Strang-5'-Endes eine starke Beeinträchtigung der RNAi zeigte [170–172] und impliziert, dass die Verankerung des 5'-Endes in der Mid Domäne nicht stattfinden konnte. Weiterhin legt dies die Annahme nahe, dass es sich bei den Phasen zwei und drei um sequenzielle Prozesse handelt, da auch die dritte Phase der Bindungsreaktion nicht länger beobachtet werden konnte. Die Maskierung von zentralen Bereichen oder des 3'-Endes der *guide* RNA führte nicht zu

einer Beeinträchtigung der Komplexbildung. Demnach ist eine effektive Beladung von hAgo2 durch einzel- oder doppelsträngige siRNA nach der initialen Bildung eines Kollisionskomplexes maßgeblich durch die Verankerung des *guide* RNA-5'-Endes determiniert. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem theoretischen Modell, dass die Erkennung der siRNA durch eine Wechselwirkung der 3'-terminalen Überhänge mit der PAZ Domäne vermittelt wird [25].

Anhand der transientenkinetisch ermittelten Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten lässt sich ein K_d für die Komplexe aus GST-hAgo2 und den drei verschiedenen siRNA-Substraten berechnen. Diese weichen zum Teil erheblich von den unter Gleichgewichtsbedingungen experimentell bestimmten Werten ab (siehe Tabelle 5.2). Eine mögliche Erklärung hierfür besteht darin, dass in Messungen unter *pre-steady state* Bedingungen die langsame Diffusion von teilweise oligomerisiertem hAgo2 ins Gewicht fällt, was unter *steady state* Bedingungen nicht der Fall ist. Dies wird durch den Vergleich der Diffusionsgeschwindigkeit der Reversen Transkriptase von HIV-1 gestützt, die mit 117 kDa ein ähnlich großes Protein ist und deshalb mit vergleichbarer Geschwindigkeit diffundieren sollte. Die Assoziationsratenkonstante zweiter Ordnung der Kollisionskomplexbildung mit einem DNA/RNA-Hybrid beträgt $k_{1,\,\text{HIV-1 RT}} = 5{,}4 \times 10^8\,\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, die zugehörige Dissoziationsratenkonstante $k_{-1,\,\text{HIV-1 RT}} = 18\,\text{s}^{-1}$ [266]. Damit ist die Assoziation etwa 10-fach schneller als diejenige von hAgo2 mit einer *guide* RNA ($k_{1,\,\text{hAgo2}} = 0{,}6 \times 10^8\,\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), wohingegen der zugehörige Dissoziationsprozess nur etwa 3-fach schneller ist ($k_{-1,\,\text{hAgo2}} = 6{,}2\,\text{s}^{-1}$). Es wäre weiterhin denkbar, dass durch die Oligomerisierung die Domänenbewegung von hAgo2 eingeschränkt ist und dadurch die gesamte Bindungsreaktion verzögert wird. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindungsreaktion eine oder mehrere weitere Phasen durchläuft, die mit dem hier verwendeten experimentellen System nicht beobachtbar sind und zusätzlich in den berechneten K_d eingehen. Schließlich muss noch die Ungenauigkeit der ermittelten Messwerte berücksichtigt werden, die sich bei der Berechnung des K_d fortpflanzen und deshalb ins Gewicht fallen. Trotz der Abweichungen zwischen experimentell ermittelten und berechneten Werten zeigt auch der Datensatz der berechneten K_ds, dass die Affinität von GST-hAgo2 zu einer einzelsträngigen, phosphorylierten *guide* RNA am größten ist, gefolgt von der Affinität zu einer doppelsträngigen siRNA, die einen phosphorylierten *guide* Strang enthält. Die beiden Werte unterscheiden sich durch den Faktor 5. Die Abwesenheit der Phosphatgruppe am *guide* Strang verringert die Affinität zum *guide* Strang um den Faktor 21.

6.3.2 Die Erkennung und Bindung der *target* RNA erfolgt durch Wechselwirkungen mit der *guide* RNA

Der zweite Schritt bei der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung ist ihre Erkennung und Bindung durch den binären hAgo2/*guide* RNA-Komplex. Dieser Prozess ist abhängig von der Sequenz der *guide* RNA, was der RNAi ihre hohe Spezifität verleiht. Demnach ist anzunehmen, dass die Wechselwirkung zwischen *target* RNA und binärem Komplex hauptsächlich über die beiden RNAs vermittelt wird. Als Voraussetzung für die experimentelle Untersuchung dieses Schrittes ist es erforderlich, keine weiteren Prozesse zuzulassen als die Bildung des ternären Komplexes. Hierfür konnten experimentelle Bedingungen gefunden werden. In Abwesenheit von Mg^{2+} bilden sich binäre Komplexe und eine Hybridisierung von *guide* und *target* RNA ist möglich, allerdings wird die Spaltung der *target* RNA unter diesen Bedingungen verhindert (siehe Abschnitt 5.8.1).

Eine *target* RNA besitzt eine oder mehrere Erkennungssequenzen, also Bereiche, die komplementär zur *guide* RNA sind. Diese Bereiche können Watson-Crick-Basenpaarungen eingehen. Erkennungssequnzen in endogenen *target* mRNAs finden sich meistens im 3'-UTR, insbesondere bei den *target* RNAs von miRNAs [16]. Die Zugänglichkeit der Erkennungssequenzen ist von großer Bedeutung für die Effizienz der RNAi. Je leichter eine Paarung zwischen *guide* und *target* RNA erfolgen kann, desto größer ist der RNAi-Effekt [182–185, 200]. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene *target* RNAs verwendet, die die gleiche Erkennungssequenz enthalten, das ICAM-1-IVT sowie s2B. Ersteres ist 140 nt lang und enthält eine 19 nt lange Erkennungssequenz. Durch eine theoretische Sekundärstrukturvorhersage mit Hilfe des Programms mFold [245, 246] lässt sich sagen, dass die Erkennungssequenz mit großer Wahrscheinlichkeit in einem ungepaarten Bereich vorliegt, so dass die Zugänglichkeit gewährleistet ist. Im zweiten Fall enthält die *target* RNA s2B nur die um zwei Nukleotide verlängerte Erkennungssequenz. Auf Grund ihrer geringen Länge von 21 nt ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich komplexe Sekundärstrukturen bilden, sehr gering. In beiden Fällen kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Zugänglichkeit der *target* RNA keinen limitierenden Faktor darstellt. Weiterhin war weder im maximalen Umsatz noch in der Geschwindigkeit der Gesamtreaktion ein signifikanter Unterschied bei der alternativen Verwendung der langen und der kurzen *target* RNA erkennbar.

Bei den Studien zur *target* RNA-Erkennung und -Bindung wurde zum Einen als *guide* RNA das mit einem Fluorophor markierte P-as2B-FAM sowie das mit einem Fluoreszenzlöscher gekoppelte s2B-BHQ verwendet. Hierbei handelt es sich um eine funktionelle *target* RNA (siehe Abschnitt 5.10.1). Der Vorteil bei der Verwendung dieses *molecular beacons* ist die fast vollständige Fluoreszenzlöschung und die damit einhergehende Güte der experimentellen Daten. Außerdem erlaubt dieses System, vor der Assemblierung des ternären Komplexes die korrekte Bildung binärer Komplexe aus GST-hAgo2 und P-as2B-FAM zu kontrollieren, da auch dieser Assemblierungsschritt eine Fluoreszenzsignalabnahme hervorruft. Weiterhin wurden zwei ex-

perimentelle Ansätze gewählt, bei denen entweder der *guide* Strang oder die *target* RNA eine Fluoreszenzmarkierung trug. Die Kombination dieser drei verschiedenen Strategien erlaubte die Messung der Assoziations- sowie Dissoziationsratenkonstanten von ternären Komplexen.

Der binäre Komplex bindet seine komplementäre *target* RNA mit hoher Affinität

Die Messung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für die Assemblierungsreaktion eines binären hAgo2/*guide* RNA-Komplexes und seiner komplementären *target* RNA zeigte, dass diese Bindung hoch affin ist ($K_\mathrm{d} = 0{,}18\,\mathrm{nM}$). Demnach ist die Affinität des binären Komplexes zur komplementären *target* RNA um ein 40-faches größer als die Affinität von hAgo2 zu einer kanonischen *guide* RNA ($K_\mathrm{d} = 7{,}1\,\mathrm{nM}$). Dies widerspricht den Ergebnissen von Lima *et al.* (siehe Tabelle 6.4) [199]. Zwar unterschieden sich die Daten dieser Arbeit bereits um den Faktor 15 mit den hier vorgestellten Ergebnissen, was die Affinität von GST-hAgo2 zu einer phosphorylierten *guide* RNA betrifft, weshalb eine Abweichung beider Werte nicht unerwartet ist. Jedoch scheint im Fall von Lima *et al.* die Bindung einer *target* RNA vergleichbarer Länge durch einen binären Komplex geringer affin als die Bindung einer kanonischen *guide* RNA durch hAgo2.

K_d (nM)	experimentelles System		Referenz
	binärer Komplex	Substrat	
0,18	bakteriell exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2 und P-as2B-FAM (21 nt)	s2B-BHQ (21 nt)	Abschnitt 5.8.2
204	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2 und 19-as (19 nt)	19-s (19 nt)	[199]
104	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2 und 19-as (19 nt)	20-s (20 nt)	[199]
>10000	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes GST-hAgo2 und 19-as (19 nt)	ohne Erkennungssequenz (43 nt)	[199]

Tabelle 6.4: Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem (h) Ago2 und am 5'-Ende phosphorylierter einzelsträngiger *guide* RNA sowie komplementärer oder nicht-komplementärer *target* RNA.

Das verwendete experimentelle System enthält drei Komponenten (GST-hAgo2, P-as2B-FAM und s2B-BHQ) und ist deshalb relativ komplex. Neben dem gewünschten Prozess, näm-

lich der Assemblierung eines ternären Komplexes, sind weitere Prozesse denkbar. Zum einen kann die *target* RNA mit freiem GST-hAgo2 assoziieren. Allerdings löst diese Wechselwirkung keine Signaländerung aus, was experimentell bestätigt wurde (siehe Abschnitt 5.8.1) und geht daher nicht mit in die Messdaten ein. Außerdem führen die großen Unterschiede in der Affinität von GST-hAgo2 zu einer nicht-phosphorylierten einzelsträngigen RNA ($K_\mathrm{d} = 106\,\mathrm{nM}$) im Vergleich zur Affinität des binären Komplexes zu einer komplementären *target* RNA ($K_\mathrm{d} = 0{,}18\,\mathrm{nM}$) dazu, dass die Bildung ternärer Komplexe bevorzugt abläuft. Weiterhin können *guide*/*target*-Duplexe aus dem ternären Komplex dissoziieren und mit GST-hAgo2 reassoziieren. Auch dieser Prozess ruft keine Signaländerung hervor (siehe Abschnitt 5.8.1) und verläuft durch einen geringeren K_d (47,9 nM) vermutlich in schwächerem Ausmaß. Weiterhin ist es denkbar, dass ein Teil des *guide* Stranges während der Assemblierung binärer Komplexe nicht gebunden wird und deshalb frei in Lösung vorliegt. Nach Zugabe der *target* RNA kann diese nun entweder an binäre Komplexe oder freie *guide* RNA binden. Bei diesem möglichen Szenario besitzen beide Prozesse einen ähnlichen K_d, weshalb sie parallel ablaufen könnten und führen außerdem beide zu einer Signaländerung. Deshalb wurde die Bildung binärer Komplexe vor Zugabe der *target* RNA sorgfältig kontrolliert. Das gewählte Verhältnis von GST-hAgo2 (600 nM) zu *guide* RNA (20 nM) führte zu einer maximalen Signaländerung von etwa 25 % (siehe Abschnitt 5.7.2). Als Kontrolle wurde in einem weiteren Experiment die GST-hAgo2-Konzentration zur Bildung binärer Komplexe auf 1000 nM erhöht und anschließend *target* RNA hinzugefügt. Dieses Experiment erbrachte das gleiche Ergebnis wie bei der Bildung binärer Komplexe aus 600 nM GST-hAgo2 und 20 nM *guide* RNA. Aus diesen Gründen wird davon ausgegangen, dass der Großteil der *guide* RNA an GST-hAgo2 gebunden vorliegt und deshalb nicht für eine proteinunabhängige Hybridisierung mit der *target* RNA zur Verfügung steht.

Die Affinität des binären Komplexes zur *target* RNA ($K_\mathrm{d} = 0{,}18\,\mathrm{nM}$) ist derjenigen des nicht-proteingebundenen *guide* Stranges zur *target* RNA ($K_\mathrm{d} = 0{,}38\,\mathrm{nM}$) ähnlich. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Erkennung und Bindung der *target* RNA hauptsächlich durch die RNA-Komponente des binären Komplexes vermittelt wird. Bislang ist dieser Prozess noch nicht ausreichend verstanden. Es gibt jedoch deutliche Hinweise darauf, dass die initiale Wechselwirkung zwischen dem RISC und der *target* RNA durch den *seed* Bereich vermittelt wird [200, 259]. Dieser wird im binären Komplex derart arrangiert, dass die Basen exponiert und optimal zugänglich für die *target* RNA sind [119, 169]. Außerdem bilden im ternären Komplex aus *T. thermophilus* Ago, einer *guide* DNA und einer *target* RNA Protein und *target* RNA keine Wechselwirkungen aus, wohingegen eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäureseitenketten und dem Phosphatrückgrat des *guide* Stranges entstehen [119]. Bei Affinitätsstudien mit dem Protein AfPiwi aus *A. fulgidus*, das nur eine Mid und PIWI Domäne enthält, war der K_d eines binären Komplexes zur *target* RNA 300-fach höher als derjenige bei der Hybridisierung zweier RNAs in Abwesenheit des Proteins [267].

Dies unterstreicht zum Einen eine mögliche Erleichterung der *target* RNA-Bindung nach dem Arrangement des *seed* Bereiches im binären Komplex. Zum Anderen war diese Diskrepanz mit dem hier verwendeten GST-hAgo2 nicht zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die Wechselwirkungen der *guide* RNA im N-terminalen Bereich von hAgo2, also vor allem mit der PAZ Domäne, einen hemmenden Einfluss auf die Bindung der *target* RNA haben könnte. Es wäre denkbar, dass eine vollständige *target* RNA-Bindung nur dann erfolgen kann, wenn das 3'-Ende des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne entlassen wird und in voller Länge für RNA/RNA-Wechselwirkungen zur Verfügung steht [120, 153].

Die Assemblierung ternärer Komplexe umfasst drei Phasen

Die transientenkinetische Analyse enthüllte die Existenz von drei unterscheidbaren Phasen während der Assoziation und Dissoziation ternärer Komplexe (siehe Abschnitt 5.8.3). Die Assoziationsratenkonstante des ersten Bindungsschrittes ist abhängig von der Konzentration der binären Komplexe und tritt auch bei Verwendung einer nicht-komplementären *target* RNA auf, was für den zweiten und dritten Bindungsschritt nicht gilt. Sie stellt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit die diffusionskontrollierte Bildung initialer Kollisionskomplexe dar.

Die zweite und dritte Phase sind nicht von der Proteinkonzentration abhängig. Deshalb wird angenommen, dass sie konformationelle Umlagerungen des Komplexes beschreiben, die während der Bildung katalytisch kompetenter ternärer Komplexe ablaufen.

Bei der Bindung einer *target* RNA durch einen binären *T. thermophilus* Ago/*guide* DNA-Komplex kommt es zur partiellen Öffnung der basischen Bindungsfurche, um die nötige Breite für die Assoziation mit einem Nukleinsäurehybrid zu schaffen. Dies wird durch eine Verschiebung des die N-terminale und PAZ Domäne enthaltenden Lappens erreicht (siehe Abbildung 2.8 C) [119, 153]. Nach der Bildung eines initialen Kollisionskomplexes schließt sich die Paarung des *seed* Bereiches an (siehe Abbildung 2.8 D) [255, 259]. Die Basenpaarung erfolgt über maximal zehn Nukleotide und das 3'-Ende des *guide* Stranges bleibt in der PAZ Domäne verankert. Dies stabilisiert den ternären Komplex [200]. Dieser Schritt der *target* RNA-Erkennung entspricht mutmaßlich der zweiten Phase bei Assoziations- und Dissoziationsreaktion. Sie ist auch in Abwesenheit von GST-hAgo2 bei der Hybridbildung von *guide* und *target* RNA beobachtbar, während die dritte, langsamste Phase ohne das Protein nicht auftritt.

Bevor es über den *seed* Bereich hinaus zu weiteren Basenpaarungen kommen kann, muss das 3'-Ende des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne entlassen werden (siehe Abbildung 2.8 D), was einer Art Schalterfunktion für den Wechsel zwischen aktivem und nicht aktivem hAgo2 gleichkommt [120, 153]. Die strukturellen Daten bestätigen somit das ursprünglich von Tomari und Zamore aufgestellte *two state* Modell [191]. Auch dieser Prozess ist mit einer konformationellen Umlagerung verbunden, die durch die dritte Phase repräsentiert werden könnte. Diese Annahme wird durch die Tatsache untermauert, dass die dritte Phase bei der Dissoziation des binären Komplexes eine sehr ähnliche Ratenkonstante aufweist wie die dritte

Phase bei der Assoziation des ternären Komplexes ($k_{\text{-3, binär}} = 0{,}0066\,\text{s}^{\text{-1}}$; $k_{\text{3, ternär}} = 0{,}0048\,\text{s}^{\text{-1}}$). Wenn die dritte Phase bei der Bildung binärer Komplexe tatsächlich die Verankerung des 3'-Endes des *guide* Stranges repräsentiert, so beschreibt die dritte Phase bei der Bildung ternärer Komplexe die umgekehrte Reaktion. Die gute Übereinstimmung der beiden Ratenkonstanten macht dies zu einer plausiblen Annahme. Die einhergehenden konformationellen Änderungen führen aller Wahrscheinlichkeit nach dazu, dass ein katalytisch kompetenter Komplex gebildet wird.

6.3.3 hAgo2 besitzt siRNA-Strangtrennungs- und *target* RNA-Spaltungsaktivität

Der zentrale Prozess bei der siRNA-vermittelten RNAi ist die sequenzspezifische Spaltung der *target* RNA an der kanonischen Position gegenüber dem Phosphatrückgrat zwischen dem 10. und 11. Nukleotid des *guide* Stranges [31]. Diese als *slicing* bezeichnete Reaktion unterscheidet den siRNA- vom miRNA vermittelten Weg. In menschlichen Zellen ist allein hAgo2 in der Lage, die Phosphodiesterhydrolyse durchzuführen, da die anderen hAgo Proteine 1, 3 und 4 keine Spaltungsaktivität besitzen [35]. Die Kinetik dieser Reaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht. Dazu wurden hAgo2-Konstrukte verwendet, die am N- bzw. C-Terminus mit verschiedenen Markierungen versehen waren (siehe Abbildung 5.1). Alle Konstrukte wiesen einen *target* RNA-Umsatz mit ähnlicher Geschwindigkeitsratenkonstante der Gesamtreaktion auf ($k_{\text{gesamt, NHA-hAgo2}} = 0{,}0003\,\text{s}^{\text{-1}}$, $k_{\text{gesamt, GST-hAgo2}} = 0{,}0004\,\text{s}^{\text{-1}}$ und $k_{\text{gesamt, hAgo2-His}} = 0{,}0002\,\text{s}^{\text{-1}}$; siehe Abbildung 5.12). Jedoch wurden gravierende Unterschiede den maximalen Umsatz betreffend in Abhängigkeit der Position der Markierung deutlich. Die beiden N-terminal modifizierten Konstrukte GST-hAgo2 und NHA-hAgo2 zeigten mit 91,9 % bzw. 83,5 % maximalem Umsatz eine hohe enzymatische Aktivität. Das C-terminal modifizierte Fusionsprotein hAgo2-His erzielte hingegen nur einen maximalen Umsatz von 12 %. Die verminderte Spaltungsaktivität lässt sich durch die Betrachtung struktureller Informationen durch das *T. thermophilus* Ago im Komplex mit einer *guide* DNA erklären. In diesem Protein wird die C-terminale Aminosäure, Valin685, für die Koordinierung eines Mg^{2+}-Ions benötigt, welches wiederum mit der Phosphatgruppe des 5'-terminalen Nukleotides des *guide* Stranges wechselwirkt (siehe Abbildung 2.3.4) [119]. Möglicherweise wird auch bei hAgo2 die letzte Aminosäure, Alanin859, für diese Positionierung benötigt. Beide Aminosäuren sind klein und hydrophob. Durch kürzlich veröffentlichte strukturelle Studien des die Mid und PIWI Domäne enhaltenden Lappens des *N. crassa* QDE-2 konnten Hinweise gewonnen werden, dass der C-Terminus an der hydrophoben Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen lokalisiert ist [130]. Die Einführung zusätzlicher Aminosäuren an dieser Stelle muss die Faltungsgeometrie von hAgo2 gravierend verändern, was sich in der Abnahme der enzymatischen Aktivität bemerkbar macht.

Neue Erkenntnisse über die siRNA-Toleranz von hAgo2

Nachdem die Beladung von rekombinantem hAgo2 mit einzel- und doppelsträngiger siRNA gelang, konnte auch die Spaltungsaktivität der Komplexe aus GST-hAgo2 und einzelsträngiger *guide* RNA bzw. doppelsträngiger siRNA gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.9.2). Der mit der siRNA programmierte Komplex zeigte dieselbe sequenzspezifische Spaltung an der kanonischen Stelle wie derjenige, der mit einer einzelsträngigen *guide* RNA beladen worden war. Dieses Ergebnis konnte nach eigenem Kenntnisstand bislang nicht gezeigt werden [35, 62, 199, 200] und beruht vermutlich auf der hohen enzymatischen Aktivität des verwendeten GST-hAgo2.

Das Ergebnis impliziert, dass hAgo2 in der Lage sein muss, den *passenger* Strang aus dem Hybrid zu entfernen. Dabei können aus den vorliegenden Experimenten keine Rückschlüsse gezogen werden, ob dabei seine Spaltung oder eine Entwindung der komplementären Stränge eine Rolle spielt. In der Literatur finden sich Hinweise, dass der Entfernung des *passenger* Stranges seine Spaltung durch hAgo2 vorausgeht [36]. Vermutlich ist dieser Spaltungsschritt von demjenigen der *target* RNA unterschiedlich [255]. Es steht zu vermuten, dass die Entlassung der *passenger* Strang-Spaltprodukte in vergleichbarer Geschwindigkeit abläuft wie diejenige der *target* RNA-Spaltprodukte. Dafür spricht, dass die Präinkubation von GST-hAgo2, P-si2B und komplementärer *target* RNA die Gesamtreaktion nicht beschleunigen kann (siehe Abschnitt 5.9.2). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse muss davon ausgegangen werden, dass rekombinantes hAgo2 neben seiner Fähigkeit, *target* RNA zu spalten, auch siRNA-Strangtrennungsaktivität besitzt und somit einen voll funktionsfähigen rekombinanten RISC darstellt.

Die Abwesenheit der Phosphatgruppe am 5'-Ende des *guide* Stranges führte zu einer 15-fach geringeren Affinität (siehe Abschnitt 5.7.2). Ein solch gravierender Einfluss konnte auf den maximalen *target* RNA-Umsatz nicht beobachtet werden. Dieser lag nur um 9 % niedriger als derjenige eines mit einem phosphorylierten *guide* Strang beladenen GST-hAgo2. Dies impliziert, dass die Anzahl der aktiven ternären Komplexe, bei denen die korrekte Positionierung des *guide* Stranges gelang, einen multiplen Umsatz durchführen. Eventuell werden die Komplexe auch durch die Anwesenheit der *target* RNA stabilisiert, wie dies bereits durch Dynamische Lichtstreuung gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 5.5.5).

In der Literatur sind zwei abweichende Ergebnisse beschrieben, die sich mit dem Einfluss der 5'-Phosphatgruppe am *guide* Strang auf die Spaltungsreaktion beschäftigen. Liu *et al.* konnten mit einer 21 nt langen, einzelsträngigen *guide* RNA ohne 5'-Phosphatgruppe in einem *in vitro* Spaltungsexperiment keinerlei *target* RNA-Umsatz detektieren [35]. Im Gegensatz dazu zeigten Lima *et al.* mit einer 19 nt langen *guide* RNA ohne 5'-Phosphatgruppe einen *target* RNA-Umsatz, der knapp 10 % desjenigen durch eine 5'-phosphorylierte *guide* RNA vermittelten betrug [199]. Im hier gezeigten Experiment konnte folglich mit OH-as2B als siRNA-Substrat ein ungewöhnlich hoher Umsatz erzielt werden.

Vergleichende Analyse der Michaelis-Menten-Kinetik

Zur weiteren Charakterisierung der siRNA-vermittelten Spaltung der *target* RNA durch hAgo2 und für einen Vergleich mit publizierten kinetischen Daten wurden die Parameter K_m und V_{max} ermittelt (siehe Abschnitt 5.9.3). Tabelle 6.5 zeigt eine vergleichende Übersicht der in dieser Arbeit ermittelten Werte mit solchen aus der Literatur. Statt der Berechnung von k_{cat} wurde die Ratenkonstante der Gesamtreaktion, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt repräsentiert, mit k_{cat} gleichgesetzt.

RISC	K_m (nM)	V_{max} (nMs^{-1})	[RISC] (nM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($nM^{-1}s^{-1}$)	Referenz
GST-hAgo2 und P-as2B	21,4	$9{,}0 \times 10^{-4}$	n. b.	4×10^{-4}	$1{,}9 \times 10^{-5}$	Abschnitt 5.9.3
minimaler hRISC	2,3	$7{,}1 \times 10^{-3}$	0,4	$17{,}9 \times 10^{-3}$	$7{,}8 \times 10^{-3}$	[168]
rekombinanter hRISC	1,4	$1{,}3 \times 10^{-3}$	0,15	$8{,}7 \times 10^{-3}$	$6{,}2 \times 10^{-3}$	[62]

Tabelle 6.5: Vergleich verschiedener kinetischer Parameter der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung. h: human. n. b.: nicht bestimmt.

Der in dieser Arbeit ermittelte K_m-Wert ist 9- bis 15-fach größer als die bislang publizierten Werte von den Arbeitsgruppen um Martinez und Rivas. Der V_{max}-Wert ist mit dem von Rivas *et al.* vergleichbar, während zu demjenigen von Martinez *et al.* eine Abweichung um den Faktor 8 besteht. Die Wechselzahl k_{cat} weicht von beiden Vergleichswerten um das 22- bis 43-fache ab. Demnach unterscheiden sich auch die Werte k_{cat}/K_m um einen Faktor $>$300 [62, 168].

Die unterschiedlichen Werte können mehrere Ursachen haben. Zunächst muss beachtet werden, dass der minimale hRISC von Martinez *et al.* durch eine Affinitätsreinigung aus HeLa-Zellextrakt isoliert wurde und deshalb vermutlich neben hAgo2 weitere Komponenten enthält, die einen Einfluss auf die untersuchten Parameter haben können [168]. Weiterhin wurde auch das rekombinante hAgo2 von Rivas *et al.* unter abweichenden Expressions- und Reinigungsbedingungen gewonnen [62]. Außerdem muss der Einfluss verschiedener Substrate in Betracht gezogen werden. Unterschiede in Sequenz, Länge oder Synthetisierung können sich auf die kinetischen Parameter auswirken. Insbesondere die Ausbildung verschiedener Sekundärstrukturen in langen *target* RNAs haben einen Einfluss auf die Kinetik der Spaltungsreaktion [182–185, 200]. Die größere katalytische Effizienz der Komplexe von den Arbeitsgruppen um Martinez und Rivas hängt vermutlich maßgeblich mit der imperfekten Reinigung von GST-hAgo2 zusammen. Vermutlich besitzt ein Teil der binären Komplexe keine enzymatische Aktivität, da die Proteinpräparationen teilweise nicht vollständig translatiertes hAgo2 enthalten, das aber

vermutlich trotzdem mit *guide* RNA assoziieren kann. Da es sich bei diesen verkürzten Versionen jedoch um C-terminal deletiertes Protein handelt (siehe Abschnitte 5.3.1 und 5.3.3) und die effektive Beladung von hAgo2 die korrekte Faltung seines C-terminalen Bereiches erfordert, besitzen diese deletierten Proteine vermutlich nur eingeschränkte bzw. gar keine enzymatische Aktivität.

Die Geschwindigkeit der Phosphodiesterhydrolyse ist nicht bestimmbar

In Abschnitt 5.9.1 zeigte sich, dass die hohe zeitliche Auflösung eines Standard-Spaltungsassays den Hinweis auf die Existenz einer *burst* Phase zu Beginn der Reaktion lieferte. Allerdings liegt der initiale Umsatz am Rande der Detektierbarkeit. Die entsprechende Geschwindigkeitsratenkonstante k_1 repräsentiert vermutlich die *single turnover* Reaktion, während die zweite Geschwindigkeitsratenkonstante k_2 einem multiplen Umsatz zuzuordnen ist, wie dies bereits früher beobachtet wurde [61–63]. Der beobachtete Reaktionsverlauf ist konsistent mit publizierten Daten, jedoch ist die hier ermittelte Ratenkonstante der *multiple turnover* Reaktion mit $0{,}0004\,s^{-1}$ um den Faktor 4 langsamer als diejenige, die von Ameres *et al.* publiziert wurde [200]. Dies kann mit der bereits erläuterten Tatsache zusammenhängen, dass ein Teil der Komplexe keine enzymatische Aktivität aufweist.

Es konnte ein Experiment unter Verwendung kompetierender RNA etabliert werden, in dem kein multipler Umsatz stattfindet (siehe Abschnitt 5.9.4). Es zeigte sich allerdings, dass auch dieses System nicht geeignet war, um eine verlässliche Geschwindigkeitsratenkonstante zu ermitteln. Die Sensitivität des Experiments ist für die Gewinnung qualitativ hochwertiger Daten nicht geeignet.

Es besteht die Annahme, dass die endonukleolytische Spaltung schneller abläuft als die Gesamtreaktion und dadurch nicht limitierend ist. Dies ist nach einem strukturellen Vergleich zwischen der PIWI Domäne von *P. furiosus* Ago und der humanen RNase H1 zu erwarten. Beide weisen eine sehr ähnliche Faltung auf und enthalten eine Katalytische Triade, die in vergleichbarer Weise angeordnet ist [26, 27, 62, 164]. Außerdem sind beide Enzyme von Mg^{2+} abhängig und generieren sich ähnelnde Spaltprodukte [163, 166–168]. Zusammengefasst impliziert dies einen ähnlichen Katalyse-Mechanismus. Da die *steady state* Ratenkonstante der RNA-Spaltung durch hRNase H1 $0{,}05\,s^{-1}$ beträgt (siehe Tabelle 2.2) [203], steht zu vermuten, dass es sich bei der *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 ähnlich verhält. Eine weitere Überlegung macht die Annahme plausibel, dass der katalytische Schritt eine hohe Geschwindigkeitsratenkonstante besitzt. Die Assemblierung ternärer Komplexe, die der Katalyse vorgeschaltet ist, ist ein relativ langsamer Prozess (siehe Abschnitt 5.8.3). Da im zellulären Kontext beide Reaktionen miteinander gekoppelt sind, würde die Entfernung spaltungskompetenter ternärer Komplexe aus dem System durch die *target* RNA-Spaltung das Gleichgewicht der Bindungsreaktion in Richtung der Assoziation verschieben. Je schneller also die Hydrolyse abläuft, desto mehr wird die Bildung ternärer Komplexe erleichtert. Für eine definitive Aussage zur Ge-

schwindigkeitsratenkonstante der Hydrolyse mit einhergehender verlässlicher mechanistischer Interpretation sind demnach weiterführende Experimente nötig.

6.3.4 Die Freisetzung der Spaltprodukte limitiert die Geschwindigkeit der Reaktion bei multiplem Umsatz

Abschließend wurde die Freisetzung der Spaltprodukte aus dem ternären Komplex isoliert von anderen Schritten der Reaktion betrachtet. Sowohl der zelluläre RISC als auch rekombinantes hAgo2 sind zum multiplen Umsatz fähig [61–63]. Daher muss für die Regeneration des *target* RNA-bindenden binären Komplexes nach der Phosphodiesterhydrolyse die Freisetzung der Spaltprodukte erfolgen. Dieser Prozess gilt als geschwindigkeitsbestimmend. In *D. melanogaster* Embryolysat kann die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion durch Zusatz von ATP zu einem *in vitro* Spaltungsansatz um das 4-fache gesteigert werden [63], während dies bei Verwendung von rekombinantem GST-hAgo2 statt einem Zelllysat nicht der Fall ist [62]. Es muss also im zellulären RISC eine Komponente geben, die ATP-abhängig die Spaltproduktfreisetzung beschleunigt, und diese ist nicht identisch mit hAgo2. Die in dieser Arbeit beobachtete geschwindigkeitsbestimmende Rate beträgt $0{,}0004\,s^{-1}$. Bei einer Vervierfachung ($0{,}0016\,s^{-1}$) liegt die Geschwindigkeit im Bereich der nächst langsameren Geschwindigkeitsratenkonstante, die der Assemblierung katalytisch kompetenter ternärer Komplexe unter Freisetzung des 3'-Endes des *guide* Stranges entspricht (siehe Abschnitt 5.8.3).

Es gelang die Bestimmung der Ratenkonstante für die Dissoziation von Spaltprodukten aus dem ternären Komplex. Jedoch muss davon ausgegangen werden, dass parallel die Dissoziation ungespaltener *target* RNA beobachtet wurde, da sowohl ternäre Komplexe mit gebundenen Spaltprodukten als auch solche mit gebundener, ungespaltener *target* RNA gleichzeitig während der Messung vorlagen. Die Daten deuten darauf hin, dass beide Prozesse mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen, da die Dissoziationsreaktion einen einphasigen Verlauf zeigte (siehe Abschnitt 5.10.2). Die ermittelte Ratenkonstante entspricht mit $0{,}0003\,s^{-1}$ fast exakt derjenigen der Gesamtreaktion ($k_{\text{gesamt}} = 0{,}0004\,s^{-1}$). Damit kann die Annahme bestätigt werden, dass es sich bei der Freisetzung der Spaltprodukte nach erfolgter Phosphodiesterhydrolyse um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion handelt. Außerdem ist die Ratenkonstante der Produktfreisetzung identisch mit der dritten Dissoziationsratenkonstante bei dem Zerfall ternärer Komplexe. Dies stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass die Freisetzung von gespaltener und ungespaltener *target* RNA aus dem ternären Komplex nach dem gleichen Mechanismus ablaufen.

Zuletzt wurde eine mögliche Dissoziation ternärer Komplexe durch Temperaturerhöhung untersucht. Es kam nicht zu einem Zerfall in einem Bereich von $25-60\,°C$, was die mittels Dynamischer Lichtstreuung gewonnenen Daten bestätigte (siehe Abschnitt 5.5.5). Daraus lässt sich schließen, dass GST-hAgo2 einen stabilisierenden Einfluss auf die hybridisierten Nukleinsäuren besitzt. Zusammen mit der sehr langsamen Dissoziationsratenkonstante von ternären

Komplexen, die gespaltene oder ungespaltene *target* RNA enthalten, stellt dieses Ergebnis einen weiteren Hinweis auf die Existenz eines die Spaltproduktfreisetzung erleichternden Faktors dar. Die Identität dieses Faktors muss allerdings noch aufgeklärt werden.

6.3.5 Minimales kinetisches Modell der Wirkungsweise von hAgo2

Die in den Abschnitten 5.7 – 5.10 gewonnenen sowie in den Abschnitten 6.3.1 – 6.3.4 diskutierten Daten dienten zur Etablierung eines minimalen kinetischen Modells der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2. Dies ist in Abbildung 6.1 gezeigt. Weiterhin fasst dieser Abschnitt die wesentlichen Erkenntnisse zu den einzelnen Schritten des Gesamtprozesses übersichtlich zusammen.

Programmierung von hAgo2 Bei der Beladung von hAgo2 mit einzel- oder doppelsträngiger siRNA ist eine dreiphasige Reaktion zu beobachten. Die Ratenkonstanten $k_{1/\text{-}1}$ – $k_{3/\text{-}3}$ sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Den größten Einfluss auf die Bindung von nichtphosphorylierter *guide* RNA oder doppelsträngiger siRNA besitzt $k_{\text{-}2}$.

Erkennung und Bindung von *target* RNA Dieser Prozess besitzt ebenfalls einen dreiphasigen Reaktionsverlauf. Er wird im Wesentlichen durch die Interaktion der *target* RNA mit der Nukleinsäure-Komponente des binären Ribonukleoprotein-Komplexes beeinflusst. Die zugehörigen ermittelten Raten $k_{4/\text{-}4}$ – $k_{6/\text{-}6}$ sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst. Dabei ist eine unterschiedliche Bezeichnung der Ratenkonstanten zu beachten.

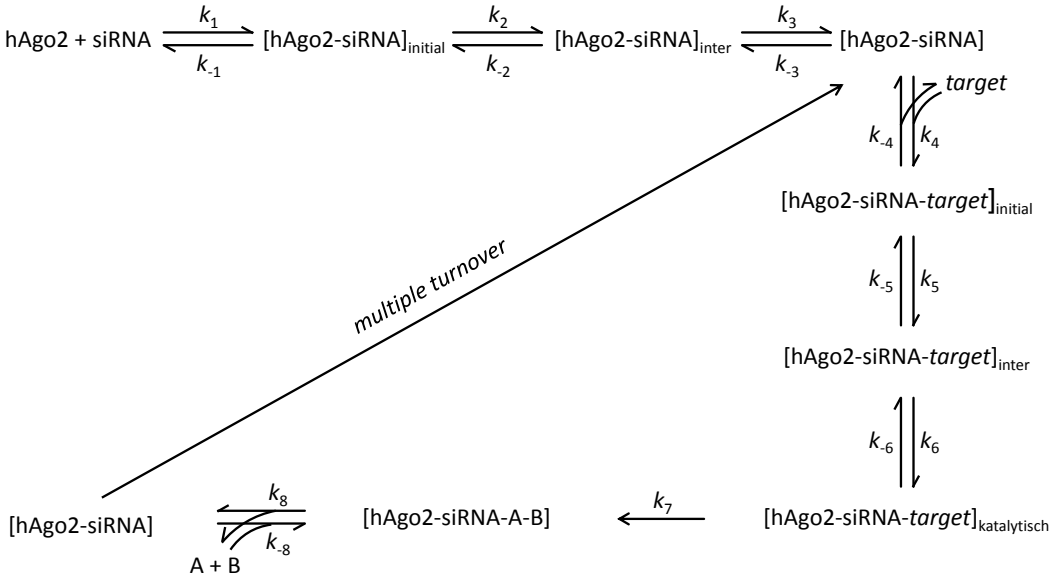


Abbildung 6.1: Kinetisches Modell der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2. Erläuterungen siehe Text.

Sequenzspezifische Spaltung von *target* RNA Der katalytische Schritt der Gesamtreaktion erinnert an denjenigen der hRNase H1. Eine entsprechende Ratenkonstante k_7 konnte nicht bestimmt werden (siehe Abschnitt 5.9.1 und 5.9.4).

Freisetzung von *target* RNA-Spaltprodukten Dies stellt nach derzeitiger Datenlage den limitierenden Faktor bei multiplem Umsatz dar. Die hierzu ermittelte Ratenkonstante k_8 ist unter Abschnitt 5.10 aufgeführt. Die Freisetzung resultiert in der Regeneration des binären hAgo2/*guide* RNA-Komplexes, sodass eine weitere *target* RNA gebunden und gespalten werden kann.

6.4 Charakterisierung der siRNA-Bindung durch hTRBP

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, Erkenntnisse über die Funktion von hTRBP zu gewinnen. Die Rolle dieses dsRNA-bindenden Proteins innerhalb der RNAi ist bislang nur im Ansatz verstanden. Die verminderte Genregulation in hTRBP-defizienten Zellen ist jedoch ein aussagekräftiger Hinweis, dass hTRBP eine wichtige Rolle innerhalb der RNAi spielt [79, 216, 234, 235]. Es wird vermutet, dass hTRBP als Mediator von Initiations- und Effektorschritten der RNAi dient.

Seine Affinität für dsRNA macht es wahrscheinlich, dass diese Eigenschaft die Funktion von hTRBP innerhalb der RNAi vermittelt, da diese sehr stark von doppelsträngigen RNA-Molekülen abhängig ist. Als Basis für funktionelle Untersuchungen wurde deshalb zunächst die siRNA-Bindung durch hTRBP-His charakterisiert. In Analogie zu den biochemischen und kinetischen Studien der RNA-Bindung durch hAgo2 wurden Substratbindungsparameter unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt und im Anschluss die Bindungsreaktion transientenkinetisch in Bezug auf die Anzahl der Phasen charakterisiert sowie die zugehörigen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt. Im Anschluss wurden erste Experimente zur Untersuchung des Einflusses von hTRBP-His auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 durchgeführt.

6.4.1 hTRBP bindet siRNA mit hoher Affinität

Für die siRNA-Bindungsstudien wurden zwei verschiedene Substrate verwendet, die deutlich unterschiedliche Affinitäten ergaben. Im Fall der intern markierten si2B-FAM betrug $K_\mathrm{d} = 126{,}8\,\mathrm{nM}$, für die endständig markierte FAM-siLam wurde $K_\mathrm{d} = 1{,}6\,\mathrm{nM}$ ermittelt. In folgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Fluorophor bei der falschen Positionierung vermutlich einen hemmenden Einfluss auf die Assoziation der siRNA mit hTRBP-His besitzt und deshalb zu einem etwa 100-fach höheren K_d führt. Jedoch konnte mit diesem Substrat in Gelverzögerungs-Analysen (siehe Abschnitt 5.6.2) und mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitration (siehe Abschnitt 5.11.1) gezeigt werden, dass hTRBP-His einzelsträngige

guide RNA mindestens 50-fach schwächer bindet als doppelsträngige siRNA. Mit der endständig markierten siRNA kam es nicht zu einer Hemmung der Substratbindung. Die ermittelte Affinität ist konsistent mit publizierten Daten, die K_ds im subnanomolaren Bereich beschreiben (siehe Tabelle 6.6). Allerdings konnten die beiden Bindungsmodi, die durch Yamashita *et al.* beobachtet wurden, mit den im *steady state* durchgeführten Analysen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Abweichungen sind – wie bereits in Abschnitt 6.3.1 ausführlich erläutert – auf Unterschiede in den Proteinpräparationen und Substraten sowie verschiedene experimentelle Systeme zurückzuführen.

K_d (nM)	experimentelles System		Referenz
	Protein	Substrat	
1,6	bakteriell exprimiertes rekombinantes hTRBP-His	FAM-siLam (21 nt)	Abschnitt 5.11.1
1,0	bakteriell exprimiertes rekombinantes hTRBP-His	siLam (21 nt)	Abschnitt 5.11.1
0,24/13,3 (Bindungsmodus 1/2)	bakteriell exprimiertes rekombinantes His-hTRBP	siRNA (19 nt)	[204]
0,29	in Sf9-Zellen exprimiertes rekombinantes hTRBP	19-Duplex (19 nt)	[258]

Tabelle 6.6: Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem (h) TRBP und siRNA.

Die Affinität von hTRBP-His zu doppelsträngiger siRNA ist 30-fach größer als diejenige von hAgo2 (siehe Abschnitt 5.7.2). Im zellulären Kontext würde dies implizieren, dass siRNAs mit höherer Wahrscheinlichkeit nicht direkt an hAgo2 binden, sondern zunächst mit hTRBP assoziieren. Diese Annahme bestätigt, dass es sich bei hTRBP um einen Faktor handeln könnte, der die Beladung von hAgo2 durch siRNA vereinfacht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass hTRBP in der Lage ist, hAgo2 zu einem Dicer/siRNA-Komplex zu rekrutieren und dadurch eine Plattform für die RISC-Assemblierung darstellt [79]. Weiterhin stabilisiert hTRBP die Assoziation von Dicer und hAgo2 [238]. Chakravarthy *et al.* konnten hTRBP eine Rolle bei der Prozessierung von siRNA- und miRNA-Vorläufermoleküle durch Dicer nachweisen. Dabei stabilisiert hTRBP den Komplex zwischen Dicer und seinem Substrat und führt zu 4- bis 5-fach größeren maximalen Umsatzgeschwindigkeiten und geringeren K_m-Werten [258]. hTRBP erhöht in einem TRBP/Dicer-Komplex die Substrataffinität im Vergleich zu Dicer allein, obwohl auch dieses Enzym ein dsRNA-Bindemotiv aufweist [207, 208, 258]. Diese Sachverhalte, also die Stabilisierung eines hAgo2/siRNA-Komplexes sowie die Erhöhung der Affinität zu doppelsträngiger siRNA, sind auch für einen Komplex aus hAgo2 und hTRBP denkbar.

6.4.2 Die Bindung von siRNA durch hTRBP beruht auf einer schnellen konformationellen Umlagerung

Bislang sind nach eigenem Kenntnisstand keine transientenkinetischen Studien der siRNA-Bindung durch hTRBP veröffentlicht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *pre-steady state* Analysen zeigen einen zweiphasigen Verlauf der Bindungsreaktion (siehe Abschnitt 5.11.2). Da die Geschwindigkeit der ersten Phase abhängig von der hTRBP-His-Konzentration ist, repräsentiert sie vermutlich die diffusionskontrollierte Bildung initialer Kollisionskomplexe. Obwohl hTRBP-His mit 40,4 kDa ein deutlich kleineres Protein darstellt als GST-hAgo2 mit 124,3 kDa, sind die entsprechenden Assoziationsratenkonstanten ähnlich ($k_{1,\,\text{GST-hAgo2/siRNA}} = 1{,}2 \times 10^8\,\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $k_{1,\,\text{hTRBP-His/siRNA}} = 1{,}9 \times 10^8\,\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dies könnte darauf hinweisen, dass hTRBP-His nicht in monomerer Form in Lösung vorliegt und ist konsistent mit den Erkenntnissen zur Bildung von Oligomeren (siehe Abschnitt 5.6.3). Außerdem ist nicht bekannt, ob die siRNA-Bindung mit einer 1:1 Stöchiometrie erfolgt oder ein siRNA-Molekül durch zwei oder mehr hTRBP-His-Moleküle gebunden wird. In den Studien von Yamashita *et al.* wurde beobachtet, dass Wildtyp-TRBP jeweils nur ein siRNA-Molekül bindet, wohingegen einzelne Domänen oder Mutanten, in denen nur eine Bindedomäne funktionsfähig war, jeweils mit zwei siRNAs assoziierten [204].

Die zweite beobachtbare Phase ist unabhängig von der Proteinkonzentration und repräsentiert aller Wahrscheinlichkeit nach eine konformationelle Umlagerung von hTRBP-His, die für die effektive siRNA-Bindung nötig ist. Die Assoziationsratenkonstante ist mit $2{,}6\,\text{s}^{-1}$ relativ schnell und deutlich höher als die Dissoziationsratenkonstante mit $0{,}15\,\text{s}^{-1}$, was die hohe Affinität unter Gleichgewichtsbedingungen erklärt. Da keine strukturellen Informationen des vollständigen hTRBP oder eines homologen Proteins existieren, lassen sich keine genauen Rückschlüsse darauf ziehen, in welchem Bereich des Proteins möglicherweise Umlagerungen stattfinden. Es existieren allerdings Röntgenkristall- und NMR-Strukturdaten der beiden dsRNA-Bindemotive 1 und 2 von humanem TRBP [204, 268] sowie der dsRBM des homologen Xlrbpa-2 aus *X. laevis* [210]. Die Überlagerung des hTRBP dsRBM 2 ohne Substrat und des Xlrbpa-2 dsRBM im Komplex mit einer dsRNA zeigte, dass die Substratbindung innerhalb der Bindedomäne nicht zu einer konformationellen Umlagerung führt [204]. Die geringe Flexibilität ist bereits für andere dsRBPs beschrieben [269, 270]. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Bewegung in den Proteinbereichen liegt, die die dsRBM miteinander verbinden. Sobald ein Motiv Kontakt mit der dsRNA eingeht, wäre eine scharnierartige Bewegung denkbar, so dass das zweite Motiv mit dem Substrat in Wechselwirkung treten kann. Dies könnte einen Komplex zur Folge haben, bei dem das Protein zangenartig sein dsRNA-Substrat umfasst.

6.4.3 Die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT besitzen vermutlich einen entgegengesetzten Einfluss auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung durch hAgo2

Da sich die RNA-Interferenz sowohl während der Initiation als auch bei ausführenden Schritten doppelsträngiger RNA-Moleküle bedient, kommen dsRNA-bindenden Proteinen innerhalb des Prozesses vermutlich eine wichtige Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, erste Einsichten in die Rolle von hTRBP-His auf die siRNA-vermittelte *target* RNA-Spaltung in einem *in vitro* System zu erhalten (siehe Abschnitt 5.12). Die derzeitige Datenlage weist darauf hin, dass hTRBP-His die *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 verstärkt. Da hTRBP-His und siRNA vor dem Kontakt mit GST-hAgo2 präinkubiert wurden, liegen diese vermutlich in einem Komplex vor, der danach mit der Schlüsselkomponente des RISC in Wechselwirkung tritt. Die Spaltungseffizienz von mit doppelsträngiger siRNA beladenem hAgo2 ist signifikant geringer als diejenige von mit einzelsträngiger *guide* RNA beladenem hAgo2 (siehe Abschnitt 5.9.2). Deshalb wird vermutet, dass die siRNA von hTRBP-His auf GST-hAgo2 übergeben wird, woraufhin es zu einer Strangtrennung und Freisetzung des *passenger* Stranges kommen muss, damit der binäre hAgo2/*guide* RNA-Komplex die *target* RNA erkennen und binden kann. Ob die Entwindung der komplementären Stränge durch hTRBP-His unterstützt wird, kann nicht beantwortet werden. Für das homologe Protein R2D2 in *D. melanogaster* wurde bereits im Jahr 2003 eine wichtige Rolle bei der Beladung von Ago2 entdeckt, die über die Fähigkeit, dsRNA zu binden, vermittelt wird [271]. R2D2 dient als Biosensor für die Thermostabilität der siRNA-Enden [236]. Es wird vermutet, dass TRBP und Dicer jeweils ein Ende doppelsträngiger siRNA binden und so zu dessen Entwindung beitragen [146].

Neben der Steigerung des maximalen *target* RNA-Umsatzes durch hAgo2 wurde bei Einsatz von hTRBP-His auch eine 6-fach gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet. Dies würde implizieren, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion durch hTRBP-His beschleunigt wird. Die in Abschnitt 5.10.2 beschriebenen Ergebnisse sowie die Literatur [22, 63] deuten darauf hin, dass es sich beim limitierenden Schritt um die Freisetzung der *target* RNA-Spaltprodukte aus dem ternären Komplex handelt. Also könnte hTRBP-His bei der Regeneration des binären Komplexes assistieren und dadurch den multiplen Umsatz beschleunigen. Da die beobachtete Ratensteigerung jedoch ohne Zugabe von ATP erfolgte, kann es sich hierbei nicht um den bereits von Haley und Zamore beschriebenen Prozess handeln, bei dem durch ATP der *target* RNA-Umsatz in Lysat aus *D. melanogaster* Embryonen um das 4-fache gesteigert wurde [63].

Neben dem Einfluss von hTRBP-His auf die *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 wurde auch der Einfluss von hPACT-His auf die gleiche Reaktion untersucht (siehe Abschnitt 5.12). Obwohl beide Proteine eine ähnliche Domänenstruktur sowie hohe Sequenzhomologie aufweisen (siehe Abschnitt 2.6.1), haben sie einen entgegengesetzten Effekt. Ihnen wird auch eine konträre Wirkweise bei der Modulation der PKR zugesprochen. TRBP inhibiert die Autophosphory-

lierung der Kinase [224] und bindet sie, wodurch ihre wachstumsregulierenden Eigenschaften beeinflusst werden [224–226]. TRBP stellt also einen negativen Regulator der PKR dar. Im Gegensatz dazu hat das zu 42 % sequenzidentische PACT aktivierenden Einfluss [232, 233]. Die Arbeitsgruppe um Lee zeigte, dass PACT ebenfalls eine Rolle bei der siRNA-vermittelten RNAi spielt und mit TRBP, hAgo2 und Dicer interagieren kann. Weiterhin gab diese Arbeit erste Hinweise darauf, dass sich PACT und TRBP nicht nur bei der Regulation der PKR, sondern auch bei der RNA-Interferenz eventuell unterschiedlich verhalten könnten [148]. Diese Annahme ist konsistent mit den präliminären Ergebnissen dieser Arbeit. hPACT-His ist in der Lage, während der Präinkubationsphase die doppelsträngige siRNA zu binden, übergibt sie jedoch scheinbar nicht an hAgo2, so dass es nicht effizient programmiert wird und deshalb ein verminderter *target* RNA-Umsatz beobachtet wird. Möglicherweise stellt hPACT also einen negativen Regulator von hAgo2 dar. Andererseits ist auch eine zelluläre Speicherfunktion denkbar, bei der hPACT mit siRNAs assoziiert und eventuell durch einen unbekannten Stimulus freisetzt, so dass sie in den RNAi Weg eingeschleust werden können.

6.5 Modell der minimalen rekombinanten RNA-Interferenz

Im Folgenden werden die in Kapitel 6 diskutierten Ergebnisse in einem schematischen Modell zusammengefasst, das die biologische Relevanz der gewonnenen Daten widerspiegeln soll (siehe Abbildung 6.2). Außerdem sind die wesentlichen Erkenntnisse der minimalen rekombinanten RNAi übersichtlich und in kurzer Form erläutert.

Beladung von hAgo2 Während des initialen Schrittes kollidiert das rekombinante hAgo2 mit einer *guide* RNA, woraufhin es zunächst zur Verankerung ihres 5'-Endes in einer Bindetasche der Mid Domäne kommt. Die 5'-terminale Phosphatgruppe ist für diesen Schritt von großer Bedeutung. Anschließend wird vermutlich das 3'-Ende der *guide* RNA in einer Bindetasche der PAZ Domäne gebunden. In einem alternativen Prozess kann an Stelle einer einzelsträngigen *guide* RNA auch eine doppelsträngige siRNA auf hAgo2 geladen werden, wie dies vermutlich innerhalb einer Zelle passiert. Die Bindungsreaktion verläuft analog zu derjenigen einer *guide* RNA. Jedoch muss im Unterschied der *passenger* Strang aus dem Komplex entlassen werden, um die Erkennung und Bindung einer *target* RNA zu ermöglichen. Wie dies vonstatten geht, ist bislang unbekannt. Die Beladung von hAgo2 mit doppelsträngiger siRNA kann wahrscheinlich durch eine Präinkubation der siRNA mit hTRBP assistiert werden, während hPACT inhibierend wirkt.

Erkennung und Bindung von *target* RNA Nach der Bildung eines binären hAgo2/*guide* RNA-Komplexes ist dieser bereit für die Erkennung einer *target* RNA. Zunächst kommt es zur Bildung eines Kollisionskomplexes und anschließend möglicherweise zu einer sequenzspezifischen Interaktion zwischen *guide* und *target* RNA im *seed* Bereich. Im Anschluss kommt es zu

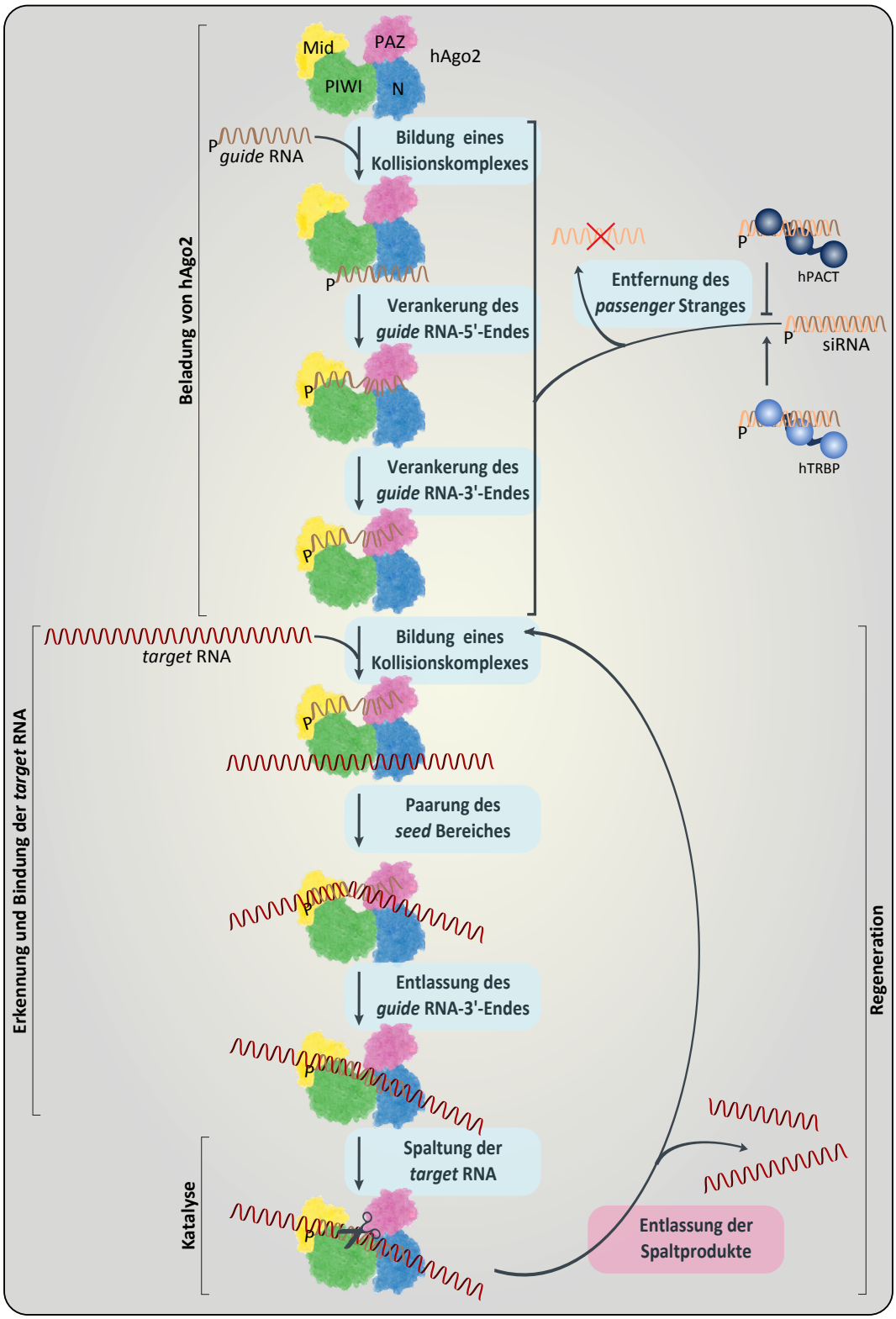


Abbildung 6.2: Modell der minimalen rekombinanten RNA-Interferenz. Erläuterungen siehe Text.

einer konformationellen Umlagerung des ternären Komplexes, der vermutlich die Freisetzung des 3'-Endes der *guide* RNA zur Folge hat. Daraufhin können sich über den *seed* Bereich hinaus weitere Basen zwischen *guide* und *target* RNA paaren und es wird ein katalytisch kompetenter Komplex generiert.

Katalyse Die endonukleolytische Spaltung erfolgt in Abhängigkeit der *guide* RNA-Sequenz am Phosphatrückgrat der *target* RNA gegenüber dem 10. und 11. Nukleotid des *guide* Stranges. Die Spaltung erfolgt nach Programmierung von hAgo2 mit einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen siRNA.

Regeneration Für einen multiplen Umsatz muss nach erfolgter Spaltung der *target* RNA der binäre Komplex regeneriert werden. Dies erfordert die Freisetzung der Spaltprodukte, was aller Wahrscheinlichkeit nach den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt.

6.6 Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen, ein kinetisches Modell der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung zu etablieren und die einzelnen beobachteten Schritte entsprechend zuzuordnen. Dennoch bleiben weiterhin viele Details dieses Prozesses ungenügend verstanden bzw. während der Arbeit an diesem Projekt sind weitere Fragen aufgetreten, die im Rahmen dieser Dissertation nicht beantwortet werden konnten. Im Folgenden werden einige davon aufgeführt.

Das etablierte Expressions- und Reinigungssystem für GST-hAgo2 liefert im Milligramm-Maßstab Protein mit sehr hoher Aktivität, was für *in vitro* Studien eine zwingende Voraussetzung darstellt. Der Reinheitsgrad konnte gegenüber dem zuvor verwendeten NHA-hAgo2 ebenfalls verbessert sowie die Stabilität erhöht werden. Allerdings stellen diese beiden Faktoren – Reinheit und Stabilität – nach wie vor die beiden größten Hürden für die Handhabung des Proteins und somit auch für zukünftige Studien dar. Für eine eindeutige Zuordnung kinetischer Parameter zu konformationellen Umlagerungen ist es nötig, die Röntgenkristallstruktur von humanem Ago2 im Komplex mit verschiedenen Substraten zu lösen. Dieses Ziel ist bislang nicht erreicht. Wenn dies gelingen soll, muss das vorhandene Reinigungssystem weiter optimiert werden.

Während der Arbeit zeigte sich, dass entgegen der bisher geltenden Meinung rekombinantes hAgo2 durch doppelsträngige siRNA programmierbar ist. Wie dieser Prozess genau vonstatten geht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Weitere Experimente werden nötig sein, um den Mechanismus genauer zu untersuchen und die siRNA-Strangtrennungseigenschaften von hAgo2 besser zu verstehen. Es konnten ebenfalls erste Hinweise darauf gewonnen werden, dass hTRBP möglicherweise die Beladung von hAgo2 Dicer-unabhängig erleichtert, wohingegen hPACT diese Eigenschaft nicht aufzuweisen scheint. Die

hier vorgestellten Ergebnisse stellen eine Basis dar, um diese Effekte genauer zu untersuchen.

Die Erkenntnisse zur Erkennung und Bindung der *target* RNA durch den binären hAgo2/*guide* RNA-Komplex können als Ausgangspunkt dienen, um die *target* RNA-Erkennung im Detail zu verstehen. Hierfür ist eine Kartierung der Interaktionsbereiche denkbar, indem Fehlpaarungen oder modifizierte Nukleotide an unterschiedlichen Positionen von *guide* oder *target* RNA eingeführt werden. Solche Experimente sollten über die Erkenntnisse dieser Arbeit hinaus wertvolle Einblicke in den Mechanismus liefern. Weiterhin bieten die etablierten experimentellen Systeme die Möglichkeit, Fragestellungen wie dem Einfluss der *target* RNA-Länge oder der Thermodynamik von *guide*/*target* RNA-Paaren auf die Bindungsreaktion auf den Grund zu gehen.

Die Geschwindigkeit des katalytischen Schrittes konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig bestimmt werden. Die Sensitivität des verwendeten Systems war nicht ausreichend hoch, um einen robusten Wert zu ermitteln. Dies erfordert in Zukunft entweder die Steigerung der Sensitivität des vorhandenen oder den Aufbau eines neuen experimentellen Systems, um dieses Ziel zu erreichen. Diese Ratenkonstante würde das kinetische Modell komplettieren und möglicherweise wertvolle Erkenntnisse über die PIWI Domäne von hAgo2 liefern, von der bislang keine Röntgenkristallstruktur gelöst werden konnte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die vorliegende Arbeit die Grundlage bildet, um in Zukunft rekombinantes hAgo2 sowie hTRBP weitergehend zu charakterisieren. Somit sollten auch weiterhin Erkenntnisse gewonnen werden können, die dabei helfen, dieses vielseitige und hoch spezifische Enzym *in vitro* und in seinem zellulären Kontext zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

[1] Paterson, B. M.; Roberts, B. E.; Kuff, E. L.: Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977), S. 4370–4374 6

[2] Cech, T. R.; Zaug, A. J.; Grabowski, P. J.: In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. In: *Cell* 27 (1981), S. 487–496 6

[3] Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S.: The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. In: *Cell* 35 (1983), S. 849–857 6

[4] Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R.: Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. In: *Plant Cell* 2 (1990), S. 279–289 6

[5] Romano, N.; Macino, G.: Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences. In: *Mol Microbiol* 6 (1992), S. 3343–3353 6

[6] Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V.: The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. In: *Cell* 75 (1993), S. 843–854 6

[7] Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. In: *Nature* 391 (1998), S. 806–811 7

[8] Reinhart, B. J.; Slack, F. J.; Basson, M.; Pasquinelli, A. E.; Bettinger, J. C.; Rougvie, A. E.; Horvitz, H. R.; Ruvkun, G.: The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. In: *Nature* 403 (2000), S. 901–906 7

[9] Lau, N. C.; Lim, L. P.; Weinstein, E. G.; Bartel, D. P.: An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. In: *Science* 294 (2001), S. 858–862

[10] Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T.: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. In: *Science* 294 (2001), S. 853–858

[11] Lee, R. C.; Ambros, V.: An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. In: *Science* 294 (2001), S. 862–864 7

[12] Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. In: *Nature* 411 (2001), S. 494–498 7, 21

[13] Caplen, N. J.; Parrish, S.; Imani, F.; Fire, A.; Morgan, R. A.: Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001), S. 9742–9747 7, 21

[14] Castanotto, D.; Rossi, J. J.: The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. In: *Nature* 457 (2009), S. 426–433 7

[15] Lewis, B. P.; Burge, C. B.; Bartel, D. P.: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In: *Cell* 120 (2005), S. 15–20 7

[16] Xie, X.; Lu, J.; Kulbokas, E. J.; Golub, T. R.; Mootha, V.; Lindblad-Toh, K.; Lander, E. S.; Kellis, M.: Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. In: *Nature* 434 (2005), S. 338–345 7, 10, 21, 179

[17] Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J.: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. In: *Nat Rev Cancer* 6 (2006), S. 259–269 7

[18] Martinez, J.; Busslinger, M.: Life beyond cleavage: the case of Ago2 and hematopoiesis. In: *Genes Dev* 21 (2007), S. 1983–1988 7, 10

[19] O'Carroll, D.; Mecklenbrauker, I.; Das, P. P.; Santana, A.; Koenig, U.; Enright, A. J.; Miska, E. A.; Tarakhovsky, A.: A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. In: *Genes Dev* 21 (2007), S. 1999–2004

[20] Ambros, V.: microRNAs: tiny regulators with great potential. In: *Cell* 107 (2001), S. 823–826

[21] Moss, E. G.: MicroRNAs: hidden in the genome. In: *Curr Biol* 12 (2002), S. R138–R140

[22] Rana, T. M.: Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), S. 23–36 21, 22, 25, 26, 27, 28, 149, 192

[23] Stefani, G.; Slack, F. J.: Small non-coding RNAs in animal development. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008), S. 219–230 7, 10

[24] Spizzo, R.; Nicoloso, M. S.; Croce, C. M.; Calin, G. A.: SnapShot: MicroRNAs in Cancer. In: *Cell* 137 (2009), S. 586 7

[25] Hutvágner, G.; Simard, M. J.: Argonaute proteins: key players in RNA silencing. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008), S. 22–32 7, 8, 10, 11, 12, 18, 21, 178

[26] Song, J.-J.; Smith, S. K.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L.: Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. In: *Science* 305 (2004), S. 1434–1437 8, 13, 18, 19, 106, 108, 186

[27] Yuan, Y.-R.; Pei, Y.; Ma, J.-B.; Kuryavyi, V.; Zhadina, M.; Meister, G.; Chen, H.-Y.; Dauter, Z.; Tuschl, T.; Patel, D. J.: Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. In: *Mol Cell* 19 (2005), S. 405–419 15, 17, 19, 186

[28] Wang, Y.; Sheng, G.; Juranek, S.; Tuschl, T.; Patel, D. J.: Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. In: *Nature* 456 (2008), S. 209–213 8, 13, 15, 16, 18, 23, 122, 143, 176, 177

[29] Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M.; Hannon, G. J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In: *Nature* 409 (2001), S. 363–366 8, 10, 31, 122

[30] Nykänen, A.; Haley, B.; Zamore, P. D.: ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. In: *Cell* 107 (2001), S. 309–321 8, 21, 172

[31] Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T.: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. In: *Genes Dev* 15 (2001), S. 188–200 10, 166, 174, 183

[32] Elbashir, S. M.; Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W.; Tuschl, T.: Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. In: *EMBO J* 20 (2001), S. 6877–6888 21

[33] MacRae, I. J.; Zhou, K.; Li, F.; Repic, A.; Brooks, A. N.; Cande, W. Z.; Adams, P. D.; Doudna, J. A.: Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. In: *Science* 311 (2006), S. 195–198 8, 10, 31, 172, 174

[34] Maniataki, E.; Mourelatos, Z.: A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. In: *Genes Dev* 19 (2005), S. 2979–2990 8, 32, 175

[35] Liu, J.; Carmell, M. A.; Rivas, F. V.; Marsden, C. G.; Thomson, J. M.; Song, J.-J.; Hammond, S. M.; Joshua-Tor, L.; Hannon, G. J.: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. In: *Science* 305 (2004), S. 1437–1441 8, 12, 14, 21, 122, 134, 146, 167, 168, 172, 173, 174, 175, 183, 184

[36] Siomi, H.; Siomi, M. C.: On the road to reading the RNA-interference code. In: *Nature* 457 (2009), S. 396–404 8, 10, 122, 184

[37] Filipowicz, W.; Bhattacharyya, S. N. ; Sonenberg, N.: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? In: *Nat Rev Genet* 9 (2008), S. 102–114 8, 11

[38] Hamilton, A. J.; Baulcombe, D. C.: A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. In: *Science* 286 (1999), S. 950–952 8

[39] Parrish, S.; Fleenor, J.; Xu, S.; Mello, C.; Fire, A.: Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. In: *Mol Cell* 6 (2000), S. 1077–1087 8

[40] Hammond, S. M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G. J.: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. In: *Nature* 404 (2000), S. 293–296 8

[41] Ghildiyal, M.; Zamore, P. D.: Small silencing RNAs: an expanding universe. In: *Nat Rev Genet* 10 (2009), S. 94–108 8, 10

[42] Hamilton, A.; Voinnet, O.; Chappell, L.; Baulcombe, D.: Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. In: *EMBO J* 21 (2002), S. 4671–4679 8

[43] Ambros, V.; Lee, R. C.; Lavanway, A.; Williams, P. T.; Jewell, D.: MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans. In: *Curr Biol* 13 (2003), S. 807–818

[44] Zilberman, D.; Cao, X.; Jacobsen, S. E.: ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. In: *Science* 299 (2003), S. 716–719 8, 12

[45] Xie, Z.; Johansen, L. K.; Gustafson, A. M.; Kasschau, K. D.; Lellis, A. D.; Zilberman, D.; Jacobsen, S. E.; Carrington, J. C.: Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. In: *PLoS Biol* 2 (2004), S. 642–652 8

[46] Ghildiyal, M.; Seitz, H.; Horwich, M. D.; Li, C.; Du, T.; Lee, S.; Xu, J.; Kittler, E. L. W.; Zapp, M. L.; Weng, Z.; Zamore, P. D.: Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in Drosophila somatic cells. In: *Science* 320 (2008), S. 1077–1081 9

[47] Czech, B.; Malone, C. D.; Zhou, R.; Stark, A.; Schlingeheyde, C.; Dus, M.; Perrimon, N.; Kellis, M.; Wohlschlegel, J. A.; Sachidanandam, R.; Hannon, G. J.; Brennecke, J.: An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. In: *Nature* 453 (2008), S. 798–802

[48] Okamura, K.; Balla, S.; Martin, R.; Liu, N.; Lai, E. C.: Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in Drosophila melanogaster. In: *Nat Struct Mol Biol* 15 (2008), S. 581–590

[49] Kawamura, Y.; Saito, K.; Kin, T.; Ono, Y.; Asai, K.; Sunohara, T.; Okada, T. N.; Siomi, M. C.; Siomi, H.: Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. In: *Nature* 453 (2008), S. 793–797

[50] Okamura, K.; Chung, W.-J.; Ruby, J. G.; Guo, H.; Bartel, D. P.; Lai, E. C.: The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. In: *Nature* 453 (2008), S. 803–806

[51] Chung, W.-J.; Okamura, K.; Martin, R.; Lai, E. C.: Endogenous RNA interference provides a somatic defense against Drosophila transposons. In: *Curr Biol* 18 (2008), S. 795–802 9

[52] Tam, O. H.; Aravin, A. A.; Stein, P.; Girard, A.; Murchison, E. P.; Cheloufi, S.; Hodges, E.; Anger, M.; Sachidanandam, R.; Schultz, R. M.; Hannon, G. J.: Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. In: *Nature* 453 (2008), S. 534–538 9

[53] Watanabe, T.; Totoki, Y.; Toyoda, A.; Kaneda, M.; Kuramochi-Miyagawa, S.; Obata, Y.; Chiba, H.; Kohara, Y.; Kono, T.; Nakano, T.; Surani, M. A.; Sakaki, Y.; Sasaki, H.: Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. In: *Nature* 453 (2008), S. 539–543 9

[54] Yang, N.; Kazazian, H. H.: L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. In: *Nat Struct Mol Biol* 13 (2006), S. 763–771 9

[55] Jinek, M.; Doudna, J. A.: A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. In: *Nature* 457 (2009), S. 405–412 9, 19

[56] Matranga, C.; Tomari, Y.; Shin, C.; Bartel, D. P.; Zamore, P. D.: Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. In: *Cell* 123 (2005), S. 607–620 10

[57] Rand, T. A.; Petersen, S.; Du, F.; Wang, X.: Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. In: *Cell* 123 (2005), S. 621–629

[58] Kim, K.; Lee, Y. S.; Carthew, R. W.: Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. In: *RNA* 13 (2007), S. 22–29

[59] Leuschner, P. J. F.; Ameres, S. L.; Kueng, S.; Martinez, J.: Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. In: *EMBO Rep* 7 (2006), S. 314–320

[60] Miyoshi, K.; Tsukumo, H.; Nagami, T.; Siomi, H.; Siomi, M. C.: Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. In: *Genes Dev* 19 (2005), S. 2837–2848 10

[61] Hutvágner, G.; Zamore, P. D.: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science* 297 (2002), S. 2056–2060 10, 22, 145, 166, 173, 186, 187

[62] Rivas, F. V.; Tolia, N. H.; Song, J.-J.; Aragon, J. P.; Liu, J.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L.: Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. In: *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005), S. 340–349 14, 15, 19, 20, 21, 27, 28, 93, 109, 145, 151, 166, 167, 168, 184, 185, 186, 187

[63] Haley, B.; Zamore, P. D.: Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. In: *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004), S. 599–606 10, 19, 22, 27, 28, 145, 149, 151, 173, 186, 187, 192

[64] Neilson, J. R.; Sharp, P. A.: Small RNA regulators of gene expression. In: *Cell* 134 (2008), S. 899–902 10

[65] Lee, Y.; Jeon, K.; Lee, J.-T.; Kim, S.; Kim, V. N.: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. In: *EMBO J* 21 (2002), S. 4663–4670 10, 31

[66] Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K.-H.; Lee, S.; Baek, S. H.; Kim, V. N.: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *EMBO J* 23 (2004), S. 4051–4060

[67] Cai, X.; Hagedorn, C. H.; Cullen, B. R.: Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. In: *RNA* 10 (2004), S. 1957–1966

[68] Birney, E. *et al.*: Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. In: *Nature* 447 (2007), S. 799–816 10

[69] Denli, A. M.; Tops, B. B. J.; Plasterk, R. H. A.; Ketting, R. F.; Hannon, G. J.: Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. In: *Nature* 432 (2004), S. 231–235 10, 31

[70] Gregory, R. I.; Yan, K.-P.; Amuthan, G.; Chendrimada, T.; Doratotaj, B.; Cooch, N.; Shiekhattar, R.: The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. In: *Nature* 432 (2004), S. 235–240

[71] Han, J.; Lee, Y.; Yeom, K.-H.; Kim, Y.-K.; Jin, H.; Kim, V. N.: The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. In: *Genes Dev* 18 (2004), S. 3016–3027

[72] Landthaler, M.; Yalcin, A.; Tuschl, T.: The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. In: *Curr Biol* 14 (2004), S. 2162–2167 10, 31

[73] Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Rådmark, O.; Kim, S.; Kim, V. N.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. In: *Nature* 425 (2003), S. 415–419 10

[74] Yi, R.; Qin, Y.; Macara, I. G.; Cullen, B. R.: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. In: *Genes Dev* 17 (2003), S. 3011–3016 10, 31

[75] Bohnsack, M. T.; Czaplinski, K.; Gorlich, D.: Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. In: *RNA* 10 (2004), S. 185–191

[76] Lund, E.; Güttinger, S.; Calado, A.; Dahlberg, J. E.; Kutay, U.: Nuclear export of microRNA precursors. In: *Science* 303 (2004), S. 95–98

[77] Zeng, Y.; Cullen, B. R.: Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. In: *Nucleic Acids Res* 32 (2004), S. 4776–4785 10, 31

[78] Hutvágner, G.; McLachlan, J.; Pasquinelli, A. E.; Bálint, E.; Tuschl, T.; Zamore, P. D.: A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. In: *Science* 293 (2001), S. 834–838 10

[79] Chendrimada, T. P.; Gregory, R. I.; Kumaraswamy, E.; Norman, J.; Cooch, N.; Nishikura, K.; Shiekhattar, R.: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. In: *Nature* 436 (2005), S. 740–744 10, 15, 31, 32, 33, 93, 155, 168, 169, 189, 190

[80] Brennecke, J.; Stark, A.; Russell, R. B.; Cohen, S. M.: Principles of microRNA-target recognition. In: *PLoS Biol* 3 (2005), S. 404–418 11

[81] Rajewsky, N.: microRNA target predictions in animals. In: *Nat Genet* 38 Suppl (2006), S. S8–13

[82] Lewis, B. P.; Shih, I.; Jones-Rhoades, M. W.; Bartel, D. P.; Burge, C. B.: Prediction of mammalian microRNA targets. In: *Cell* 115 (2003), S. 787–798 11, 19

[83] Mansfield, J. H.; Harfe, B. D.; Nissen, R.; Obenauer, J.; Srineel, J.; Chaudhuri, A.; Farzan-Kashani, R.; Zuker, M.; Pasquinelli, A. E.; Ruvkun, G.; Sharp, P. A.; Tabin, C. J.; McManus, M. T.: MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. In: *Nat Genet* 36 (2004), S. 1079–1083 11

[84] Yekta, S.; Shih, I.; Bartel, D. P.: MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. In: *Science* 304 (2004), S. 594–596 11, 22

[85] Liu, J.; Valencia-Sanchez, M. A.; Hannon, G. J.; Parker, R.: MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. In: *Nat Cell Biol* 7 (2005), S. 719–723 11, 15, 27, 169

[86] Pillai, R. S.; Bhattacharyya, S. N.; Artus, C. G.; Zoller, T.; Cougot, N.; Basyuk, E.; Bertrand, E.; Filipowicz, W.: Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. In: *Science* 309 (2005), S. 1573–1576 11

[87] Bohmert, K.; Camus, I.; Bellini, C.; Bouchez, D.; Caboche, M.; Benning, C.: AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. In: *EMBO J* 17 (1998), S. 170–180 11

[88] Cerutti, H.; Casas-Mollano, J. A.: On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. In: *Curr Genet* 50 (2006), S. 81–99 11

[89] Sasaki, T.; Shiohama, A.; Minoshima, S.; Shimizu, N.: Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. In: *Genomics* 82 (2003), S. 323–330 11, 14

[90] Yigit, E.; Batista, P. J.; Bei, Y.; Pang, K. M.; Chen, C.-C. G.; Tolia, N. H.; Joshua-Tor, L.; Mitani, S.; Simard, M. J.; Mello, C. C.: Analysis of the C. elegans Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. In: *Cell* 127 (2006), S. 747–757 11, 12

[91] Cogoni, C.; Macino, G.: Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in Neurospora crassa. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997), S. 10233–10238 12

[92] Catalanotto, C.; Azzalin, G.; Macino, G.; Cogoni, C.: Gene silencing in worms and fungi. In: *Nature* 404 (2000), S. 245 12

[93] Lee, D. W.; Pratt, R. J.; McLaughlin, M.; Aramayo, R.: An argonaute-like protein is required for meiotic silencing. In: *Genetics* 164 (2003), S. 821–828 12

[94] Vazquez, F.; Vaucheret, H.; Rajagopalan, R.; Lepers, C.; Gasciolli, V.; Mallory, A. C.; Hilbert, J.-L.; Bartel, D. P.; Crété, P.: Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. In: *Mol Cell* 16 (2004), S. 69–79 12

[95] Vaucheret, H.; Vazquez, F.; Crété, P.; Bartel, D. P.: The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. In: *Genes Dev* 18 (2004), S. 1187–1197 12

[96] Zheng, X.; Zhu, J.; Kapoor, A.; Zhu, J.-K.: Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. In: *EMBO J* 26 (2007), S. 1691–1701 12

[97] Tabara, H.; Sarkissian, M.; Kelly, W. G.; Fleenor, J.; Grishok, A.; Timmons, L.; Fire, A.; Mello, C. C.: The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans. In: *Cell* 99 (1999), S. 123–132 12

[98] Grishok, A.; Pasquinelli, A. E.; Conte, D.; Li, N.; Parrish, S.; Ha, I.; Baillie, D. L.; Fire, A.; Ruvkun, G.; Mello, C. C.: Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing. In: *Cell* 106 (2001), S. 23–34 12

[99] Grishok, A.; Sinskey, J. L.; Sharp, P. A.: Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of C. elegans. In: *Genes Dev* 19 (2005), S. 683–696 12

[100] Tijsterman, M.; Okihara, K. L.; Thijssen, K.; Plasterk, R. H. A.: PPW-1, a PAZ/PIWI protein required for efficient germline RNAi, is defective in a natural isolate of C. elegans. In: *Curr Biol* 12 (2002), S. 1535–1540 12

[101] Cox, D. N.; Chao, A.; Baker, J.; Chang, L.; Qiao, D.; Lin, H.: A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. In: *Genes Dev* 12 (1998), S. 3715–3727 12

[102] Okamura, K.; Ishizuka, A.; Siomi, H.; Siomi, M. C.: Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. In: *Genes Dev* 18 (2004), S. 1655–1666 12

[103] Hammond, S. M.; Boettcher, S.; Caudy, A. A.; Kobayashi, R.; Hannon, G. J.: Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. In: *Science* 293 (2001), S. 1146–1150 12

[104] Gunawardane, L. S.; Saito, K.; Nishida, K. M.; Miyoshi, K.; Kawamura, Y.; Nagami, T.; Siomi, H.; Siomi, M. C.: A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in Drosophila. In: *Science* 315 (2007), S. 1587–1590 12

[105] Brennecke, J.; Aravin, A. A.; Stark, A.; Dus, M.; Kellis, M.; Sachidanandam, R.; Hannon, G. J.: Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. In: *Cell* 128 (2007), S. 1089–1103 12, 13

[106] Saito, K.; Nishida, K. M.; Mori, T.; Kawamura, Y.; Miyoshi, K.; Nagami, T.; Siomi, H.; Siomi, M. C.: Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome. In: *Genes Dev* 20 (2006), S. 2214–2222 12

[107] Vagin, V. V.; Sigova, A.; Li, C.; Seitz, H.; Gvozdev, V.; Zamore, P. D.: A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. In: *Science* 313 (2006), S. 320–324 12, 13

[108] Janowski, B. A.; Huffman, K. E.; Schwartz, J. C.; Ram, R.; Nordsell, R.; Shames, D. S.; Minna, J. D.; Corey, D. R.: Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. In: *Nat Struct Mol Biol* 13 (2006), S. 787–792 12

[109] Kim, D. H.; Villeneuve, L. M.; Morris, K. V.; Rossi, J. J.: Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. In: *Nat Struct Mol Biol* 13 (2006), S. 793–797 12

[110] Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T.: Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. In: *Mol Cell* 15 (2004), S. 185–197 12, 14

[111] Peters, L.; Meister, G.: Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. In: *Mol Cell* 26 (2007), S. 611–623 12

[112] Lippman, Z.; Martienssen, R.: The role of RNA interference in heterochromatic silencing. In: *Nature* 431 (2004), S. 364–370 13

[113] Pal-Bhadra, M.; Leibovitch, B. A.; Gandhi, S. G.; Rao, M.; Bhadra, U.; Birchler, J. A.; Elgin, S. C. R.: Heterochromatic silencing and HP1 localization in Drosophila are dependent on the RNAi machinery. In: *Science* 303 (2004), S. 669–672 13

[114] Brower-Toland, B.; Findley, S. D.; Jiang, L.; Liu, L.; Yin, H.; Dus, M.; Zhou, P.; Elgin, S. C. R.; Lin, H.: Drosophila PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. In: *Genes Dev* 21 (2007), S. 2300–2311 13

[115] Aravin, A. A.; Klenov, M. S.; Vagin, V. V.; Bantignies, F.; Cavalli, G.; Gvozdev, V. A.: Dissection of a natural RNA silencing process in the Drosophila melanogaster germ line. In: *Mol Cell Biol* 24 (2004), S. 6742–6750 13

[116] Kalmykova, A. I.; Klenov, M. S.; Gvozdev, V. A.: Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the Drosophila male germline. In: *Nucleic Acids Res* 33 (2005), S. 2052–2059 13

[117] Cifuentes, D.; Xue, H.; Taylor, D. W.; Patnode, H.; Mishima, Y.; Cheloufi, S.; Ma, E.; Mane, S.; Hannon, G. J.; Lawson, N. D.; Wolfe, S. A.; Giraldez, A. J.: A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. In: *Science* 328 (2010), S. 1694–1698 13

[118] Cheloufi, S.; Santos, C. O. D.; Chong, M. M. W.; Hannon, G. J.: A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. In: *Nature* 465 (2010), S. 584–589 13

[119] Wang, Y.; Juranek, S.; Li, H.; Sheng, G.; Tuschl, T.; Patel, D. J.: Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. In: *Nature* 456 (2008), S. 921–926 13, 18, 20, 25, 122, 135, 138, 174, 176, 177, 181, 182, 183

[120] Wang, Y.; Juranek, S.; Li, H.; Sheng, G.; Wardle, G. S.; Tuschl, T.; Patel, D. J.: Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. In: *Nature* 461 (2009), S. 754–761 13, 16, 23, 143, 177, 182

[121] Lingel, A.; Simon, B.; Izaurralde, E.; Sattler, M.: Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. In: *Nature* 426 (2003), S. 465–469 13, 17, 133, 175, 177

[122] Lingel, A.; Simon, B.; Izaurralde, E.; M.Sattler: Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. In: *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004), S. 576–577

[123] Song, J.-J.; Liu, J.; Tolia, N. H.; Schneiderman, J.; Smith, S. K.; Martienssen, R. A.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L.: The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. In: *Nat Struct Biol* 10 (2003), S. 1026–1032 17, 133, 175, 177

[124] Yan, K. S.; Yan, S.; Farooq, A.; Han, A.; Zeng, L.; Zhou, M.-M.: Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. In: *Nature* 426 (2003), S. 468–474 17

[125] Ma, J.-B.; Ye, K.; Patel, D. J.: Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. In: *Nature* 429 (2004), S. 318–322 17, 133, 175, 177

[126] Tian, Y.; Simanshu, D. K.; Ma, J.-B.; Patel, D. J.: Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (2011), S. 903–910

[127] Simon, B.; Kirkpatrick, J. P.; Eckhardt, S.; Reuter, M.; Rocha, E. A.; Andrade-Navarro, M. A.; Sehr, P.; Pillai, R. S.; Carlomagno, T.: Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. In: *Structure* 19 (2011), S. 172–180 13

[128] Frank, F.; Sonenberg, N.; Nagar, B.: Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. In: *Nature* 465 (2010), S. 818–822 13, 15, 18, 19, 168, 173

[129] Boland, A.; Tritschler, F.; Heimstädt, S.; Izaurralde, E.; Weichenrieder, O.: Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. In: *EMBO Rep* 11 (2010), S. 522–527 13, 18, 19

[130] Boland, A.; Huntzinger, E.; Schmidt, S.; Izaurralde, E.; Weichenrieder, O.: Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (2011), S. 10466–10471 13, 15, 20, 183

[131] Koesters, R.; Adams, V.; Betts, D.; Moos, R.; Schmid, M.; Siermann, A.; Hassam, S.; Weitz, S.; Lichter, P.; Heitz, P. U.; Knebel Doeberitz, M. von; Briner, J.: Human eukaryotic initiation factor EIF2C1 gene: cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal bands 1p34-p35, and expression. In: *Genomics* 61 (1999), S. 210–218 14

[132] Höck, J.; Meister, G.: The Argonaute protein family. In: *Genome Biol* 9 (2008), S. 210–218 14

[133] Ma, J.-B.; Yuan, Y.-R.; Meister, G.; Pei, Y.; Tuschl, T.; Patel, D. J.: Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. In: *Nature* 434 (2005), S. 666–670 15, 18

[134] Zeng, Y.; Sankala, H.; Zhang, X.; Graves, P. R.: Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. In: *Biochem J* 413 (2008), S. 429–436 15

[135] Qi, H. H.; Ongusaha, P. P.; Myllyharju, J.; Cheng, D.; Pakkanen, O.; Shi, Y.; Lee, S. W.; Peng, J.; Shi, Y.: Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. In: *Nature* 455 (2008), S. 421–424 15, 20

[136] Ohrt, T.; Mütze, J.; Staroske, W.; Weinmann, L.; Höck, J.; Crell, K.; Meister, G.; Schwille, P.: Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. In: *Nucleic Acids Res* 36 (2008), S. 6439–6449 14

[137] Robb, G. B.; Brown, K. M.; Khurana, J.; Rana, T. M.: Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. In: *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005), S. 133–137 14

[138] Pham, J. W.; Pellino, J. L.; Lee, Y. S.; Carthew, R. W.; Sontheimer, E. J.: A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila. In: *Cell* 117 (2004), S. 83–94 14

[139] Sen, G. L.; Blau, H. M.: Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. In: *Nat Cell Biol* 7 (2005), S. 633–636 14

[140] Eulalio, A.; Behm-Ansmant, I.; Izaurralde, E.: P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), S. 9–22 14

[141] Anderson, P.; Kedersha, N.: RNA granules. In: *J Cell Biol* 172 (2006), S. 803–808 14

[142] Kedersha, N.; Anderson, P.: Mammalian stress granules and processing bodies. In: *Methods Enzymol* 431 (2007), S. 61–81 14

[143] Leung, A. K. L.; Calabrese, J. M.; Sharp, P. A.: Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), S. 18125–18130 14

[144] Pare, J. M.; Tahbaz, N.; López-Orozco, J.; LaPointe, P.; Lasko, P.; Hobman, T. C.: Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. In: *Mol Biol Cell* 20 (2009), S. 3273–3284

[145] Gallois-Montbrun, S.; Kramer, B.; Swanson, C. M.; Byers, H.; Lynham, S.; Ward, M.; Malim, M. H.: Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. In: *J Virol* 81 (2007), S. 2165–2178 14

[146] Gregory, R. I.; Chendrimada, T. P.; Cooch, N.; Shiekhattar, R.: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. In: *Cell* 123 (2005), S. 631–640 15, 27, 169, 192

[147] Meister, G.; Landthaler, M.; Peters, L.; Chen, P. Y.; Urlaub, H.; Lührmann, R.; Tuschl, T.: Identification of novel argonaute-associated proteins. In: *Curr Biol* 15 (2005), S. 2149–2155 15, 169

[148] Lee, Y.; Hur, I.; Park, S.-Y.; Kim, Y.-K.; Suh, M. R.; Kim, V. N.: The role of PACT in the RNA silencing pathway. In: *EMBO J* 25 (2006), S. 522–532 15, 31, 169, 193

[149] Jakymiw, A.; Lian, S.; Eystathioy, T.; Li, S.; Satoh, M.; Hamel, J. C.; Fritzler, M. J.; Chan, E. K. L.: Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. In: *Nat Cell Biol* 7 (2005), S. 1267–1274 15, 169

[150] Liu, J.; Rivas, F. V.; Wohlschlegel, J.; Yates, J. R.; Parker, R.; Hannon, G. J.: A role for the P-body component GW182 in microRNA function. In: *Nat Cell Biol* 7 (2005), S. 1261–1266 15, 169

[151] Jing, Q.; Huang, S.; Guth, S.; Zarubin, T.; Motoyama, A.; Chen, J.; Di Padova, F.; Lin, S.-C.; Gram, H.; Han, J.: Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. In: *Cell* 120 (2005), S. 623–634 15, 169

[152] Chu, C.; Rana, T. M.: Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. In: *PLoS Biol* 4 (2006), S. 1122–1136 15, 27, 169

[153] Parker, J. S.: How to slice: snapshots of Argonaute in action. In: *Silence* 1 (2010), S. 3–12 16, 23, 24, 25, 176, 182

[154] Cerutti, L.; Mian, N.; Bateman, A.: Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. In: *Trends Biochem Sci* 25 (2000), S. 481–482 17, 18

[155] Parker, J. S.; Roe, S. M.; Barford, D.: Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. In: *Nature* 434 (2005), S. 663–666 18

[156] Doench, J. G.; Sharp, P. A.: Specificity of microRNA target selection in translational repression. In: *Genes Dev* 18 (2004), S. 504–511 19

[157] Djuranovic, S.; Zinchenko, M. K.; Hur, J. K.; Nahvi, A.; Brunelle, J. L.; Rogers, E. J.; Green, R.: Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. In: *Nat Struct Mol Biol* 17 (2010), S. 144–150 19, 168

[158] Faehnle, C. R.; Joshua-Tor, L.: Argonaute MID domain takes centre stage. In: *EMBO Rep* 11 (2010), S. 564–565 19, 168

[159] Mi, S.; Cai, T.; Hu, Y.; Chen, Y.; Hodges, E.; Ni, F.; Wu, L.; Li, S.; Zhou, H.; Long, C.; Chen, S.; Hannon, G. J.; Qi, Y.: Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. In: *Cell* 133 (2008), S. 116–127 19

[160] Montgomery, T. A.; Howell, M. D.; Cuperus, J. T.; Li, D.; Hansen, J. E.; Alexander, A. L.; Chapman, E. J.; Fahlgren, N.; Allen, E.; Carrington, J. C.: Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. In: *Cell* 133 (2008), S. 128–141 19

[161] Till, S.; Lejeune, E.; Thermann, R.; Bortfeld, M.; Hothorn, M.; Enderle, D.; Heinrich, C.; Hentze, M. W.; Ladurner, A. G.: A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. In: *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007), S. 897–903 19

[162] Kiriakidou, M.; Tan, G. S.; Lamprinaki, S.; De Planell-Saguer, M.; Nelson, P. T.; Mourelatos, Z.: An mRNA m^7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. In: *Cell* 129 (2007), S. 1141–1151 19, 168

[163] Schwarz, D. S.; Tomari, Y.; Zamore, P. D.: The RNA-induced silencing complex is a Mg^{2+}-dependent endonuclease. In: *Curr Biol* 14 (2004), S. 787–791 19, 20, 108, 136, 186

[164] Parker, J. S.; Roe, S. M.; Barford, D.: Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. In: *EMBO J* 23 (2004), S. 4727–4737 19, 186

[165] Stein, H.; Hausen, P.: Enzyme from calf thymus degrading the RNA moiety of DNA-RNA Hybrids: effect on DNA-dependent RNA polymerase. In: *Science* 166 (1969), S. 393–395 19

[166] Crouch, R. J.; Dirksen, M.: *Ribonuclease H.* Cold Spring Harbor Monograph Archive, 1982 19, 186

[167] Tolia, N. H.; Joshua-Tor, L.: Slicer and the argonautes. In: *Nat Chem Biol* 3 (2007), S. 36–43

[168] Martinez, J.; Tuschl, T.: RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. In: *Genes Dev* 18 (2004), S. 975–980 19, 27, 28, 166, 168, 173, 185, 186

[169] Lambert, N. J.; Gu, S. G.; Zahler, A. M.: The conformation of microRNA seed regions in native microRNPs is prearranged for presentation to mRNA targets. In: *Nucleic Acids Res* 39 (2011), S. 4827–4835 20, 181

[170] Chiu, Y.-L.; Rana, T. M.: RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. In: *Mol Cell* 10 (2002), S. 549–561 21, 22, 177

[171] Czauderna, F.; Fechtner, M.; Dames, S.; Aygün, H.; Klippel, A.; Pronk, G. J.; Giese, K.; Kaufmann, J.: Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), S. 2705–2716

[172] Schwarz, D. S.; Hutvágner, G.; Haley, B.; Zamore, P. D.: Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. In: *Mol Cell* 10 (2002), S. 537–548 177

[173] Holen, T.; Amarzguioui, M.; Wiiger, M. T.; Babaie, E.; Prydz, H.: Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. In: *Nucleic Acids Res* 30 (2002), S. 1757–1766 21

[174] Kirino, Y.; Mourelatos, Z.: Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. In: *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007), S. 347–348 21

[175] Ohara, T.; Sakaguchi, Y.; Suzuki, T.; Ueda, H.; Miyauchi, K.; Suzuki, T.: The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated. In: *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007), S. 349–350

[176] Horwich, M. D.; Li, C.; Matranga, C.; Vagin, V.; Farley, G.; Wang, P.; Zamore, P. D.: The Drosophila RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. In: *Curr Biol* 17 (2007), S. 1265–1272 21

[177] Chiu, Y.-L.; Rana, T. M.: siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. In: *RNA* 9 (2003), S. 1034–1048 21

[178] Schwarz, D. S.; Hutvágner, G.; Du, T.; Xu, Z.; Aronin, N.; Zamore, P. D.: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. In: *Cell* 115 (2003), S. 199–208 21, 25, 26

[179] Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D.: Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. In: *Cell* 115 (2003), S. 209–216 21, 25, 26

[180] Förstemann, K.; Horwich, M. D.; Wee, L.; Tomari, Y.; Zamore, P. D.: Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. In: *Cell* 130 (2007), S. 287–297 21

[181] Tomari, Y.; Du, T.; Zamore, P. D.: Sorting of Drosophila small silencing RNAs. In: *Cell* 130 (2007), S. 299–308 21

[182] Kretschmer-Kazemi Far, R.; Sczakiel, G.: The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), S. 4417–4424 22, 46, 47, 179, 185

[183] Overhoff, M.; Alken, M.; Far, R. Kretschmer-Kazemi; Lemaitre, M.; Lebleu, B.; Sczakiel, G.; Robbins, I.: Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. In: *J Mol Biol* 348 (2005), S. 871–881 26

[184] Schubert, S.; Grünweller, A.; Erdmann, V. A.; Kurreck, J.: Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. In: *J Mol Biol* 348 (2005), S. 883–893

[185] Brown, K. M.; Chu, C.-Y.; Rana, T. M.: Target accessibility dictates the potency of human RISC. In: *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005), S. 469–470 22, 26, 27, 28, 179, 185

[186] Amarzguioui, M.; Holen, T.; B., E.; Prydz, H.: Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), S. 589–595 22, 25, 26

[187] Zeng, Y.; Yi, R.; Cullen, B. R.: MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003), S. 9779–9784 22

[188] Doench, J. G.; Petersen, C. P.; Sharp, P. A.: siRNAs can function as miRNAs. In: *Genes Dev* 17 (2003), S. 438–442 22

[189] Saxena, S.; Jónsson, Z. O.; Dutta, A.: Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. In: *J Biol Chem* 278 (2003), S. 44312–44319 22

[190] Ming, D.; Wall, M. E.; Sanbonmatsu, K. Y.: Domain motions of Argonaute, the catalytic engine of RNA interference. In: *BMC Bioinformatics* 8 (2007), S. 470–481 22

[191] Tomari, Y.; Zamore, P. D.: Perspective: machines for RNAi. In: *Genes Dev* 19 (2005), S. 517–529 25, 182

[192] Amarzguioui, M.; Prydz, H.: An algorithm for selection of functional siRNA sequences. In: *Biochem Biophys Res Commun* 316 (2004), S. 1050–1058 25, 26

[193] Hohjoh, H.: Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. In: *FEBS Lett* 557 (2004), S. 193–198

[194] Naito, Y.; Yamada, T.; Ui-Tei, K.; Morishita, S.; Saigo, K.: siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. In: *Nucleic Acids Res* 32 (2004), S. W124–W129

[195] Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W. S.; Khvorova, A.: Rational siRNA design for RNA interference. In: *Nat Biotechnol* 22 (2004), S. 326–330

[196] Ui-Tei, K.; Naito, Y.; Takahashi, F.; Haraguchi, T.; Ohki-Hamazaki, H.; Juni, A.; Ueda, R.; Saigo, K.: Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. In: *Nucleic Acids Res* 32 (2004), S. 936–948

[197] Yiu, S. M.; Wong, Prudence W H.; Lam, T. W.; Mui, Y. C.; Kung, H. F.; Lin, Marie; Cheung, Y. T.: Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. In: *Bioinformatics* 21 (2005), S. 144–151 25, 26

[198] Rashid, U. J.; Paterok, D.; Koglin, A.; Gohlke, H.; Piehler, J.; Chen, J. C.-H.: Structure of Aquifex aeolicus argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA-induced silencing complex function. In: *J Biol Chem* 282 (2007), S. 13824–13832 26

[199] Lima, W. F.; Wu, H.; Nichols, J. G.; Sun, H.; Murray, H. M.; Crooke, S. T.: Binding and cleavage specificities of human Argonaute2. In: *J Biol Chem* 284 (2009), S. 26017–26028 26, 93, 122, 166, 167, 168, 172, 173, 174, 175, 177, 180, 184

[200] Ameres, S. L.; Martinez, J.; Schroeder, R.: Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. In: *Cell* 130 (2007), S. 101–112 27, 109, 136, 166, 168, 174, 175, 179, 181, 182, 184, 185, 186

[201] Mourelatos, Z.; Dostie, J.; Paushkin, S.; Sharma, A.; Charroux, B.; Abel, L.; Rappsilber, J.; Mann, M.; Dreyfuss, G.: miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. In: *Genes Dev* 16 (2002), S. 720–728 27

[202] Jin, P.; Zarnescu, D. C.; Ceman, S.; Nakamoto, M.; Mowrey, J.; Jongens, T. A.; Nelson, D. L.; Moses, K.; Warren, S. T.: Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. In: *Nat Neurosci* 7 (2004), S. 113–117 27

[203] Wu, H.; Lima, W. F.; Crooke, S. T.: Investigating the structure of human RNase H1 by site-directed mutagenesis. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 23547–23553 28, 106, 186

[204] Yamashita, S.; Nagata, T.; Kawazoe, M.; Takemoto, C.; Kigawa, T.; Güntert, P.; Kobayashi, N.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Wakiyama, M.; Muto, Y.; Yokoyama, S.: Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein. In: *Protein Sci* 20 (2011), S. 118–130 28, 29, 118, 122, 156, 169, 171, 190, 191

[205] St Johnston, D.; Brown, N. H; Gall, J. G. ; Jantsch, M.: A conserved double-stranded RNA-binding domain. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992), S. 10979–10983 28

[206] Fierro-Monti, I.; Mathews, M. B.: Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. In: *Trends Biochem Sci* 25 (2000), S. 241–246 28

[207] Saunders, L. R.; Barber, G. N.: The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. In: *FASEB J* 17 (2003), S. 961–983 29, 190

[208] Tian, B.; Bevilacqua, P. C.; Diegelman-Parente, A.; Mathews, M. B.: The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004), S. 1013–1023 29, 190

[209] Manche, L.; Green, S. R.; Schmedt, C.; Mathews, M. B.: Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. In: *Mol Cell Biol* 12 (1992), S. 5238–5248 29

[210] Ryter, J. M ; Schultz, S. C.: Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. In: *EMBO J* 17 (1998), S. 7505–7513 29, 191

[211] Schmedt, C.; Green, S. R.; Manche, L.; Taylor, D. R.; Ma, Y.; Mathews, M. B.: Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). In: *J Mol Biol* 249 (1995), S. 29–44 29

[212] Krovat, B. C.; Jantsch, M. F.: Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of Xenopus laevis RNA-binding protein A. In: *J Biol Chem* 271 (1996), S. 28112–28119 29

[213] Nanduri, S.; Carpick, B. W.; Yang, Y.; Williams, B. R.; Qin, J.: Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. In: *EMBO J* 17 (1998), S. 5458–5465 29

[214] Gatignol, A.; Buckler-White, A.; Berkhout, B.; Jeang, K. T.: Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. In: *Science* 251 (1991), S. 1597–1600 29, 30

[215] Daviet, L.; Erard, M.; Dorin, D.; Duarte, M.; Vaquero, C.; Gatignol, A.: Analysis of a binding difference between the two dsRNA-binding domains in TRBP reveals the modular function of a KR-helix motif. In: *Eur J Biochem* 267 (2000), S. 2419–2431 29

[216] Haase, A. D.; Jaskiewicz, L.; Zhang, H.; Lainé, S.; Sack, R.; Gatignol, A.; Filipowicz, W.: TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. In: *EMBO Rep* 6 (2005), S. 961–967 29, 31, 155, 169, 189

[217] Laraki, G.; Clerzius, G.; Daher, A.; Melendez-Peña, C.; Daniels, S.; Gatignol, A.: Interactions between the double-stranded RNA-binding proteins TRBP and PACT define the Medipal domain that mediates protein-protein interactions. In: *RNA Biol* 5 (2008), S. 92–103 29, 30, 169

[218] Eckmann, C. R.; Jantsch, M. F.: Xlrbpa, a double-stranded RNA-binding protein associated with ribosomes and heterogeneous nuclear RNPs. In: *J Cell Biol* 138 (1997), S. 239–253 30

[219] Kozak, C. A.; Gatignol, A.; Graham, K.; Jeang, K. T.; McBride, O. W.: Genetic mapping in human and mouse of the locus encoding TRBP, a protein that binds the TAR region of the human immunodeficiency virus (HIV-1). In: *Genomics* 25 (1995), S. 66–72 30

[220] Duarte, M.; Graham, K.; Daher, A.; Battisti, P. L.; Bannwarth, S.; Segeral, E.; Jeang, K. T.; Gatignol, A.: Characterization of TRBP1 and TRBP2. Stable stem-loop structure at the 5' end of TRBP2 mRNA resembles HIV-1 TAR and is not found in its processed pseudogene. In: *J Biomed Sci* 7 (2000), S. 494–506

[221] Bannwarth, S.; Lainé, S.; Daher, A.; Grandvaux, N.; Clerzius, G.; Leblanc, A. C.; Hiscott, J.; Gatignol, A.: Cell-specific regulation of TRBP1 promoter by NF-Y transcription factor in lymphocytes and astrocytes. In: *J Mol Biol* 355 (2006), S. 898–910

[222] Bannwarth, S.; Talakoub, L.; Letourneur, F.; Duarte, M.; Purcell, D. F.; Hiscott, J.; Gatignol, A.: Organization of the human tarbp2 gene reveals two promoters that are repressed in an astrocytic cell line. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 48803–48813 30

[223] Paroo, Z.; Ye, X.; Chen, S.; Liu, Q.: Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. In: *Cell* 139 (2009), S. 112–122 30, 31

[224] Park, H.; Davies, M. V.; Langland, J. O.; Chang, H. W.; Nam, Y. S.; Tartaglia, J.; Paoletti, E.; Jacobs, B. L.; Kaufman, R. J.; Venkatesan, S.: TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994), S. 4713–4717 30, 193

[225] Cosentino, G. P.; Venkatesan, S.; Serluca, F. C.; Green, S. R.; Mathews, M. B.; Sonenberg, N.: Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995), S. 9445–9449 121

[226] Benkirane, M.; Neuveut, C.; Chun, R. F.; Smith, S. M.; Samuel, C. E.; Gatignol, A.; Jeang, K. T.: Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. In: *EMBO J* 16 (1997), S. 611–624 30, 193

[227] Lee, K.; Fajardo, M. A.; Braun, R. E.: A testis cytoplasmic RNA-binding protein that has the properties of a translational repressor. In: *Mol Cell Biol* 16 (1996), S. 3023–3034 30

[228] Siffroi, J. P.; Pawlak, A.; Alfonsi, M. F.; Troalen, F.; Guellaen, G.; Dadoune, J. P.: Expression of the TAR RNA binding protein in human testis. In: *Mol Hum Reprod* 7 (2001), S. 219–225 30

[229] Zhong, J.; Peters, A. H.; Lee, K.; Braun, R. E.: A double-stranded RNA binding protein required for activation of repressed messages in mammalian germ cells. In: *Nat Genet* 22 (1999), S. 171–174 30

[230] Peters, G. A.; Hartmann, R.; Qin, J.; Sen, G. C.: Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. In: *Mol Cell Biol* 21 (2001), S. 1908–1920 30

[231] Iwamura, T.; Yoneyama, M.; Koizumi, N.; Okabe, Y.; Namiki, H.; Samuel, C. E.; Fujita, T.: PACT, a double-stranded RNA binding protein acts as a positive regulator for type I interferon gene induced by Newcastle disease virus. In: *Biochem Biophys Res Commun* 282 (2001), S. 515–523 30

[232] Patel, R. C.; Sen, G. C.: PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. In: *EMBO J* 17 (1998), S. 4379–4390 31, 193

[233] Patel, C. V.; Handy, I.; Goldsmith, T.; Patel, R. C.: PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 37993–37998 31, 193

[234] Kok, K. H.; Ng, M.-H. J.; Ching, Y.-P.; Jin, D.-Y.: Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. In: *J Biol Chem* 282 (2007), S. 17649–17657 31, 32, 169, 189

[235] Daniels, S.. M.; Melendez-Peña, C. E.; Scarborough, R. J.; Daher, A.; Christensen, H. S.; Far, M. E.; Purcell, D. F. J.; L., S.; Gatignol, A.: Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. In: *BMC Mol Biol* 10 (2009), S. 38–51 31, 155, 189

[236] Tomari, Y.; Matranga, C.; Haley, B.; Martinez, N.; Zamore, P. D.: A protein sensor for siRNA asymmetry. In: *Science* 306 (2004), S. 1377–1380 31, 192

[237] Gredell, J. A.; Dittmer, M. J.; Wu, M.; Chan, C.; Walton, S. P.: Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. In: *Biochemistry* 49 (2010), S. 3148–3155 31, 116, 171

[238] Wang, H.-W.; Noland, C.; Siridechadilok, B.; Taylor, D. W.; Ma, E.; Felderer, K.; Doudna, J. A.; Nogales, E.: Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. In: *Nat Struct Mol Biol* 16 (2009), S. 1148–1153 32, 33, 167, 175, 190

[239] Lau, P.-W.; Potter, C. S.; Carragher, B.; MacRae, I. J.: Structure of the human Dicer-TRBP complex by electron microscopy. In: *Structure* 17 (2009), S. 1326–1332 32

[240] Tahbaz, N.; Kolb, F. A.; Zhang, H.; Jaronczyk, K.; Filipowicz, W.; Hobman, T. C.: Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. In: *EMBO Rep* 5 (2004), S. 189–194 32

[241] Sashital, D. G.; Doudna, J. A.: Structural insights into RNA interference. In: *Curr Opin Struct Biol* 20 (2010), S. 90–97 33

[242] Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Weber, K.; Tuschl, T.: Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. In: *Methods* 26 (2002), S. 199–213 47

[243] Veldhoen, S.; Laufer, S. D.; Trampe, A.; Restle, T.: Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), S. 6561–6573 47

[244] Vallone, P. M.; Butler, J. M.: AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. In: *Biotechniques* 37 (2004), S. 226–231 50

[245] Mathews, D. H.; Sabina, J.; Zuker, M.; Turner, D. H.: Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. In: *J Mol Biol* 288 (1999), S. 911–940 50, 179

[246] Zuker, M.: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), S. 3406–3415 50, 179

[247] Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; Bairoch, A.: ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), S. 3784–3788 50

[248] Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977), S. 5463–5467 58

[249] Gill, S. C.; Hippel, P. H.: Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. In: *Anal Biochem* 182 (1989), S. 319–326 63

[250] Ehresmann, B.; Imbault, P.; Weil, J. H.: Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. In: *Anal Biochem* 54 (1973), S. 454–463 63

[251] Warburg, O.; Christian, W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. In: *Biochem Z* 310 (1941), S. 384–421 63

[252] Scopes, R. K.: Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. In: *Anal Biochem* 59 (1974), S. 277–282 63

[253] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), S. 248–254 64

[254] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–685 65

[255] Wang, B.; Li, S.; Qi, H. H.; Chowdhury, D.; Shi, Y.; Novina, C. D.: Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. In: *Nat Struct Mol Biol* 16 (2009), S. 1259–1266 93, 166, 167, 182, 184

[256] MacRae, I. J.; Ma, E.; Zhou, M.; Robinson, C. V.; Doudna, J. A.: In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008), S. 512–517 93, 121, 155, 168, 175

[257] Salvatore, V.; Potenza, N.; Papa, U.; Nobile, V.; Russo, A.: Bacterial expression of mouse argonaute 2 for functional and mutational studies. In: *Int J Mol Sci* 11 (2010), S. 745–753 108, 110, 167

[258] Chakravarthy, S.; Sternberg, S. H.; Kellenberger, C. A.; Doudna, J. A.: Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. In: *J Mol Biol* 404 (2010), S. 392–402 118, 156, 190

[259] Bartel, D. P.: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. In: *Cell* 136 (2009), S. 215–233 143, 181, 182

[260] Tan, G. S.; Garchow, B. G.; Liu, X.; Yeung, J.; Morris, J. P.; Cuellar, T. L.; McManus, M. T.; Kiriakidou, M.: Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. In: *Nucleic Acids Res* 37 (2009), S. 7533–7545 168, 172, 173

[261] Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Lührmann, R.; Tuschl, T.: Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. In: *Cell* 110 (2002), S. 563–574 168

[262] Daher, A.; Laraki, G.; Singh, M.; Melendez-Peña, C. E.; Bannwarth, S.; Peters, A. H. F. M.; Meurs, E. F.; Braun, R. E.; Patel, R. C.; Gatignol, A.: TRBP control of PACT-induced phosphorylation of protein kinase R is reversed by stress. In: *Mol Cell Biol* 29 (2009), S. 254–265 169

[263] Lee, J. Y.; Kim, H.; Ryu, C. H.; Kim, J. Y.; Choi, B. H.; Lim, Y.; Huh, P.-W.; Kim, Y.-H.; Lee, K.-H.; Jun, T.-Y.; Rha, H. K.; Kang, J.-K.; Choi, C. R.: Merlin, a tumor suppressor, interacts with transactivation-responsive RNA-binding protein and inhibits its oncogenic activity. In: *J Biol Chem* 279 (2004), S. 30265–30273 169

[264] Tang, F.; Hajkova, P.; O'Carroll, D.; Lee, C.; Tarakhovsky, A.; Surani, K. Laoand M. A.: MicroRNAs are tightly associated with RNA-induced gene silening complexes in vivo. In: *Biochem Biophys Res Commun* 372 (2008), S. 24–29 173

[265] Scholz, C.: *Untersuchung der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz in Säugerzellextrakt*, Universität zu Lübeck, Masterarbeit, 2008 173

[266] Wöhrl, B. M.; Krebs, R.; Goody, R. S.; Restle, T.: Refined model for primer/template binding by HIV-1 reverse transcriptase: pre-steady-state kinetic analyses of primer/template binding and nucleotide incorporation events distinguish between different binding modes depending on the nature of the nucleic acid substrate. In: *J Mol Biol* 292 (1999), S. 333–344 178

[267] Parker, James S.; Parizotto, Eneida A.; Wang, Muhan; Roe, S. M.; Barford, David: Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein. In: *Mol Cell* 33 (2009), S. 204–214 181

[268] Yang, S. W.; Chen, H.-Y.; Yang, J.; Machida, S.; Chua, Na.-H.; Yuan, Y. A.: Structure of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. In: *Structure* 18 (2010), S. 594–605 191

[269] Bycroft, M.; Grünert, S.; Murzin, A. G.; Proctor, M.; Johnston, D. S.: NMR solution structure of a dsRNA binding domain from Drosophila staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. In: *EMBO J* 14 (1995), Jul, Nr. 14, S. 3563–3571 191

[270] Ramos, A.; Grünert, S.; Adams, J.; Micklem, D. R.; Proctor, M. R.; Freund, S.; Bycroft, M.; Johnston, D. S.; Varani, G.: RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. In: *EMBO J* 19 (2000), S. 997–1009 191

[271] Liu, Q.; Rand, T. A.; Kalidas, S.; Du, F.; Kim, H.-E.; Smith, D. P.; Wang, X.: R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. In: *Science* 301 (2003), S. 1921–1925 192

[272] van Holde, K.; Johnson, W.; Ho, P.: *Principles of Physical Biochemistry.* 2nd Edition. Pearson Education, Inc., 2006 225

[273] Sartor, M.: *Dynamic Light Scattering.* University of California San Diego, 2000 226

A Anhang

A.1 Theoretische Grundlagen der biochemischen und biophysikalischen Methoden

A.1.1 Ermittlung von Dissoziationskonstanten durch Fluoreszenztitration unter *steady state* Bedingungen

Die Gleichgewichtsreaktion zweier Bindungspartner A und B kann wie folgt beschrieben werden:

$$A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AB \tag{A.1}$$

Durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes ergibt sich die Dissoziationskonstante K_d:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \tag{A.2}$$

Durch die Massenerhaltung gilt folgender Zusammenhang analog für beide Bindungspartner A und B:

$$[A]_0 = [A] + [AB] \tag{A.3}$$

mit $[A]_0$, $[B]_0$ = Gesamtkonzentration der Bindungspartner A bzw. B, $[A]$, $[B]$ = Konzentration der freien Bindungspartner A bzw. B und $[AB]$ = Konzentration des Komplexes aus A und B. Aus Massenwirkungsgesetz (A.2) und Massenerhaltung (A.3) ergibt sich nun:

$$K_d = \frac{([A]_0 - [AB]) \cdot ([B]_0 - [AB])}{[AB]} \tag{A.4}$$

Durch das Auflösen der Gleichung nach $[AB]$ ergeben sich zwei mathematische Lösungen, von denen jedoch nur diejenige mit dem negativen Vorzeichen vor dem Wurzelterm physikalisch sinnvoll ist:

$$[AB] = \frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0} \tag{A.5}$$

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Fluoreszenztitration unter *steady state* Bedingungen kommt es zur Änderung eines Fluoreszenzsignals ΔF, das vom Bindungspartner B mit konstanter Konzentration ausgeht. Da die Änderung des Signals durch die Wechselwirkung beider

Bindungspartner miteinander zustande kommt, ist sie proportional zum Bindungsgrad, welcher vom Verhältnis $[AB]$ zu $[B]_0$ beschrieben wird. Unter sättigenden Bedingungen stellt die maximale Fluoreszenzänderung $\Delta F_{\max}$ die Proportionalitätskonstante dar.

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \cdot \frac{[AB]}{[B]_0} \tag{A.6}$$

mit $\Delta F =$ Änderung des Fluoreszenzsignals bei einem Titrationsschritt und $\Delta F_{\max} =$ maximale Änderung des Fluoreszenzsignals.

Die pro Titrationsschritt erfasste Messgröße ist die Gesamtfluoreszenz F. Sie setzt sich zusammen aus der Grundfluoreszenz des ungebundenen fluoreszierenden Bindungspartners B und der durch Zugabe des Bindungspartners A hervorgerufenen Fluoreszenzänderung ΔF. Je nach Art der Wechselwirkung kann dies eine Signalab- oder zunahme sein. Im ersten Fall entspricht die Grundfluoreszenz von B der maximal gemessenen Fluoreszenz $F_{\max}$, im zweiten der minimal gemessenen Fluoreszenz F_0. Mathematisch ergibt sich also für eine Signalabnahme

$$F = F_{\max} - \Delta F \tag{A.7}$$

und für eine Signalzunahme

$$F = F_0 + \Delta F \tag{A.8}$$

Durch Kombination der Gleichungen A.7 bzw. A.8 mit A.6 und A.5 ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz folgender Zusammenhang:

$$F = F_{\max} - (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[A]_0+[B]_0+K_\mathrm{d}}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A]_0+[B]_0+K_\mathrm{d}}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0}}{[B]_0} \tag{A.9}$$

für eine Abnahme des Fluoreszenzsignls und

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[A]_0+[B]_0+K_\mathrm{d}}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A]_0+[B]_0+K_\mathrm{d}}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0}}{[B]_0} \tag{A.10}$$

für eine Zunahme des Fluoreszenzsignals.

Durch Messung der Gesamtfluoreszenz F nach jedem Titrationsschritt und Auftragung gegen die Konzentration des Bindungspartners A ergibt sich eine Bindungskurve, die durch die Annäherung der adäquaten quadratischen Gleichung A.9 oder A.10 mathematisch ausgewertet werden kann.

A.1.2 Ermittlung von Dissoziationskonstanten durch Verdrängungstitration unter *steady state* Bedingungen

Durch Verdrängungstitration kann die Affinität eines Proteins zu einem Liganden bestimmt werden, ohne dass die Bindungsreaktion ein messbares Signal hervorruft. Es muss die Dissoziationskonstante für einen alternativen Liganden bekannt sein, der durch den neuen Liganden aus einem vorgelegten Komplex verdrängt wird. Durch die Kompetition beider Liganden um die Bindestelle des Proteins kann das Verhältnis zwischen freier und gesamter Komponente sowie die zugehörigen Fluoreszenzsignale definiert werden. Daraus ergibt sich folgendes Modell, auf Grund dessen das Programm Scientist eine Bestimmung der Affinität eines Proteins zu unmarkierter Nukleinsäure erlaubt:

Modell		Definitionen
IndVars: Ctot	A	Protein
DepVars: Af, Bf, AB, AC, Cf, F	B	markiertes Substrat
Params: Kd1, Kd2, Atot, Btot, Yb, Yab	C	unmarkiertes Substrat
$AB = Af \cdot Bf/Kd1$	f	freie Konzentration
$AC = Af \cdot Cf/Kd2$	tot	gesamte Konzentration
$Atot = Af + AB + AC$	F	Fluoreszenz
$Btot = Bf + AB$	Kd1	K_d von B
$Ctot = Cf + AC$	Kd2	K_d von C
$0 < Af < Atot$	Yb	$F_{Btot,\,frei}/[Btot]$
$0 < Bf < Btot$	Yab	$F_{AB,\,komplex}/[AB]$
$0 < Cf < Ctot$		
$F = Bf \cdot Yb + AB \cdot Yab$		

Für die Berechnung von Kd2 wurden die Parameter Kd1, Yb und Yab konstant vorgegeben.

A.1.3 Ermittlung von Molekülgrößen durch Dynamische Lichtstreuung

Die zeitabhängigen Fluktuationen der Streulichtintensitäten, die korreliert sind mit der Diffusion eines Moleküls, können über eine Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung quantifiziert werden [272]:

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau)\rangle}{\langle I(t)\rangle^{2}} \tag{A.11}$$

mit $I(t) =$ Intensität des gestreuten Lichts zur Zeit t und $\tau =$ Verzögerungszeit.

Die Autokorrelationsfunktion einer monodispersen Proteinlösung wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$g^{(2)}(\tau) = B + \beta e^{-2\Gamma\tau} \tag{A.12}$$

mit $B =$ Basislinie der Autokorrelationsfunktion bei unendlicher Verzögerungszeit, $\beta =$ Amplitude bei $\tau = 0$ und $\Gamma =$ Abklingrate.

Die gemessene Autokorrelationsfunktion wird nach der *least square* Methode an Gleichung A.12 angepasst und so die Abklingrate erhalten, mit deren Hilfe der Diffusionskoeffizient D berechnet werden kann:

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \tag{A.13}$$

Für den Streuvektor q gilt:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \tag{A.14}$$

mit $n =$ Phasenfaktor, $\lambda =$ Wellenlänge und $\theta =$ Streuwinkel.

Für die Berechnung des hydrodynamischen Radius R_h werden folgende Annahmen getroffen:

1. Die Partikel in der Lösung bewegen sich mit Brown'scher Molekularbewegung.
2. Die Partikel sind spherisch.

Für die Berechnung von R_h gilt die Stokes-Einstein-Beziehung:

$$R_\mathrm{h} = \frac{kT}{6\pi\eta D} \tag{A.15}$$

mit $k =$ Boltzmann-Konstante, $T =$ Temperatur in Kelvin und $\eta =$ Viskosität des Lösungsmittels [273].

Aus dem hydrodynamischen Radius kann zuletzt das Molekulargewicht MW der untersuchten Partikel berechnet werden:

$$MW(kDa) = (R_\mathrm{h} \cdot R_\mathrm{h} - Faktor)^{2,3398} \tag{A.16}$$

mit $R_\mathrm{h} - Faktor = 1{,}68$.

A.2 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen erläutert. Bei englischsprachigen Abkürzungen ist die Erläuterung ebenfalls in englischer Sprache angegeben und soweit diese im deutschen Sprachgebrauch vorhanden ist, durch eine deutsche Übersetzung ergänzt.

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
A_{260}	Absorption bei 260 nm
A_{280}	Absorption bei 280 nm
A. aeolicus	*Aquifex aeolicus*
A. fulgidus	*Archaeglobus fulgidus*

AG	Arbeitsgruppe
Ago	Argonaute
Ago2	Argonaute2
AIDS	*acquired immunodeficiency syndrome*, erworbenes Immundefektsyndrom
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
D	Asparaginsäure
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DGCR8	*DiGeorge syndrome critical region gene 8*
DLS	Dynamische Lichtstreuung
D. melanogaster	*Drosophila melanogaster*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dPAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
D. rerio	*Danio rerio*
ds	*double-stranded*, doppelsträngig
dsRBM	dsRNA-bindendes Motiv
dsRBP	dsRNA-bindendes Protein
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIF2C2	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2C2
eIF4E	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E
EMSA	*electrophoretic mobility shift assay*, Gelverzögerungs-Analyse

Erk	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FAM	5/6-Carboxyfluorescein
fmol	Femtomol
FPLC	*fast protein liquid chromatography*, Hochdurchsatzflüssigkeitschromatographie
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
ggf.	gegebenenfalls
G. intestinalis	*Giardia intestinalis*
GST	Glutathion-S-Transferase
h	*hour*, Stunde
H	Histidin
H_2O	Wasser
HA	Hämagglutinin
hAgo2	humanes Argonaute2 Protein
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HF	*high fidelity*, hohe Präzision
His	Histidin
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus-1
HPLC	*high performance liquid chromatography*, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	*horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase
Hsp90	Hitzeschock-Protein 90
ICAM	*intracellular adhesion molecule*, intrazelluläres Adhäsionsmolekül
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Ratenkonstante
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
k_{cat}	Wechselzahl
KCH_3COOH	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
K_d	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
$K_{d,\,app}$	apparente Dissoziationskonstante
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_m	Michaelis-Konstante

kV	Kilovolt
l	Liter
L-Arg	L-Arginin
LB	Luria Bertani
m	Meter
M	Mol pro Liter
$M^{-1}s^{-1}$	Liter pro Mol und Sekunde
m^7G	*cap* Struktur von reifer mRNA
mA	Milliampere
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*, Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	*multiple cloning site*, multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
Mg^{2+}	divalentes Magnesiumion
$MgCH_3COOH$	Magnesiumacetat
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
Mid	*middle*
min	Minuten
miRNA	*micro*RNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
mmol	Millimol
mRNA	*messenger* RNA, Boten-RNA
ms	Millisekunde
N_2	Stickstoff
Na_2HPO_4	Natriumdihydrogenphosphat
$Na_3C_6H_5O_7$	Natriumcitrat
$NaCH_3COOH$	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
N. crassa	*Neurospora crassa*
NF90	Nukleärer Faktor 90
ng	Nanogramm
$(NH_4)_2SO_4$	Ammoniumsulfat
NI	*non interfering*, nicht interferierend
nM	Nanomol pro Liter
nM^{-1}	Liter pro Nanomol
nm	Nanometer

NMR	*nuclear magnetic resonance*, Kernmagnetresonanz
NP40	Nonidet P40
nPAGE	nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
NSL	*nucleotide specificity loop*, Sekundärstruktur für die spezifische Selektion von Nukleotiden (Nukleotid-Spezifitätsschleife)
nt	Nukleotid
NTP	Ribonukleotidtriphosphat
OB	Oligonukleotid/Oligosaccharid-Bindung
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PACT	*protein kinase R activator*, Proteinkinase R-Aktivator
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	PIWI Argonaute Zwille
PB	*processing bodies*, Prozessierungskörperchen
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
P. furiosus	*Pyrococcus furiosus*
pH	*potentium hydrogenii*, Kraft des Wasserstoffes
PIWI	*P-element induced wimpy testis*
PKR	Proteinkinase R
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PRBP	Prm-1 RNA-bindendes Protein
pre-miRNA	*precursor* miRNA
pri-miRNA	*primary* miRNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rasiRNA	*repeat-associated* siRNA, mit repetitiven Sequenzen assoziierte siRNA
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RITS	*RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*
RLC	*RISC loading complex*
RNA	*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	*rotations per minute*, Umdrehungen pro Minute
RSB	*RNA sequencing buffer*, RNA Sequenzierungs-Puffer
s	Sekunde
s^{-1}	pro Sekunde
SDS	*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SG	Stressgranula
siRNA	*small interfering* RNA
S. pombe	*Schizosaccharomyzes pombe*
ss	*single-stranded*, einzelsträngig
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAR	*transactivating response*
tasiRNA	*trans acting* siRNA, *in trans* wirkende siRNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TCA	*trichloracetic acid*, Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylendiamin
TEV	*tobacco etch virus*
TFB	*terrific broth*, hervorragende Brühe
TGS	*transcriptional gene silencing*, transkriptionelle Genregulation
TLR	*Toll-like* Rezeptor
TMAE	Trimethylaminoethyl
$\mathbf{t_R}$	Retentionszeit
TRBP	*TAR RNA binding protein*, TAR RNA-bindendes Protein
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
tRNA	Transfer-RNA
T. thermophilus	*Thermus thermophilus*
u	enzymatische Aktivität
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UMP	Uridinmonophosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
$\boldsymbol{V_{max}}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	*volume per volume*, Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	*weight per volume*, Gewicht pro Volumen
XC	Xylencyanol
X. laevis	*Xenopus laevis*
z. B.	zum Beispiel

Å	Ångström
μ**F**	Mikrofarad
μ**g**	Mikrogramm
μ**l**	Mikroliter
μ**m**	Mikrometer
μ**M**	Mikromol pro Liter
μ**mol**	Mikromol
Ω	Ohm
$^{\circ}C$	Grad Celsius

A.3 Abbildungsverzeichnis

2.1 Wirkmechanismen der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi 9
2.2 Struktur eines Argonaute Proteins 15
2.3 Die N-terminale Domäne 16
2.4 Die PAZ Domäne 17
2.5 Die Mid Domäne 18
2.6 Die PIWI Domäne 20
2.7 Schema des minimalen RNAi-Prozesses 22
2.8 Strukturelle Momentaufnahmen des *T. thermophilus* Ago Proteins während der RNAi 24
2.9 Kinetische Kontrollpunkte der Assemblierung und Funktion des RISC 26
2.10 Struktur des dsRBM und Interaktion mit dsRNA 29
2.11 Domänenorganisation von TRBP Isoform 2 und PACT 30
2.12 Strukturmodell des RLC 32

4.1 Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers 78
4.2 Schematischer Aufbau einer *stopped flow* Anlage 80
4.3 Schematischer Aufbau einer DLS-Apparatur 83

5.1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten hAgo2-Fusionskonstrukte . . . 86
5.2 Expression verschiedener hAgo2-Fusionsproteine 88
5.3 Vektorkarten der GST-hAgo2-Fusionskonstrukte 89
5.4 Expression von GST-hAgo2-Fusionsproteinen unter optimierten Bedingungen . 91
5.5 Expression von hTRBP-His 92
5.6 Präparation verschiedener hAgo2-Fusionsproteine aus *inclusion bodies* 94
5.7 Affinitätschromatographische Reinigung von His-hAgo2 und hAgo2-His 97
5.8 Größenauschlusschromatographie von hAgo2-His und His-hAgo2 98

5.9 Repräsentative affinitätschromatographische Reinigung von GST-hAgo2 unter optimierten Bedingungen im analytischen Maßstab 101
5.10 Affinitätschromatographische Reinigung von GST-hAgo2 im präparativen Maßstab 103
5.11 Affinitätschromatographische Reinigung von hTRBP-His im präparativen Maßstab 104
5.12 Nachweis der Spaltungsaktivität von rekombinantem hAgo2 107
5.13 Spaltungsaktivität von NHA-hAgo2 bei verschiedenen Temperaturen 108
5.14 Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 bei verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen . 109
5.15 Regularisierungs-Histogramm der Dynamischen Lichtstreuung durch 24,1 μM NHA-hAgo in Rückfaltungspuffer 112
5.16 Regularisierungs-Histogramm der Dynamischen Lichtstreuung isolierter Populationen von NHA-hAgo 113
5.17 Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von enzymatisch aktivem NHA-hAgo2 114
5.18 Untersuchungen zur Nukleinsäurebindung durch hTRBP-His mittels Gelverzögerungs-Analysen 117
5.19 Analyse des Oligomerisierungszustandes von hTRBP-His in An- bzw. Abwesenheit von siRNA mittels analytischer Gelfiltration 119
5.20 Zusammensetzung einer 12,14 μM hTRBP-His-Lösung 120
5.21 Regularisierungs-Histogramm der Dynamischen Lichtstreuung durch 12,14 μM hTRBP-His in Lagerpuffer 121
5.22 Übersicht über die verwendeten siRNA-Substrate 123
5.23 Bestimmung der Affinität von hAgo2 zu P-as2B-FAM 124
5.24 Bestimmung der Affinität von hAgo2 zu OH-as2B-FAM 125
5.25 Bestimmung der Affinität von hAgo2 zu P-si2B-FAM 126
5.26 *Pre-steady state* Assoziationskinetik von NHA-hAgo2 und 5'-phosphorylierter *versus* unphosphorylierter *guide* RNA 127
5.27 Übersicht über die verwendeten *guide* RNAs 129
5.28 *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von NHA-hAgo2 und 5'-phosphorylierter *versus* unphosphorylierter *guide* RNA 130
5.29 *Pre-steady state* Assoziationskinetik von NHA-hAgo2 und siRNA 132
5.30 *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von NHA-hAgo2 und siRNA 133
5.31 Schematische Darstellung der Fluoreszenzänderung bei Bildung ternärer Komplexe unter Verwendung dreier experimenteller Ansätze 136
5.32 Bestimmung der Affinität des binären Komplexes zur *target* RNA 138
5.33 *Pre-steady state* Assoziationskinetik von binärem GST-hAgo2/P-as2B-FAM-Komplex und s2B-BHQ als *target* RNA 139

5.34 *Pre-steady state* Assoziationskinetik von binärem GST-hAgo2/*guide* RNA-Komplex und komplementärer bzw. nicht-komplementärer *target* RNA 141
5.35 *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von binärem Komplex und *target* RNA . . 142
5.36 Kinetik der *guide* RNA-vermittelten Spaltungsreaktion von *target* RNA durch GST-hAgo 145
5.37 Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 nach Programmierung mit drei verschiedenen siRNA-Substraten 147
5.38 Michaelis-Menten-Kinetik der *guide* RNA-vermittelten Spaltungsreaktion von *target* RNA durch GST-hAgo2 148
5.39 Schema des experimentellen Aufbaus zur Untersuchung des katalytischen Schrittes der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 149
5.40 Spaltungsaktivität präassemblierter ternärer Komplexe in An- und Abwesenheit kompetierender RNA 150
5.41 Schema des experimentellen Aufbaus zur Untersuchung der Produktfreisetzung nach *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 152
5.42 *target* RNA-Umsatz bei Einsatz verschiedener Nukleinsäurekombinationen . . . 153
5.43 Kinetik der Freisetzung von 5'-Spaltprodukten nach *guide* RNA-vermittelter *target* RNA-Spaltung durch GST-hAgo2 154
5.44 Bestimmung der Affinität von hTRBP-His zu intern markierter einzelsträngiger und doppelsträngiger siRNA 156
5.45 Bestimmung der Affinität von hTRBP-His zu endständig markierter doppelsträngiger siRNA 157
5.46 *Pre-steady state* Assoziationskinetik von hTRBP-His und siRNA 158
5.47 *Pre-steady state* Dissoziationskinetik von hTRBP-His und siRNA 159
5.48 Einfluss von hTRBP-His auf die Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 nach seiner Programmierung mit doppelsträngiger siRNA 161
5.49 Einfluss von hPACT-His auf die Spaltungsaktivität von GST-hAgo2 nach seiner Programmierung mit doppelsträngiger siRNA 162

6.1 Kinetisches Modell der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch hAgo2 188
6.2 Modell der minimalen rekombinanten RNA-Interferenz 194

A.4 Tabellenverzeichnis

2.1 Argonaute-ähnliche und PIWI-ähnliche Proteine und ihre Funktion in verschiedenen Organismen . . . 12
2.2 Kinetische Parameter der Katalyse durch RISC in verschiedenen experimentellen Systemen . . . 28

4.1 Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendete Primer sowie Temperaturprofile . . . 51
4.2 Agarosekonzentrationen für die Agarose-Gelelektrophorese in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge . . . 52
4.3 Acrylamidkonzentrationen für die nicht-denaturierende PAGE in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge . . . 53
4.4 Acrylamidkonzentrationen für die denaturierende PAGE in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge . . . 54
4.5 Für die Analyse von Bakterienkolonien mittels PCR verwendete Primer sowie das Temperaturprofil . . . 57
4.6 Für die Sequenzierung von Klonen verwendete Primer sowie das Temperaturprofil . . . 58
4.7 Länge der Banden der radioaktiven Nukleinsäure-Größenmarker . . . 62
4.8 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel sowie Prozentigkeit des Trenngels in Abhängigkeit vom Trennbereich . . . 66
4.9 Versuchsbedingungen für die Immundetektion verschiedener Epitope . . . 69
4.10 Versuchsbedingungen für die Expression verschiedener Proteine . . . 70
4.11 Pufferzusammensetzung für die Präparation von hAgo2 aus *inclusion bodies* . . . 71
4.12 Pufferzusammensetzung für die Reinigung von GST-hAgo2 bzw. GST-hAgo2-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen . . . 72
4.13 Pufferzusammensetzung für die Reinigung von hTRBP-His unter nicht-denaturierenden Bedingungen . . . 74
4.14 Funktionell untersuchte Proteine mit zugehörigen Puffern . . . 76

5.1 Getestete Bedingungen für die nicht-denaturierende Reinigung von hAgo2-His . . . 95
5.2 Übersicht über die biochemischen und kinetischen Parameter bei Bildung eines binären Komplexes . . . 134
5.3 Zusammenfassung der Ratenkonstanten der Assoziationsreaktion von binärem GST-hAgo2/*guide* RNA-Komplex und *target* RNA mit drei unabhängigen experimentellen Ansätzen . . . 140
5.4 Übersicht über die biochemischen und kinetischen Parameter bei Bildung eines ternären Komplexes . . . 144

5.5 Übersicht über die biochemischen und kinetischen Parameter bei Bildung eines hTRBP-His/siRNA-Komplexes 160

6.1 Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem oder murinem Ago2 und am 5'-Ende phosphorylierter einzelsträngiger *guide* RNA 173
6.2 Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem Ago2 und am 5'-Ende nicht-phosphorylierter einzelsträngiger *guide* RNA 174
6.3 Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem Ago2 und doppelsträngiger phosphorylierter siRNA 175
6.4 Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem Ago2 und am 5'-Ende phosphorylierter einzelsträngiger *guide* RNA sowie komplementärer oder nicht-komplementärer *target* RNA 180
6.5 Vergleich verschiedener kinetischer Parameter der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung 185
6.6 Vergleich verschiedener Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Komplexe aus humanem TRBP und siRNA 190

A.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei all denen bedanken, ohne die meine Dissertation in dieser Form nicht realisierbar gewesen wäre. Mein ganz besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Tobias Restle – für das Überlassen eines spannenden und herausfordernden Projektes sowie die intensive und persönliche Betreuung während der letzten drei Jahre.

Prof. Dr. Thomas Peters und **Prof. Dr. Norbert Tautz** – für die Erstellung des Zweitgutachtens bzw. die Übernahme des Prüfungsausschuss-Vorsitzes. Prof. Dr. Thomas Peters danke ich weiterhin für seine Betreuung im Rahmen der Promotionsförderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes, die Organisation von Treffen und Ausflügen mit anderen Stipendiaten und seinem Rat bei allen Fragen.

Prof. Dr. Georg Sczakiel – für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und seine Unterstützung.

der **Studienstiftung des deutschen Volkes** – für die materielle und ideelle Förderung meines Studiums und meiner Promotion, die mir neben finanzieller Unabhängigkeit und hilfreicher Unterstützung immer besondere Motivation gewährte.

Sophie Weißbach, **Jannike Blank**, **Anna Roth**, **Sarah Willkomm** und **Johannes Heidemann** – für ihre fleißige Mitarbeit an meinen Dissertationsprojekten während ihrer Master- und Bachelorarbeiten bzw. ihrer Blockpraktika.

Carsten Geist – für die praktische Einarbeitung in die Expression und Präparation von hAgo2 sowie das Überlassen des NHA-hAgo2-Konstruktes und der nötigen Protokolle.

Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far – für das Überlassen der Konstrukte für hAgo2-His und hTRBP-His und der nötigen Protokolle.

Petra Höltig – für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei organisatorischen und allen anderen Problemen sowie tausend Dank für die Korrektur meiner Arbeit.

meinen Mitstreitern im Laboralltag, insbesondere **Mira Elbasyouny**, **Dr. Sandra Laufer**, **Ulrike Haas**, **Dr. Anke Detzer**, **Alev Erogullari** und **Christina Engel** – für ganz viel Unterstützung, wissenschaftliche Diskussionen, Ablenkung und sportliche Pausen. Bei Anke möchte ich mich außerdem für die vielen hilfreichen Anregungen und Korrekturen bei der Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

allen **Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin** – für die schöne Zeit am Institut, die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima sowie die allseitige Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt **Winfried Wünsche**, **Kirsten Frank** und **Gabriele Kreutzfeldt** für technische Hilfe aller Art.

meinen Freunden – für Verständnis, Unterstützung und Ablenkung, wann immer es nötig war.

meiner Familie – für ihren nie enden wollenden Rückhalt und die Unterstützung auf meinem Weg. Ich habe Euch viel zu verdanken.

meinem Mann Matthias – ich danke Dir für all Deine Hilfe, Dein Verständnis und Deine Begleitung auf diesem Weg, den ich ohne Dich nicht hätte gehen können. Du hast mitgefiebert und mitgelitten, wofür ich Dir immer dankbar sein werde.

Andrea Deerberg

Persönliche Daten

Geburtsdatum	**21. April 1982**
Geburtsort	**Tübingen**
Familienstand	**verheiratet**
Nationalität	**deutsch**

Sprachkenntnisse

englisch	**verhandlungssicher (TOEFL)**
französich	**gute Kenntnisse**
italienisch	**Grundkenntnisse**

Ausbildung

seit 04/2008 **Promotion**
Thema der Dissertation: Biochemische Charakterisierung der siRNA-vermittelten Erkennung und Spaltung von *target* RNA durch humanes Argonaute2 Protein
Institut für Molekulare Medizin, UKSH und Universität zu Lübeck

seit 10/2007 **Studium der Medizin**
Universität zu Lübeck

2006 – 2007 **Diplomarbeit**
Thema der Diplomarbeit: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Proteins WAIT-1 und seiner Rolle bei der Aktivierung des Enzyms Neutrale Sphingomyelinase
Institut für Immunologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2002 – 2007 **Studium der Biochemie und Molekularbiologie**
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Diplom,
Gesamtnote 1,15 (ausgezeichnet)

2001 – 2002 **Studium der Biologie und Chemie**
University of St. Andrews/Großbritannien

1988 – 2001 **Schulausbildung**
Gymnasium des Paul-von-Denis-Schulzentrums Schifferstadt, Abitur,
Gesamtnote 1,1 (sehr gut)

Andrea Deerberg

Stipendien

09/2011 **Kurzstipendium für eine Konferenzteilnahme im Ausland**
Studienstiftung des deutschen Volkes

05/2009 **Kurzstipendium für eine Konferenzteilnahme im Ausland**
Studienstiftung des deutschen Volkes

seit 2008 **Promotionsstipendium**
Studienstiftung des deutschen Volkes

2004 – 2007 **Stipendium zur Förderung des Studiums**
Studienstiftung des deutschen Volkes

09/2001 – 06/2002 **Übernahme der Studiengebühren**
Student Awards Agency Scotland (SAAS)

Berufserfahrung

04/2008 – 11/2008 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Institut für Molekulare Medizin, UKSH und Universität zu Lübeck

09/2006 – 04/2007 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Institut für Immunologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

06/2001 – 08/2001 **Tätigkeit als Werksstudentin**
Landwirtschaftliche Versuchsanstalt der BASF, Limburgerhof

08/1996 **Praktikum**
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven

Betreute Abschlussarbeiten und Praktika

2011 **Kinetische Analyse der siRNA-vermittelten *target* RNA-Spaltung durch rekombinantes humanes Argonaute2 Protein**
Sarah Willkomm, Masterarbeit im Studiengang Molekulare Lebenswissenschaften (Master)

2011 **Biochemische Charakterisierung der doppelsträngige RNA bindenden Proteine PACT und TRBP**
Johannes Heidemann, Bachelorarbeit im Studiengang Molekulare Lebenswissenschaften (Bachelor)

2010 **Charakterisierung der hAgo2-vermittelten *target* RNA-Spaltung**
Sarah Willkomm, Blockpraktikum im Studiengang Molekulare Lebenswissenschaften (Master)

2010 **Expression, Reinigung und Charakterisierung von rekombinantem humanen TRBP**
Jannike Blank, Bachelorarbeit im Studiengang Molekulare Lebenswissenschaften (Bachelor)

2010 **Studien zur Optimierung der Expression und Reinigung von rekombinantem humanen GST-Ago2**
Anna Roth, Blockpraktikum im Studiengang Molekulare Lebenswissenschaften (Master)

2009 **Entwicklung eines Reinigungsprotokolls und Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von humanem Argonaute 2 Protein**
Sophie Weißbach, Bachelorarbeit im Studiengang Molekulare Lebenswissenschaften (Bachelor)

Publikationsliste

Originalartikel

2011
Manuskript in Vorbereitung

Minimal mechanistic model of siRNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute2 protein
***A. Deerberg**, S. Willkomm, T. Restle*

2011
Manuskript in Vorbereitung

Elucidating the role of TRBP in RNA interference
***A. Deerberg**, J. Heidemann, J. Blank, S. Willkomm, R. Kretschmer-Kazemi Far, T. Restle*

2011
Manuskript in Vorbereitung

Guide and target RNA increase the stability of recombinant human Argonaute2 protein *in vitro*
***A. Deerberg**, T. Restle*

2010
PNAS
(107)
1112 – 1117

The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase
*S. Philipp, M. Puchert, S. Adam-Klages, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, S. Mathieu, **A. Deerberg**, L. Kolker, N. Marchesini, D. Kabelitz, Y. Hannun, S. Schütze, D. Adam*

2009
Rad. Oncol.
(4)
41 – 50

Differential protection by wildtype vs. organelle-specific Bcl-2 suggests a combined requirement of both the ER and mitochondria in ceramide-mediated caspase-independent programmed cell death
***A. Deerberg**, J. Sosna, L. Thon, C. Belka, D. Adam*

Konferenzbeiträge

2011
Vortrag
Cambridge (UK)

Minimal mechanistic model of guide RNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute2 protein
***T. Restle**, S. Willkomm, A. Deerberg*
6^{th} Cambridge Symposium: nucleic acids chemistry and biology, University of Cambridge

2011
Poster
Mosbach (Baden)

Minimal mechanistic model of guide RNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute2 protein
***A. Deerberg**, S. Willkomm, T. Restle*
62. Mosbacher Kolloquim: Mechanisms of RNA-mediated regulation, Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie

2011 Poster Mosbach (Baden)
Elucidating the role of TRBP in RNA interference
J. Blank, A. Deerberg, ***S. Willkomm****, R. Kretschmer-Kazemi Far, T. Restle*
62. Mosbacher Kolloquim: Mechanisms of RNA-mediated regulation, Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie

2010 Poster Murnau am Staffelsee
Biochemical characterization of recombinant human Argonaute2
A. Deerberg*, C. Geist, G. Sczakiel, T. Restle*
Murnau Conference: Structural Biology of the modern RNA world, Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie

2009 Poster Hamburg
hAgo2 with carboxy-terminal modification shows decreased slicer activity
A. Deerberg*, S. Weißbach, C. Geist, G. Sczakiel, T. Restle*
First International Symposium on Structural Systems Biology, Universität Hamburg

2009 Poster Lübeck
Was die alten Griechen noch nicht wussten – Von der Leibspeise der Argonauten
A. Jung*, T. Restle*
Uni im Dialog: Dritter Lübecker Doktorandentag, Universität zu Lübeck

2009 Poster Wien (Österreich)
Towards a detailed biochemical characterization of recombinant human Ago2 protein
A. Jung*, C. Geist, G. Sczakiel, T. Restle*
4^{th} Microsymposium on Small RNAs, Institute of Molecular Biotechnology