Enzymkinetik der humanen RNase Dicer in Zellextrakten und Charakterisierung eines Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

### Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Arne Werner aus Jena

Hamburg, 2008



Universität Hamburg

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Oktober 2004 bis April 2008 in der Abteilung Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn durchgeführt. Die Roentgenkleinwinkelstreuungsmessungen entstanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Dmitri Svergun, EMBL Outstation Hamburg.

Gutachter: Herr Prof. Dr. Ulrich Hahn Herr Prof. Dr. Dr. Christian Betzel

Tag der Disputation 26.9. 2008

#### **Bibliographische Beschreibung**

Arne Werner

Universität Hamburg, Dissertation 162 Seiten, 197 Zitate, 66 Abbildungen, 25 Tabellen

#### Zusammenfassung

Das RNase III-Enzym Dicer ist beteiligt an der posttranskriptionellen und translationalen Regulation der Genexpression. Das Enzym weist in gereinigter Form eine sehr geringe Aktivität auf. In der vorliegenden Arbeit wurde humaner Dicer deshalb in Gegenwart zytosolischer Komponenten, in zytosolischen Zellextrakten, enzymkinetisch charakterisiert. Ein auf Diffusion basierter Enzym-Assay wurde mittels Fluoreszenz-Korrelations-(FCS) Spektroskopie entwickelt. Die Anderung der Diffusionszeit eines fluoreszenzmarkierten Substrates nach enzymatischer Restriktion wurde gemessen und durch Analyse mittels eines Fitting-Modells für unterschiedliche Diffusionsspezies die Enzymaktivität berechnet. Der Enzym-Substrat-Komplex (ES-Komplex) konnte von Substrat und Produkt durch seine signifikant höhere Diffusionszeit unterschieden werden. Nach Ersatz von MgCl<sub>2</sub> durch CaCl<sub>2</sub> blieb ein dsRNA-Dicer-Komplex erhalten.

Rekombinanter Dicer verursachte eine Verringerung der Diffusionszeit von doppelsträngiger, jedoch nicht von einzelsträngiger RNA. Die Enzymaktivität konnte zudem nach Ersatz von MgCl<sub>2</sub> durch CaCl<sub>2</sub> gehemmt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein. Nach Restriktion des Substrates durch das orthologe Enzym mit der ähnlichsten Substratspezifität, RNase III, wurden erheblich höhere Produktdiffusionszeiten erhalten. Ein weiterer Hinweis auf die Dicer-Spezifität des *assays* wurde nach Überexpression des Dicer-Gens in einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) und in HeLa-Zellen erhalten, welche die Enzymaktivität in zytosolischen Extrakten signifikant erhöhte.

Die Substratabhängigkeit der Dicer-Aktivität in zytosolischen HEK293-Zellextrakten ergab eine halbmaximale Enzymaktivität bei einer Substratkonzentration von 76 nM. Die pico- bis femtomolare ES-Komplex-Konzentration erhöhte sich durch Überexpression des Dicer-Gens und wies eine vergleichbare Abhängigkeit von der Substratkonzentration wie die Enzymaktivität auf. Sie war während der linearen Produktbildung weitestgehend konstant. Die Analyse des ES-Komplexes im Rahmen der enzymkinetischen Theorie lässt somit die ermittelten Daten korrekt erscheinen. Demzufolge konnten Komponenten über Konzentrationsunterschiede von vier Größenordnungen unterschieden werden.

iii

Damit gelang es, Substrat, Produkt und ES-Komplex während des *multiple turnovers* in einem Enzym-*Assay* simultan zu verfolgen. Mit Hilfe der ES-Komplex-Konzentration wurde für überproduzierten humanen Dicer eine katalytische Konstante von 2,5 x 10<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> und eine Spezifitätskonstante von 5,5 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> im diffusionslimitierten Bereich bestimmt. Es wurde mit einem Hill-Koeffizienten von 1,8 eine positive Kooperativität festgestellt, die einen Hinweis auf die Regulation der Aktivität gibt. Endogener Dicer wies enzymkinetische Konstanten von vergleichbarer Größenordnung auf.

Die Analyse des theoretisch gut beschriebenen enzymkinetischen Systems erlaubte, die bis dahin gültigen Limitierungen der auf Diffusionszeiten basierten Multikomponentenmodell-Analyse zu hinterfragen. Durch die Anwendung von *state-of-the-art* konfokaler Mikroskopie und neu entwickelten photostabileren Fluorophoren wurde eine Unterscheidung zwischen Diffusionsspezies über Konzentrationsunterschiede von vier Größenordnungen möglich.

In einem zweiten Projekt wurde das Sulforhodamin B bindende RNA-Aptamer mittels FCS analysiert. Es wurde demonstriert, dass in FCS-Messungen von Aptamer-Fluorophor-Komplexen simultan photophysikalische Eigenschaften des Fluorophors und Mobilität sowie molekulare Größe der RNA erfasst werden können. Sulforhodamin B wies im SRB2m-Komplex eine 4-fach erhöhte Diffusionszeit auf. Das Fluorophor Patent Blau V (PBV) ergab keine Autokorrelationsfunktion. Die erheblich erhöhte molekulare Zählrate im Komplex mit ermöglichte FCS-Messungen. Die Dissoziationskonstanten SRB2m stimmten mit Literaturwerten überein. Der hydrodynamische Radius r<sub>H</sub> von SRB2m betrug im Komplex mit PBV 1,9 nm und mit Sulforhodamin B 2,9 nm. Mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) wurde von monomerem SRB2m ein r<sub>H</sub> von 2,1 nm bestimmt. Die Hypothese einer durch PBV verursachten Reduktion der molekularen Größe der RNA, die verbunden ist mit einer Auftrennung in Monomere, wurde in Experimenten mit Roentgenkleinwinkelstreuung bestätigt.

Die Eignung der *in vitro* etablierten Diffusionszeitenanalysen wurde für eine *in vivo*-Anwendung überprüft. Aufgrund unspezifischer Bindung der fluoreszenzmarkierten Spezies an zelluläre Komponenten scheint diese nicht gegeben zu sein.

#### Summary

The RNase III-enzyme Dicer is involved in the posttranscriptional and translational regulation of gene expression. The human RNase Dicer shows, when purified, very low activity. Therefore, in this work, human Dicer was enzymatically characterized in cytosolic cell extracts in the presence of cytosolic cofactors. An enzyme assay based on changes of diffusion time was developed with fluorescence correlation spectroscopy (FCS). A change in diffusion time of fluorescently-labeled substrate after enzymatic restriction was measured and by using fitting models for different diffusion species enzyme activity was determined. The enzyme substrate (ES)-complex did show a significantly higher diffusion time than product and substrate, and could therefore be distinguished from the two diffusion species. The formation of a stable complex of Dicer and dsRNA by substituting CaCl<sub>2</sub> for MgCl<sub>2</sub> was found.

Recombinant Dicer reduced the diffusion time of double stranded RNA, but not of single stranded RNA. The restriction of dsRNA could be inhibited by substituting CaCl<sub>2</sub> for MgCl<sub>2</sub>. These findings agree with published results. After restriction of the substrate by the orthologous enzyme with the highest similarity in substrate specificity a significantly higher product diffusion time was measured. A further indication of the specificity of the assay for Dicer was found by overexpression of the Dicer gene in human embryonic kidney cells (HEK293) and HeLa cells, which led to a significant increase in enzyme activity in cytosolic cell extracts. The dependence of enzyme activity on substrate concentration of human Dicer was further investigated in cytosolic HEK293-cell extracts. The enzyme attained the half maximum enzyme activity at a substrate concentration of 76 nM. The pico- to femtomolar ES-complex concentration increased after Dicer overexpression and showed a similar dependence on substrate concentration as did enzyme activity. ES-complex concentration remained relatively constant during linear product formation. The analysis of the ES-complex with respect to enzyme kinetic theory reveals the accuracy of the experimental data. Therefore, a discrimination between diffusion species by mathematical models over concentration ranges of four orders of magnitude was possible. This enabled to monitor substrate, product and ES-complex concentrations simultaneously during multiple turnover. Using ES-complex concentrations, a catalytic constant of 2.5 x  $10^3$  min<sup>-1</sup> and a specificity constant of 5.5 x  $10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> close to the diffusion limited range were found for overproduced human Dicer. A positive cooperativity with a hill coefficient of 1.8 was deduced, giving a first look into the mode of regulation of enzyme activity. Endogenous Dicer gave kinetic constants of similar range.

The analysis of the theoretically well defined system of enzyme kinetics allowed one to question the, until now, valid limitations of diffusion time-based multicomponent model

v

analysis. By the application of state-of-the-art confocal microscopy and newly developed more photostable fluorophores a discrimination between diffusion species over concentration differences of four orders of magnitude was possible.

In a second project, the sulforhodamine B binding RNA aptamer SRB2m was analyzed by FCS. In this work it was demonstrated, that photophysical properties of the fluorophore as well as mobility and molecular size of the RNA in fluorophor-aptamer-complexes could be simultaneously measured by FCS. The sulforhodamine B-SRB2m complex showed a 4-fold increased diffusion time compared to unbound sulforhodamine B. A second fluorophore, patent blue V (PBV), gave no autocorrelation function. The 36-fold increased molecular brightness of the complex of PBV and SRB2m enabled FCS measurements with excellent signal-to-noise-ratio. The hydrodynamic radius  $r_{\rm H}$  of the PBV- and Sulforhodamin B-SRB2m complex was 1.9 nm and 2.9 nm, respectively. By fluorescence crosscorrelation spectroscopy (FCCS), the  $r_{\rm H}$  of the monomeric SRB2m was determined to be 2.1 nm. The hypothesis that a reduction of the molecular size of SRB2m by PBV due to a separation into monomers occurred, was verified by small angle X-ray scattering experiments.

In this work, the suitability of diffusion time analyses, which was established *in vitro*, was tested for experiments in intact living cells. Due to nonspecific binding of the fluorescently-labeled species to cellular components, the assays do not seem to be applicable *in vivo*.

Für meine Familie

### I. Inhaltsverzeichnis

1.	Ein	leitung	]	1
	1.1.	Postt	ranskriptionale und translationale Regulation der Genexpression durch si	RNA
		und r	niRNA	1
	1.2.	Huma	aner Dicer	3
	1.3.	Fluor	eszenz-Korrelations-Spektroskopie	5
	1.4.	Fluor	ophor bindende RNA-Aptamere	6
	1.5.	Frage	estellungen der Arbeit	10
	1.5	.1.	Enzymkinetische Charakterisierung von humanem Dicer mittels FCS	10
	1.5	.2.	Charakterisierung des Sulforhodamin B-bindenden RNA-Aptamers m	ittels
			FCS	11
2.	Mat	terialie	en und Methoden	12
	2.1.	Mate	rialien	12
	2.1	.1.	Technische Ausrüstung	12
	2.1	.2.	Chemikalien und Bioreagenzien	13
	2.1	.3.	Verbrauchsmaterial und Kits	14
	2.1	.4.	Lösungen und Puffer	15
	2.1	.5.	Nährmedien	20
	2.1	.6.	Fluoreszenzfarbstoffe	21
	2.1	.7.	Enzyme, Antikörper und DNA-Längenstandards	21
	2.1	.8.	Bakterienstämme und Vektoren	22
	2.1	.9.	Nukleotide und Oligonukleotide	22
	2.1	.10.	Software	24
	2.2.	Meth	oden	25
	2.2	.1.	Allgemeine Methoden	25
	2.2	.2.	Molekularbiologische Methoden	25
	2	2.2.2.1	. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
	2	2.2.2.2	. PCR-Amplifikation von DNA-Templat zur <i>in vitro</i> -Transkription	26
	2	2.2.2.3	. Native PAGE zur DNA-Trennung	27
	2	2.2.2.4	. Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen mittels Ethidiumbromid	28
	2	2.2.2.5	. In vitro-Transkription von Nukleinsäuren	28
	2	2.2.2.6	. Ethanolfällung	29
	2	2.2.2.7	. Denaturierende PAGE zur RNA-Trennung	29
	2	2.2.2.8	. Isolierung von RNA-Fragmenten aus präparativen Polyacrylamidgele	n.30
	2	2.2.2.9	. De- und Renaturierung von Aptamer-RNA	30
	2	2.2.2.1	0. Dicer- und RNase III-Enzym-Assay	30

	2.2.2.1	11.	Agarosegelelektrophorese zur DNA-Trennung	32
	2.2.2.1	12.	DNA-Restriktion und – Präparation	32
	2.2.2.1	13.	Ligation von DNA-Fragmenten	33
	2.2.2.1	14.	Herstellung kompetenter Zellen	33
	2.2.2.1	15.	Tranformation von kompetenten E. coli-Zellen und Amplifika	ation des
			Plasmids	33
	2.2.2.1	16.	DNA-Sequenzierung	34
	2.2.3.	Prot	einbiochemische Methoden	35
	2.2.3.1	1.	SDS-PAGE	35
	2.2.3.2	2.	Immunoblotting	35
	2.2.3.3	3.	Silberfärbung	
	2.2.4.	Zellt	biologische Methoden	37
	2.2.4.1	1.	Kultivierung von Säugetierzelllinien	37
	2.2.4.2	2.	Passagieren von Zellen	37
	2.2.4.3	3.	Transfektion von Zellen und Herstellung des Zellextraktes	
	2.2.5.	Fluo	reszenz-Korrelations-Spektroskopie	39
	2.2.5.1	1.	Fluoreszenz	39
	2.2.5.2	2.	Aufbau eines konfokalen Mikroskops	40
	2.2.5.3	3.	Theoretische Grundlagen	43
	2.2.5.4	4.	Versuchseinstellungen	49
	2.2.5.5	5.	Datenanalyse	52
	2.2.6.	Kon	fokale Laser-Rastermikroskopie	56
	2.2.7.	Dyna	amische Lichtstreuung	57
	2.2.8.	Roe	ntgenkleinwinkelstreuung	57
	2.2.9.	Krist	tallisation	60
3.	Ergebnis	sse, D	iskussion und Ausblick	61
3.	1. Char	rakter	isierung der RNA-spaltenden Aktivität von humanem Dicer	61
	3.1.1.	Kon	zeption des Enzym- <i>Assays</i>	61
	3.1.2.	Diffu	isionszeiten von Substrat, Produkt und ES-Komplex	63
	3.1.2.1	1.	Diffusionszeiten von Cy5-markiertem Substrat und Produkt	63
	3.1.2.2	2.	Identifizierung des ES-Komplexes mittels Multikomponente	enmodell-
			Analyse und Restriktionshemmung	66
	3.1.2.3	3.	Temperaturabhängigkeit der dsRNA-Diffusionszeiten	71
	3.1.2.4	4.	Vergleich von Cy5- und Atto647N-markierter dsRNA	72
	3.1.2.5	5.	Reinheit des rekombinanten Dicer	75
	3.1.2.6	6.	Diffusionszeiten von Atto647N-markiertem Substrat und Produkt	76
	3.1.2.7	7.	Gelelektrophoretische Analyse des Dicer-Produktes	79

3.1.2.8	3. Dicer-Spezifität der RNA-Spaltung und Produktmobilität81
3.1.2.9	9. Kinetik der RNA-Spaltung von Atto647N-markierter dsRNA und
	Diffusionszeit des ES-Komplexes85
3.1.3.	Dicer-Aktivität in Zellextrakten
3.1.3.	1. Klonierung des Dicer-Gens in einen Expressionsvektor
3.1.3.2	2. Überexpression des Dicer-Gens in Säugetierzellinien
3.1.3.3	3. Zellextraktpräparation91
3.1.3.4	4. Dicer-Aktivität in zytosolischen Zellextrakten von Säugetierzellen nach
	Überproduktion von Dicer95
3.1.3.	5. Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration
3.1.3.0	Detektion des ES-Komplexes   106
3.1.3.	7. Katalytische Konstante und Spezifitätskonstante
3.1.4.	In vivo-Anwendung des Dicer-Assays113
3.1.5.	Zusammenfassende Darstellung der Analyse der Dicer-katalysierten
	RNA-Spaltung117
3.1.5.	1. Diffusionszeiten von Substrat und Produkt117
3.1.5.2	2. Diffusionszeit des ES-Komplexes118
3.1.5.3	3. Spezifität des Dicer-Assays118
3.1.5.4	4. Kinetische Charakterisierung von humanem Dicer in Zellextrakten119
3.1.5.	5. Was konnte mittels des Enzym-Assays, der auf Diffusion und
	Multikomponentenmodell-Analyse basiert, erreicht werden?119
3.1.6.	Ausblick zur Analyse der durch Dicer katalysierten RNA-Spaltung120
3.2. Cha	rakterisierung des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers122
3.2.1.	Detektion des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes durch Diffusions-
	zeitenanalyse122
3.2.2.	Tendenz des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes zur Spinumkehr130
3.2.3.	Detektion des SRB2m-PBV-Komplexes durch die molekulare Zählrate132
3.2.4.	Tendenz des PBV-SRB2m-Komplexes zur Spinumkehr138
3.2.5.	Hydrodynamische Radien von SRB2m und den SRB2m-Fluorophor-
	Komplexen142
3.2.6.	Trägheitsradien, Oligomerisierungsgrad und Konformation von SRB2m und
	der SRB2m-Fluorophor-Komplexe145
3.2.7.	Kristallisation des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers148
3.2.8.	Affinität von Fusionskonstrukten zu Sulforhodamin B150
3.2.9.	Spezifität der Fluorophor-SRB2m-Bindung in Zellextrakten150
3.2.10.	In vivo-Anwendung von Sulforhodamin B und PBV154
3.2.11.	Vergleich des Sulforhodamin B-SRB2m und PBV-SRB2m-Komplexes156

	3.2.12.	Zusa	ammenfassende Darste	ellung zum Sulforhod	amin E	3 und PBV	binde	nden
		RNA	A-Aptamer					159
	3.2.12	2.1.	Die Detektion des Sulf	orhodamin B-SRB2m	-Kompl	exes mittel	s FCS	159
	3.2.12	2.2.	Die Detektion des PBV	-SRB2m-Komplexes	mittels	FCS		160
	3.2.12	2.3.	Strukturbiochemische	Charakterisierung	von	SRB2m	und	der
			Fluorophor-SRB2m-Ko	mplexe				161
	3.2.13.	Aus	blick zum Sulforhodami	n B und PBV bindend	en Apta	amer		162
4.	Literatur	verze	ichnis					163

# II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schema der humanen siRNA- und miRNA-vermittelten
	Genexpressionskontrolle 2
Abbildung 2	Domänenstruktur der RNase III-Familie4
Abbildung 3	RNA-Fluoreszenzmarkierung7
Abbildung 4	Sulforhodamin B und PBV
Abbildung 5	Jablonski-Diagramm
Abbildung 6	Aufbau eines konfokalen Mikroskops41
Abbildung 7	Das konfokale Detektionsvolumen42
Abbildung 8	Schematische Darstellung von FCS-Messungen43
Abbildung 9	Analyse von photodynamischen Prozessen mittels einer
	Autokorrelationsfunktion44
Abbildung 10	Schematische Darstellung von FCCS-Messungen48
Abbildung 11	Crosstalk in FCCS-Messungen51
Abbildung 12	RKWS-Messungen58
Abbildung 13	Kristallisation im , <i>hanging drop</i> '60
Abbildung 14	Schema des Dicer-Assays und Substratsequenz61
Abbildung 15	Prinzip des auf Diffusionszeiten und Fitting-Modellen basierten Enzym-
	Assays62
Abbildung 16	FCS-Kinetik von Cyanin 5-markierter dsRNA ohne und nach Zugabe von
	Dicer64
Abbildung 17	Autokorrelationsfunktionen von Cy5-markierter dsRNA und von dsRNA
	nach vollständiger Restriktion durch Dicer65
Abbildung 18	Diffusionszeiten einer dritten Diffusionsspezies67
Abbildung 19	Detektion eines höhermolekularen Komplexes mit Cy5-markierter
	dsRNA nach Zugabe von Dicer und Ersatz von MgCl <sub>2</sub> durch CaCl <sub>2</sub> 69
Abbildung 20	FCS-Kinetik von Atto647N-markierter dsRNA nach Zugabe von Dicer .74
Abbildung 21	SDS-PAGE von rekombinantem Dicer76
Abbildung 22	Autokorrelationsfunktionen von Atto647N-markierter dsRNA und von
	dsRNA nach vollständiger Restriktion durch Dicer77
Abbildung 23	Gelelektrophoretische Trennung der Dicer-Produkte
Abbildung 24	Gelelektrophoretische Tennung von Atto647N-markierter RNA80
Abbildung 25	Autokorrelationsfunktion von Atto647N-markierter ssRNA vor und nach
	Inkubation mit Dicer82
Abbildung 26	Autokorrelationsfunktionen von RNA vor und nach Inkubation Zugabe
	von Dicer oder RNase III83

Abbildung 27	FCS-Kinetik von Atto647N-markierter RNA ohne und nach Zugabe von
	Dicer
Abbildung 28	Histogramm der Diffusionszeiten der dritten Diffusionsspezies
Abbildung 29	Detektion eines höhermolekularen Komplexes mit Atto647N-markierter
	dsRNA nach Zugabe von CaCl <sub>2</sub> und Dicer88
Abbildung 30	Klonierung von Dicer_pcDNA3.1(+)89
Abbildung 31	Aminosäuresequenz-Alignment der Sequenzierung von
	Dicer_pcDNA3.1(+) mit der Dicer-Sequenz90
Abbildung 32	Immunoblot zum Nachweis der Überexpression des Dicer-Gens91
Abbildung 33	Präparation von zytosolischem Zellextrakt92
Abbildung 34	Restriktion von EGFP_Dicer_pcDNA3.1(+)93
Abbildung 35	Autokorrelationsfunktionen von EGFP und von Zellextrakten nach
	Transfektion mit EGFP_Dicer_pcDNA3.1(+)94
Abbildung 36	Diffusionszeit des Dicer-Substrates in HEK293-Zellextrakten96
Abbildung 37	Produktbildung und Substratverbrauch in HEK293-Zellextrakten97
Abbildung 38	Kontrollmessungen in Zellextrakten zur Abhängigkeit der Aktivität von
	der Substratkonzentration100
Abbildung 39	Diffusionszeiten und Zählrate in Zellextrakten102
Abbildung 40	Dicer-Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration104
Abbildung 41	Asymmetrische Verteilung der ES-Komplex-Konzentrationen106
Abbildung 42	Substratkonzentrationsabhängigkeit der ES-Komplex-Konzentration .108
Abbildung 43	Zeitabhängigkeit der ES-Komplex-Konzentrationen110
Abbildung 44	kLRM-Aufnahmen von HEK293-Zellen vor und nach Mikroinjektion des
	Dicer-Substrates114
Abbildung 45	FCS-Messungen in vivo nach Mikroinjektion des Dicer-Substrates115
Abbildung 46	Herstellung der SRB2m- und FB1-RNA123
Abbildung 47	Autokorrelationsfunktion von Sulforhodamin B124
Abbildung 48	Titrationsexperiment von Sulforhodamin B und SRB2m mittels FCS125
Abbildung 49	Fluoreszenzemissionsspektren von Sulforhodamin B127
Abbildung 50	Titrationsexperiment von Sulforhodamin B und SRB2m mittels FCS bei
	geringerer Laserstärke und Messzeit128
Abbildung 51	Abhängigkeit der Triplett-Singulett-Wechselwirkung des Sulforhodamin
	B-SRB2m-Komplexes von der Laserenergie131
Abbildung 52	Zählraten-Zeitverlauf von PBV132
Abbildung 53	Autokorrelationsfunktion des PBV-SRB2m-Komplexes133
Abbildung 54	Titrationsexperiment von PBV und SRB2m2 mittels FCS136

Abbildung 55	Abhängigkeit der Triplett-Singulett-Wechselwirkung des PBV-SRB2	m-
	Komplexes von der Laserenergie	139
Abbildung 56	Abhängigkeit der Triplett-Singulett-Wechselwirkung von der KCI-	
	Konzentration	141
Abbildung 57	Dynamische Lichtstreuung durch SRB2m-RNA	142
Abbildung 58	Sekundärstrukturvorhersage des SRB2m-Aptamers	143
Abbildung 59	Analyse der Dimerisierung von SRB2m mittels FCCS	144
Abbildung 60	Strukturelle Charakterisierung von SRB2m mittels RKWS	147
Abbildung 61	Oligomerisierungszustand von SRB2m	147
Abbildung 62	SRB2m-Kristalle	149
Abbildung 63	Sulforhodamin B und PBV in Zellextrakten	151
Abbildung 64	kLRM-Aufnahmen und FCS-Messungen von Sulforhodamin B in viv	′o154
Abbildung 65	kLRM-Aufnahmen von PBV <i>in vivo</i>	155
Abbildung 66	kLRM-Aufnahmen von PBV in vivo-unspezifische Bindung	156

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Oligonukleotidsequenzen23
Tabelle 2	Typische Parameter der FCS-Messungen von Standardfluorophoren46
Tabelle 3	Technische Einstellungen in FCS-Experimenten50
Tabelle 4	Verhältnis markierter zu unmarkierter dsRNA67
Tabelle 5	FCS-Parameter von Cy5-markiertem Substrat vor und nach Zugabe von
	Dicer unter Verwendung von MgCl <sub>2</sub> oder CaCl <sub>2</sub> 70
Tabelle 6	Diffusionszeiten von dsRNA bei verschiedenen Temperaturen71
Tabelle 7	Spektrale Eigenschaften von Cy5 und Atto647N72
Tabelle 8	FCS-Parameter von Cy5- und Atto647N-markierter dsRNA73
Tabelle 9	FCS-Parameter von Cy5- und Atto647N-markierter ssRNA75
Tabelle 10	Diffusionszeiten von Atto647N-markierter RNA76
Tabelle 11	Parameter der FCS-Messungen mit rekombinantem Dicer und dsRNA78
Tabelle 12	Diffusionszeiten von Atto647N-markierter RNA ohne und nach
	Inkubation mit Dicer oder RNase III81
Tabelle 13	FCS-Parameter von Zellextrakten nach Transfektion mit EGFP_Dicer
	pcDNA3.1(+)93
Tabelle 14	FCS-Parameter in HEK293-Zellextrakten98
Tabelle 15	Dicer-Aktivität in Extrakten von HEK293- und HeLa-Zellen99
Tabelle 16	FCS-Parameter zur Substratabhängigkeit der Enzymaktivität101
Tabelle 17	[S] <sub>1/2</sub> -Wert und Hill-Koeffizient von humanem Dicer in
	HEK293-Extrakten109
Tabelle 18	$k_{cat}$ und die Spezifitätskonstante $k_{sp}$ von humanem Dicer in
	HEK293-Extrakten111
Tabelle 19	FCS-Parameter in vivo113
Tabelle 20	FCS-Parameter von Sulforhodamin B126
Tabelle 21	Spektrale Eigenschaften von Sulforhodamin B und PBV132
Tabelle 22	FCS-Parameter von PBV134
Tabelle 23	Die molekulare Größe der SRB2m-RNA145
Tabelle 24	FCS-Parameter von Sulforhodamin B in Zellextrakten152
Tabelle 25	FCS-Parameter von PBV in Zellextrakten153

# IV. Abkürzungsverzeichnis

Englischsprachige Begriffe wurden kursiv geschrieben.

А	Ampère
Abb.	Abbildung
Ago2	Argonaute 2
AOTF	akustisch-optisch regulierbarer Filter (acousto-optic tunable filter)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BP	Bandpass-Emissionsfilterbereich (bandpass)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovines serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
C	Grad Celsius
ca.	circa
CAIP	Alkalische Phosphatase von Kälbern (calf intestine alkaline phosphatase)
cm	Zentimeter
Cy5	Cyanine 5
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
D	Diffusionskoeffizient
D <sub>max</sub>	maximaler Partikeldurchmesser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion (Absorption)
3	Extinktionskoeffizient
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EDTA	Ethylendiaminotetra-Essigsäure
et al.	und andere
FB1	Fluoreszein bindendes RNA-Aptamer
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (fluorescence correlation
	spectroscopy)
FCCS	Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (fluorescence crosscorrelation
	spectroscopy)
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3'Phosphat-Dehydrogenase
G(τ)	Autokorrelationsfunktion
G4-min	minimiertes Farnesyl bindendes RNA-Aptamer
h	Stunde
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie (human embryonic kidney cells)
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1Piperazinethansulfonsäure
His-Tag	aus Histidin bestehende Aminosäurekette
K (b, Da)	Kilo (-basen, Dalton): Faktor 1000
L	Liter
LP	Langpass-Emissionsfilterbereich (longpass)
Lsg.	Lösung
Μ	molar [mol/l]
k	Boltzmann-Konstante
Kap.	Kapitel
k <sub>cat</sub>	katalytische Konstante
KCI	Kaliumchlorid
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
$KH_2PO_4$	Kaliumhydrogenphosphat
kLRM	konfokales Laser-Rastermikroskop
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KOAc	Kaliumacetat
k <sub>sp</sub>	Spezifitätskonstante
m	molekulare Masse
m (m, M)	Milli (-meter, -molar): Faktor 1/1.000
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgOAc	Magnesiumacetat
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
µ (m, M)	Mikro (-meter, -molar): Faktor 1/10 <sup>6</sup>
min	Minute
miRNA	microRNA
MPD	2- Methyl 2,4 Pentandiol
Ν	Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen
n(L, s)	Nano(-liter, -sekunde): Faktor 1/10 <sup>9</sup>
η	Viskosität
N <sub>A</sub>	Avogadro-Konstante

NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
$NaH_2PO_4$	Natriumhydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium (Chlorid)
NFT	Nebenfarbteiler
$(NH_4)_2SO_4$	Diammoniumsulfat
nt	Nukleotid
$\eta_x$	molekulare Zählrate von x
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille
P-bodies	processing bodies
PBS	phosphate buffered saline
PBV	Patent Blau V
Pc	Kompensationsdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pi	Injektionsdruck
Pf	Vorwärts-Primer (primer forward)
рН	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
Pr	Rückwärts- <i>Primer (primer reverse</i> )
p(r)	Abstandsverteilungsfunktion
ρ	Dichte
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA interference
RKWS	Roentgenkleinwinkelstreuung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
r <sub>o</sub>	radialer Abstand des Maximums der Signalintensität zu 1/e <sup>2</sup> des Maximums im
	konfokalen Detektionsvolumen
r <sub>G</sub>	Trägheitsradius
r <sub>H</sub>	hydrodynamischer Radius
R6G	Rhodamin-6-Green
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde

S	Strukturparameter
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
siRNA	kleine hemmende RNA (small inhibiting RNA)
[S] <sub>1/2</sub>	Substratkonzentration bei halbmaximaler Enzymaktivität
SDS	sodiumdodecylsulfate
SRB2m	minmiertes Sulforhodamin B bindendes RNA-Aptamer
т	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	tris buffered saline
ТСА	Trichloressigsäure
$ au_{Diff}$	Diffusionszeit
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
ТМ	Transfektionsmedium
TRBP	human immunodeficiency virus (HIV)-1 transactivating response (TAR) RNA-
	binding protein
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Τ <sub>T</sub>	Triplettanteil
$ au_{T}$	Triplettzeit
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Units (µmol/min)
u. a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
V <sub>eff</sub>	effektives Detektionsvolumen
Vp	ausgeschlossenes Volumen
VS	gegen (versus)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
Z <sub>0</sub>	axialer Abstand des Maximums der Signalintensität zu 1/e <sup>2</sup> des Maximums im
	konfokalen Detektionsvolumen
z. B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# 1. Einleitung

# 1.1. Posttranskriptionale und translationale Regulation der Genexpression durch siRNA und miRNA

Ribonukleinsäuren (RNA) heben sich durch ihre Fähigkeit hervor, sowohl Informationen speichern als auch chemische Reaktionen katalysieren zu können. Zahlreiche aus RNA bestehende Enzyme, sogenannte Ribozyme, wurden bislang entdeckt, von denen das bekannteste das Ribosom ist [1-3]. Die Hypothese, RNA könnte in der Evolution Vorläufer von DNA und Proteinen gewesen sein, wurde aufgrund der vielfältigen Eigenschaften von RNA aufgestellt [4]. Auch Allosterie wurde in prokaryotischen, auf RNA basierten molekularen Schaltern, sogenannten Riboswitches, gefunden [5]. Vor etwa 10 Jahren wurde in Eukaryoten eine weitere Funktion von RNA entdeckt, die zunächst nur bei Proteinen bekannt war: die posttranskriptionale Regulation der Genexpression, auch RNA interference (RNAi) genannt [6, 7]. Hierbei spielen 19 bis 25 Basenpaare (bp) enthaltende RNA-Moleküle eine Rolle, sogenannte small inhibitory RNAs (siRNAs) [6, 8, 9]. Sie können mRNA sequenzspezifisch komplementär binden und zu deren Abbau führen. siRNA wird enzymatisch aus doppelsträngiger RNA (dsRNA) prozessiert, die entweder aus Transkripten von endogenen Allelen und deren komplementären antisense Transkripten entsteht oder von Viren abstammen kann [10]. Durch RNAi können Genexpression kontrolliert und virale Infektionen abgewehrt werden. Die Regulation der Genexpression geschieht in der Regel über den Abbau von mRNA und führt entsprechend zu einer verringerten Expression des Gens [11]. Es wurde aber auch eine RNAi-vermittelte Erhöhung der Genexpression beobachtet [12]. Des Weiteren wurden RNAi-vermittelte Veränderungen der Heterochromatinstruktur in Hefe und Wirbeltieren gefunden [13-15].

Durch das RNase III-verwandte zytosolische Enzym Dicer wird dsRNA in etwa 21 bp Fragmente enzymatisch gespalten (**Abb. 1**) [16-18]. Der RNA-induzierte *Silencing* Komplex (RISC) wird aus Dicer, der aus etwa 21 bp bestehenden siRNA, dem RNase H verwandten Enzym Argonaute 2 (Ago2) und weiteren Komponenten gebildet [19]. Die aus etwa 21 bp bestehende doppelsträngige RNA wird in einem noch unbekannten Mechanismus entwunden. Die einzelsträngige siRNA mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende bleibt an Ago2 als sogenannter *guide strand* gebunden [20]. Dieser bindet vollständig über Watson-Crick-Basenpaarung an die komplementäre mRNA, die mit Hilfe von Ago2 enzymatisch abgebaut wird [11]. Mittels Hochdurchsatz-*Screenings* wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Expression durch RNAi unterdrückt wird [21-23].



Abbildung 1 Schema der humanen siRNA- und miRNA-vermittelten Genexpressionskontrolle.

Im Zytosol spaltet Dicer dsRNA, in 21 bp dsRNA-Fragmente, sogenannte siRNA. Die 21 bp dsRNA-Fragmente werden im RISC (hellgraue ellipsoide Fläche) entwunden. mRNA, die vollständig komplementär zu der siRNA ist, wird durch RISC in etwa 9 Nukleotide (nt) enthaltende Fragmente gespalten. Im Zellkern (gestrichelte Linie) spaltet Drosha (Ellipse) komplexe schleifenenthaltende pri-microRNA in etwa 70 bp schleifenenthaltende pre-microRNA. Die Pre-microRNA wird aus dem Zellkern in das Zytosol exportiert und dort von Dicer (gestrichelt umrandeter Kreis) geschnitten. Es entstehen 21 bp dsRNA-Fragmente, die als microRNA (21 nt) die Genexpression kontrollieren. Aufgrund von unvollständiger Bindung von microRNA an mRNA wird die mRNA von RISC nicht geschnitten sondern in *P-bodies* (Ellipse mit Strich-Punkt-Umrandung) gespeichert. In *P-bodies* kann es zu translationaler Repression oder exonukleolytischem Abbau kommen.

Neben dem siRNA-Weg existiert der durch microRNA gesteuerte Weg der Genexpressionskontrolle [24-26]. MicroRNAs (miRNAs) sind etwa 21 Nukleotide (nt) enthaltende RNAs, die mRNA meist in der 3'-untranslatierten Region des Gens komplementär binden. Die Nukleotide 2 bis 8 der miRNA sind zur mRNA komplementär und die Nukleotide 10 und 11 meist nicht komplementär.

Die Expression von miRNAs wurde sowohl spezifisch für verschiedene Gewebe und Entwicklungsstadien, als auch im Zusammenhang mit Krankheiten gefunden [27, 28]. Mehr als 1.000 humane miRNAs sind bekannt, die mehr als 30 % aller Gene regulieren sollen.

Im Nukleus werden zunächst durch das RNase III verwandte Enzym Drosha aus Schleifenstrukturen enthaltenden pri-miRNAs etwa 70 bp lange pre-miRNAs gebildet [29, 30]. Pre-miRNAs werden von Dicer in 19 bis 25 bp enthaltende miRNAs prozessiert [31-34]. Der gebildete humane miRNA-RISC kann hAgo2 - 4 enthalten, wobei nur hAgo2 eine RNA

spaltende Funktion besitzt. Diese wird aufgrund der partiellen Komplementarität von miRNA und mRNA jedoch nicht ausgeführt. miRNA-regulierte mRNA sammelt sich in zytosolischen Multiproteinkomplexen, *processing bodies* (*P-bodies*), an, wo sie abgebaut oder zwischengelagert wird. In *P-bodies* sind neben RNA abbauenden Enzymen, wie z.B. Exonukleasen, auch translationshemmende Proteine zu finden [26]. Durch miRNA kann außerdem die Heterochromatinstruktur beeinflusst werden [35].

### **1.2. Humaner Dicer**

Die RNase III-Familie, zu der Dicer gehört, besteht aus drei Unterfamilien: Klasse I-Enzyme, die in Bakterien und Hefen vorkommen, enthalten eine RNase III-Domäne und eine dsRNA bindende Domäne (**Abb. 2**) [10]. Klasse II- und III-Enzyme enthalten zwei RNase III katalytische Domänen. Charakteristisch für Klasse III-Enzyme ist eine ATPase/Helikase- und eine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille)-Domäne. Die prokaryotische RNase III ist enzymatisch sehr gut charakterisiert [36-40]. Das Enzym schneidet spezifisch dsRNA [36, 37]. Dabei wird ein intermolekulares Dimer gebildet, um zwei RNA Einzelstränge gleichzeitig in 10 bis 18 bp enthaltende Fragmente zu prozessieren.

Dicer ist ein Klasse III-Enzym der RNase III-Familie. Es kommt mit wenigen Ausnahmen, z. B. Leishmania major, in Eukaryoten vor [41]. Das Dicer-Gen ist essentiell für die Entwicklung von Maus-Embryos [42]. Es ist sowohl an der Biogenese der siRNAs als auch der miRNAs beteiligt [31, 43]. Die Struktur des Heterochromatins in Wirbeltieren kann durch Dicer beeinflusst werden [13]. Das humane Enzym Dicer ist etwa 220 Kilodalton (kDa) schwer. Es besteht aus zwei RNase III-Domänen, einer dsRNA bindenden Domäne, einer PAZ-Domäne, einer Domäne von unbekannter Funktion (DUF283) und einer durch Sequenzanalyse der ATPase/Helikase-Funktion zugeordneten Domäne (Abb. 2). Obwohl neben der RNA-Spaltung weitere katalytische Funktionen aufgrund von Sequenzvergleichen vermutet werden, wie die Helikase-Funktion, wurde bisher ausschließlich die RNase-Funktion nachgewiesen und analysiert. Von den Enden voranschreitend wird die dsRNA sequenzunabhängig in 19 bis 23 bp enthaltende Fragmente gespalten, wobei 3'-OH- und 5'-Phosphat-Termini sowie Überhänge am 3'-Ende aus zwei Nukleotiden gebildet werden [8, 16, 43, 44]. Durch die PAZ-Domäne von Dicer werden diese bevorzugt gebunden, was das effiziente von den Termini ausgehende Prozessieren der dsRNA und das Erkennen von premiRNAs unterstützt [44-47]. Die Dicer-Aktivität ist stark vermindert, wenn die Enden des Substrates verschlossen sind [48]. Die Spaltungseffizienz wird außerdem von der Basenzusammensetzung des 3'-Überhanges beeinflusst [49]. Die terminale Base des Überhanges kann die Dicer-Aktivität in der Reihenfolge C < U = G < A und in der vorletzten Base mit A < U = G < C erhöhen. In einer Kristallstrukturanalyse von *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) Dicer, das weder eine dsRNA bindende Domäne noch eine DUF283- oder ATPase/Helikase-Domäne enthält, wurde der Abstand der PAZ-Domäne vom katalytischen Zentrum als molekularer Maßstab identifiziert, der die Fragmentgröße bestimmt [50]. Ein enzymatischer Mechanismus der nukleophilen Substitution, an dem zwei Metallionen beteiligt sind, wird sowohl für RNase III als auch für Dicer vorgeschlagen [38, 40, 50].



#### Abbildung 2 Domänenstruktur der RNase III-Familie.

Drei RNase III-Klassen sind abgebildet (modifiziert nach [10]). Die PAZ-Domäne in *D. melanogaster* Dicer-2 enthält Mutationen in mehreren Resten, die für das Binden von dsRNA benötigt werden und ist u.U. nicht funktionsfähig.

Beide RNA-Stränge werden durch Dicer gleichzeitig gespalten, indem die RNase III-Domänen ein intramolekulares Dimer, ein Pseudodimer, bilden [51]. Für humanen Dicer wurden eine Magnesium-Ionen-Abhängigkeit und eine ATP-Unabhängigkeit der Aktivität sowie eine Hemmung durch hohe Kaliumchlorid (KCI)- und Natriumchlorid (NaCI)-Konzentrationen festgestellt [18, 44]. Optimale Spaltungsbedingungen sind gegeben durch 1 bis 5 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), pH 6,5 bis 6,9 sowie 50 bis 100 mM NaCI bei einer Temperatur von 37 ℃. *E. coli* RNase III und *G. intestinalis* Dicer sowie humaner Dicer wurden in reiner Form enzymkinetisch charakterisiert [38, 48, 52]. Das reine humane Enzym Dicer weist eine sehr geringe Aktivität auf [44, 52].

*Drosophila melanogaster* Dicer kommt in zwei Formen vor: Dcr2 ist beteiligt in RNAi und Dcr1 an der microRNA Prozessierung [53]. Für *Drosophila melanogaster* Dicer wurde eine Interaktion mit RISC nachgewiesen [53-56]. Später wurde diese Interaktion auch für humanen Dicer gezeigt [57, 58].

HAgo2, ein Teil des RISC, wurde mit Dicer koimmunopräzipitiert [59]. Das Enzym hemmt die Dicer-Aktivität *in vitro*. Das Protein TRBP (*human immunodeficiency virus* (HIV)-1 *transactivating response* (TAR) *RNA-binding protein*) ist notwendig, um hAgo2 zum Dicer siRNA Komplex zu rekrutieren [60]. TRBP wurde mit Dicer in humanen Zellextrakten koimmunopräzipitiert [60, 61]. TRBP fördert das effiziente Prozessieren von pre-miRNA. Es erhöht zudem die katalytische Aktivität von reinem humanem Dicer [52]. Der Antagonist von TRBP, PACT, interagiert mit der N-terminalen Region von Dicer [62]. Ein Fehlen von PACT verursacht ein Ansammeln von reifen miRNAs und verringert den durch miRNA vermittelten Effekt auf die Genexpression. TRBP und PACT interagieren direkt und können als Dimer mit Dicer assoziiert sein [63]. Sie erhöhen die Produktion von siRNAs durch Dicer.

### 1.3. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Eine weit verbreitete Alternative zur Markierung von Biomolekülen durch Isotope ist die Fluoreszenzmarkierung. Sie erlaubt einen unkomplizierteren Umgang mit der Probe, da weniger Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz der Gesundheit notwendig sind. Zusätzlich ist eine Analyse von Prozessen in lebenden Zellen möglich. Hierfür werden fluoreszenzmarkierte Moleküle in diese eingebracht oder fluoreszierende Proteine von der Zelle rekombinant hergestellt werden [64]. Die Detektion von einzelnen Molekülen wurde erleichtert durch die Weiterentwicklung von stabilen Lasern und Detektoren mit hoher Sensitivität und Taktgeschwindigkeit. Einzelmolekülmethoden zeichnen sich durch einen geringen Probenbedarf aus. Zudem kann das Verringern der Fluoreszenzintensität durch hohe Fluorophorkonzentrationen, das sogenannte Selbst-*Quenchen*, umgangen werden. Die Detektion von geringsten Stoffmengen wurde so ermöglicht, z.B. in der medizinischen Diagnostik oder in der Biotechnologie [65, 66]. Funktionsbestimmende zeitabhängige Konformationsänderungen einzelner Enzyme, die im Durchschnittswert vieler Moleküle verborgen bleiben, können charakterisiert werden [67, 68].

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) ist eine Methode, die Einzelmolekülverhalten in Lösung statistisch erfasst (Kap. 2.2.5.) [69-71]. Mittels FCS werden molekulare Mobilitäten gemessen. Diffusionskoeffizienten im Bereich von 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-9</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> können bestimmt werden, ein Bereich der die Diffusion von Molekülen mit einem Molekulargewicht von etwa einem Kilodalton bis mehreren Megadalton messbar macht. FCS ist deshalb sehr gut für die Charakterisierung der Dynamiken von Biomolekülen geeignet.

Aufgrund der Abhängigkeit der Mobiliät vom Molekulargewicht wurde eine Vielzahl molekularer Wechselwirkungen, die eine Änderung der Mobilität der fluoreszenzmarkierten Spezies bewirkten, gefunden [69, 72, 73].

In verschiedenen methodischen Ansätzen wurden Enzymaktivitäten geringster Enzymmengen quantifiziert [66, 74-76]. Die Aktivität von verschiedenen DNA-Restriktionsenzymen wurde gemessen, indem das Erhöhen der Anzahl der fluoreszierenden Partikel nach Restriktion einer DNA gemessen wurde, die fluoreszenzmarkierte dUTPs enthielt [74]. Die Aktivität von bis zu 0,05 fM RNase T1 wurde in diesem Labor in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Rudolf Rigler an der Technischen Königlichen Universität in Stockholm nachgewiesen, indem das fluoreszenzmarkierte RNA-Substrat immobilisiert und das frei diffundierende Produkt durch FCS identifiziert wurde [76]. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) wurde das Spalten von komplementären DNA-Einzelsträngen, die terminal mit *Rhodamin 6 Green* (R6G) und *Cyanine* 5 (Cy5) markiert waren, durch EcoRI bestimmt [75]. Dieser *assay* wurde für ein Hochdurchsatzverfahren weiterentwickelt [66]. In lebenden Zellen wurde mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (*fluorescence crosscorrelation spectroscopy*, FCCS) die Aktivität von Caspase III gemessen [77].

### 1.4. Fluorophor bindende RNA-Aptamere

Da Nukleinsäuren anders als einige Proteine nicht selbst außerhalb des UV-Bereiches fluoreszieren, ist es notwendig, diese direkt oder indirekt zu markieren. RNA kann kostenintensiv chemisch mit Fluorophoren verbunden werden. Besonders für *in vivo*-Studien sind andere Ansätze erwünscht, die es erlauben, native oder rekombinante RNA zu markieren. Für das indirekte Markieren gibt es zwei Hauptansatzpunkte:

- Kurze komplementäre fluoreszenzmarkierte RNA- oder DNA-Moleküle ändern nach Bindung der Zielsequenz ihre Fluoreszenzeigenschaften (Abb. 3a) [78, 79]. Diese sogenannten *Molecular Beacons* können auch anstelle eines Fluorophores ein Guanosin enthalten [80]. Sie sind geeignet, um endogene oder rekombinante RNA nachzuweisen.
- Das Hüllprotein des λ-Phagen MS2 wird als Fusionskonstrukt mit einem fluoreszierenden Protein exprimiert [81, 82]. Eine RNA, die an MS2-HP bindet, wird in einem gentechnologischen Fusionskonstrukt mit einer zweiten RNA kotranskribiert (Abb. 3b). Die fluoreszierende Komponente interagiert über das MS2-Hüllprotein (MS2-HP) mit dem RNA-Fusionskonstrukt und markiert dieses indirekt. Auch endogene mRNA konnte inzwischen durch genomische Integration der MS2-HP-

Bindungsdomäne nachgewiesen werden [83]. Sowohl die MS2-HP bindende Domäne als auch das MS2-HP-GFP-Fusionskonstrukt werden *in vivo* als Multimere eingesetzt, um die Signalintensität zu erhöhen.



#### Abbildung 3 RNA-Fluoreszenzmarkierung

Schematische Darstellung von Methoden zur indirekten Fluoreszenzmarkierung von RNA. a) Ein *Molecular Beacon*, d.h. eine Haarnadelstruktur, das an den Termini ein Fluorophor (grün umrandeter Stern) bzw. ein Quencher-Molekül (schwarzer Stern) trägt, die sich *quenchen*, wird zur indirekten Markierung verwendet. Nach Bindung an eine komplementäre RNA-Sequenz wird die Haarnadelstruktur linearisiert und die Fluorophore werden räumlich voneinander getrennt. Das *Quenchen* wird beendet und das Fluorophor leuchtet (grüner Stern). b) Eine MS2-HP bindende RNA-Domäne (Dreiecke) ist gentechnologisch mit einer RNA fusioniert, die markiert werden soll. Diese interagiert mit der MS2-HP-Domäne (Rechteck), das gentechnologisch mit GFP fusioniert ist (grüne Elipse). c) Ein Fluorophor bindendes RNA-Aptamer (Dreiecke) ist gentechnologisch mit einer zu markierenden RNA fusioniert. Das RNA-Aptamer bindet ein Fluorophor (grüner Stern) und wird dadurch selbst fluoreszierend.

Eine Abwandlung des 2. Ansatzes basiert auf dem Aufspalten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in zwei Fragmente, die jeweils gentechnologisch fusioniert sind mit dem MS2- HP bzw. einem anderen Protein, das von einer bestimmten RNA (RNA2) erkannt wird [84]. Durch Interaktion der benachbarten MS2-HP bindenden Domäne und RNA2 mit den jeweiligen RNA bindenden Protein-Sequenzen, wurden die GFP-Fragmente räumlich angenähert und die Fluoreszenzeigenschaften des vollständigen Proteins wieder hergestellt.

Einleitung

Weil die Fragmente räumlich separiert nicht fluoreszieren, ist das Hintergrund-Signal in diesem methodischen Ansatz stark vermindert. Neben der evolutiv selektierten MS2-HP bindenden RNA gibt es eine Klasse von künstlich selektierten RNA's, die durch ihre dreidimensionale Struktur Zielmoleküle, wie z.B. Fluorophore, binden können, sogenannte Aptamere. Diese werden *in vitro* durch gerichtete Evolution (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, SELEX) selektiert [85, 86]. Fluorophor bindende RNA-Aptamere wurden als Alternative zum MS2-GFP-Ansatz selektiert [85]. Die RNA-Aptamere würden nach Bindung eines Fluorophors indirekt eine gentechnologisch fusionierte zweite RNA fluoreszenzmarkieren (**Abb. 3c**).

Die RNA-Aptamere und Fluorophore weisen mit 10 bis 20 kDa bzw. weniger als 1 kDa ein niedrigeres Molekulargewicht auf als der oben dargestellte Ansatz 2 und eignen sich daher zur Charakterisierung kleiner RNA-Fragmente. Für eine *in vivo*-Anwendung ist die Fluoreszenzmarkierung durch membrangängige Farbstoffe vorteilhaft, weil sie, im Gegensatz zu *Molecular Beacons* und dem MS2-GFP-Ansatz, eine reversible RNA-Markierung zulässt.

Fluorophore haben im Vergleich zu fluoreszierenden Proteinen zusätzlich den Vorteil, *in vivo* sofort ohne eine Reifungszeit einsetzbar zu sein. Diese Aspekte finden sich analog in einer Weiterentwicklung der Proteinmarkierung mit Tetracystein wieder [87, 88]. Die Tetracystein-Markierung von Proteinen basiert auf einem Fusionskonstrukt aus Protein und sechs Aminosäuren, die sich aus vier Cysteinen (C) und zwei beliebigen Aminosäuren (X) zusammensetzen mit der Sequenz CCXXCC. Dieses Aminosäuremotif interagiert mit einem Fluoreszeinderivat und erhöht dessen Quantenausbeute erheblich.

Es wurden RNA-Aptamere gegen Malachitgrün, Sulforhodamin B und andere Fluorophore selektiert [85, 89, 90]. Die Fluoreszenzemission dieser Aptamer-Fluorophor-Komplexe wurden *in vitro* bereits in mehreren Studien untersucht [89-92]. Das Malachitgrün bindende RNA-Aptamer zeigte eine 2.000-fach erhöhte Fluoreszenzintensität nach Bindung an die Aptamer-RNA [91]. Der RNA-Fluorophor-Komplex erwies sich jedoch als ungeeignet für die Anregung durch Laserlicht [90]. Die Eignung von Sulforhodamin B für FCS-Experimente wurde nachgewiesen, jedoch ohne den RNA-Fluorophor-Komplex zu analysieren (**Abb. 4**) [93].

Das Sulforhodamin B bindende RNA-Aptamer wurde durch SELEX selektiert und die Dissoziationskonstante der minimierten Form mittels Affinitätschromatographie und Fluoreszenzanisotropie mit 70 bzw. 360 nM bestimmt [89]. Die chemische Struktur von Sulforhodamin B ist in **Abbildung 4** zu sehen. Nach Analyse des Selektionspools wurden in den konservierten Schleifenregionen im Fall einer selektierten RNA einzelne Basen identifiziert, die die Affinität des minimierten Aptamers an Sulforhodamin B zusätzlich

erhöhten. Vorrausetzung für die Bindung sind sowohl das planare Ringsystem des Sulforhodamin als auch die negativ geladenen Sulfonat-Gruppen.



#### Abbildung 4 Sulforhodamin B und PBV.

Die chemische Struktur von Sulforhodamin B (schwarz und rot) und Patent Blau V (schwarz und blau) [91].

Die Bindung des nicht minimerten SRB-2 an Patent Blau V (PBV), das sich durch ein zusätzliches Hydroxid am Phtaleinring und das Fehlen des Sauerstoffs zwischen den Phenolringen von Sulforhodamin B unterscheidet, wurde durch einen K<sub>d</sub> von 23  $\mu$ M charakterisiert (**Abb. 4**) [91]. Eine Erhöhung der Quantenausbeute von PBV um das 107-fache auf 0,042 durch Bindung an SRB-2 wurde festgestellt.

RNA-Aptamere zeichnen sich durch adaptives Binden an ihr Target (Zielmolekül) aus [94]. RNA-Fluorophor-Interaktionen können nicht nur veränderte photophysikalische Eigenschaften des Fluorophores bewirken, sondern auch konformationelle Änderungen der RNA verursachen [92, 95]. Die Struktur von verschiedenen RNA-Aptameren wurde mit Roentgenstrukturanalyse untersucht, um die strukturgebenden Eigenschaften der RNA sowie die Wechselwirkung mit dem Target besser zu verstehen [96-98]. Die strukturelle Flexibilität von RNA erschwert das Kristallisieren dieser Molekülklasse. Mit Roentgenkleinwinkelstreuung (RKWS) können Strukturinformationen von gelösten Molekülen erhalten und konformationelle Änderungen wiedergegeben werden (Kap. 2.2.8.). RKWS erlaubt unter nahezu physiologischen Bedingungen den molekularen Trägheitsradius, den Oligomerisierungsgrad sowie mit einer Auflösung von 1 bis 2 nm die Konformation von gelösten Molekülen von 0,5 kDa bis 500 MDa zu bestimmen [99]. Eine Kombination der Ergebnisse von hoch- und niedrigaufgelöster Roentgenstrukturanalyse wurde bei der strukturbiochemischen Charakterisierung der Thermus flavus 5S rRNA angewandt [100].

### 1.5. Fragestellungen der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung eines RNA-spaltenden Enzyms mittels der einzelmolekülspektroskopischen Methode FCS und das Testen der Anwendbarkeit des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers zur Detektion von RNA in FCS-Messungen.

# 1.5.1. Enzymkinetische Charakterisierung von humanem Dicer mittels FCS

Aufgrund der geringen Aktivität von gereinigtem Dicer und der Identifizierung zahlreicher Kofaktoren, die zum Teil dessen Enzymaktivität verändern, sollte die Katalyse von Dicer in der natürlichen Umgebung, d.h. in Gegenwart zytosolischer Komponenten, bestimmt werden (Kap. 1.2.). Dies würde ein weiterer Schritt auf dem Weg zum Verständnis der sequenzabhängigen posttrankriptionellen und translationalen Regulation der Genexpression durch RNA, die in Kapitel 1.1. zusammenfassend vorgestellt wurde, sein.

Eine auf Fluoreszenz basierte Einzelmolekülmethode sollte eine Analyse der Dicer-Aktivität in Gegenwart stöchiometrischer Mengen von Kofaktoren aus Zellextrakten und u.U. *in vivo* ermöglichen. Die Einzelmolekülmethode FCS erlaubt, nanomolare Konzentrationen des Substrates, bzw. noch geringere Konzentrationen des Enzyms einzusetzen und erhöht dadurch die Möglichkeit der Gegenwart stöchiometrischer Mengen von zellulären Kofaktoren in Zellextrakten und *in vivo*. Es wurden verschiedene Ansätze zur Messung von Enzymaktivität mittels FCS entwickelt, die in Kapitel 1.3. vorgestellt wurden. Die Kombination von FCS mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop ermöglicht zudem eine räumlich aufgelöste Messung von Konzentration und Mobilität *in vivo*.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines auf FCS basierten Enzym-*Assays* zur Messung der RNA-Spaltung durch humanen Dicer. Die enzymkinetische Charakterisierung von humanem Dicer sollte unter Annäherung an native Bedingungen erfolgen.

# 1.5.2. Charakterisierung des Sulforhodamin B-bindenden RNA-Aptamers mittels FCS

Eine zweite Fragestellung betraf die Anwendung von Fluorophor bindenden RNA-Aptameren auf Einzelmolekülebene. Die Entdeckung von GFP hat die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen revolutioniert. Sie ermöglicht das Markieren von gentechnologischen Fusionskonstrukten aus GFP und Proteinen, also von rekombinantem Protein [101, 102]. Weil keine fluoreszierenden RNA-Moleküle bekannt sind, ist eine analoge Fluoreszenzmarkierung von RNA nicht möglich. Es existieren verschiedene Ansätze der indirekten RNA-Markierung, die einleitend in Kapitel 1.4. vorgestellt wurden. Fluorophor bindende RNA-Aptamere könnten für die RNA-Markierung ein Analogon zur GFP-Markierung oder zur Markierung von Fusionskonstrukten mittels Farbstoffmolekülen [87, 88] darstellen, falls das Hintergrund-Signal einer solchen Markierung gering und die Affinität zu den RNA-Aptameren hoch ist. Die Fluorophore sollten für eine Anwendung *in vivo* zudem durch die Zellmembran durch Diffusion gelangen und unspezifische Wechselwirkung mit zellulären Bestandteilen nur zu einem geringen Ausmaß ausbilden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die Anwendbarkeit eines Fluorophor bindenden RNA-Aptamers für die Detektion von RNA mittels FCS untersucht werden. FCS erlaubt, die Konzentration, Mobilität und molekulare Größe von Molekülen in Lösung unter annähernd physiologischen Bedingungen und bei pico- bis nanomolaren Konzentrationen statistisch zu erfassen (siehe Kap. 1.3.). Die Wechselwirkung mit nicht markierten Molekülen von erheblich höherem Molekulargewicht oder mit spektral anders markierten Molekülen kann mittels FCS bzw. FCCS charakterisiert werden. Eine Kombination von FCS oder FCCS mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop ermöglicht eine räumlich aufgelöste Messung dieser Eigenschaften *in vivo*.

Ein Fluorophor weist ein sehr geringes Molekulargewicht auf und sollte durch die Bindung an das RNA-Aptamer einen Komplex von erheblich größerem Molekulargewicht bilden. Freies Fluorophor und Komplex sollten entsprechend durch ihre unterschiedlichen Mobilitäten voneinander unterscheidbar sein. Das Sulforhodamin B bindende RNA-Aptamer wurde für diese Studie aufgrund der hohen Photostabilität und Quanteneffizienz von Sulforhodamin B ausgewählt [93, 103]. Die Anwendbarkeit des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers *in vitro* und *in vivo* sollte überprüft werden.

Der Fluorophor-RNA-Komplex sollte auch strukturbiochemisch charakterisiert werden, um die Ursachen der RNA-Fluorophor-Wechselwirkung besser zu verstehen. Die molekulare Größe und konformationelle Änderungen der RNA durch Wechselwirkung mit dem Target sollten mittels strukturbiochemischer Methoden, z.B. RKWS, untersucht werden.

# 2. Materialien und Methoden

# 2.1. Materialien

### 2.1.1. Technische Ausrüstung

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer Brutschrank Cary 50 Photometer Elektrophoreseapparaturen für: Agarosegele Polyacrylamidgele (130 x 80 x 1 mm) Polyacrylamidgele (245 x 180 x 1,5 mm) Elektroporator Elektroporationsküvetten Femtojet Fluorolog 3 Fluorimeter Geldokumentationssytem Infrarot-Thermometer InjectMan N1 2 NanoDrop ND-1000, Photometer Nassblotkammer

Neubauer Zählkammer Lichtmikroskop U-TV1X-2 LSM 510 Meta–ConfoCor2-System Mikrowelle PCR-*Cycler* Polarisationsfilter SZX-AN pH-Meter inoLab *Power Pac Basic* und 1.000, Spannungsquelle Reinstwasseranlage USF ELGA PureLab Plus Schüttelinkubatoren: Thermomixer comfort Innova 4330 (ABI, Langen, Deutschland)(Binder, Tuttlingen, Deutschland)(Varian, Darmstadt, Deutschland)

(Biorad, München, Deutschland) (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) (Biorad, München, Deutschland) (Molecular BioProducts, San Diego, USA) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (Horiba, Langenhagen, Deutschland) (Intas, Göttingen, Deutschland) (Westfalia, Hagen, Deutschland) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (Peqlab, Erlangen, Deutschland) (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) (Superior, Marienfeld, Deutschland) (Olympus, Hamburg, Deutschland) (Zeiss, Jena, Deutschland) (Panasonic, Hamburg, Deutschland) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (Olympus, Hamburg, Deutschland) (WTW, Weilheim, Deutschland) (Biorad, München, Deutschland) (Elga Labwater, Celle, Deutschland)

(Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland)

#### Material und Methoden

Speatroppottor 201	(PINA Parlin Douteabland)
Speciroscaller 201	(RINA, Behin, Deutschland)
Sterilwerkbank	(Heraeus, Hanau, Deutschland)
Stromversorgungsgerät Power Pac 1000	(Biorad, München, Deutschland)
Taumelschüttler Polymax 1040	(Heidolph Instruments, Schwabach,
	Deutschland)
Tempcontrol37	(Pecon, Erbach, Deutschland)
Typhoon 9410 2D-Imager	(GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)
Waagen:	
Analysenwaage ABJ	(Kern & Sohn, Balingen-Frommern,
	Deutschland)
Laborwaage BL 1500 S	(Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Zentrifugen:	
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	(Beckman, München, Deutschland)
Tischzentrifuge 5804 R	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge 5417 R	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

### 2.1.2. Chemikalien und Bioreagenzien

40 % Acrylamid/ Bisacrylamid 19:1
Agarose
Ammoniumperoxydisulfat
Ampicillin
Beta-Mercaptoethanol
Complete protease inhibitor without EDTA
Ethidiumbromid
Harnstoff
LB-Agar
MPD (2- methyl 2,4 pentandiol)
N,N,N <sup>′</sup> , N <sup>′</sup> -Tetramethylendiamin (TEMED)
Penicillin-Streptomycin (100x) Gibco®
Transfektionsreagenz: Plus™-Reagenz
Transfektionsreagenz: Lipofektamin™
Trypsin-EDTA (0,5 % Trypsin) Gibco®

(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
(Biozym, Oldendorf, Deutschland)
(Biorad, München, Deutschland)
(Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
(Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
(Roche, Mannheim, Deutschland)
(AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
(AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
(Hampton Research, Journey, GB)
(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Weitere Standardchemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) bezogen.

### 2.1.3. Verbrauchsmaterial und Kits

#### Verbrauchsmaterialien:

Baysilone	(Bayer Material Sciences, Leverkusen,
	Deutschland)
Einmalspritzen HSW NORM-JECT® (5-50 mL)	(Henke Sass Wolf, Tuttlingen,
	Deutschland)
Filterpapier	(Schleicher und Schuell, Dassel,
	Deutschland)
Kulturröhrchen	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Kulturschale (60 x 15mm) und (35 x 10mm)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Objektträger (100 µm Glasdicke)	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
PVDF-Membran	(DuPont, NEN, Boston, USA)
Reaktionsgefäße (0,2-50 mL)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Siliconized Cover slides (22 mm)	(Hampton Research, Journey, GB)
Sterilfilter	(Millipore, Schwalbach, Deutschland)
Sterile Femtotips II	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Transfer-Pipetten, 3,5 mL	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Zellschaber	(Renner, Dannstadt, Deutschland)
Zellkulturgefäße 8- und 2 Kammern	(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
(100 µm Glasdicke)	
Zellkulturflaschen und -schalen	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturmultiwellplatten (Linbro, 1,7 x 1,6 cm)	(INC Biomedicals, Aurora, USA)
<u>Kits:</u>	

ABI PRISM BigDye Terminators v 3.0(ABI, Langen, Deutschland)Cycle Sequencing KitEluta tube Dialysis KitEluta tube Dialysis Kit(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)(Ausschlussvolumen 6-8 kDa, 200 µL)

E.Z.N.A. ® Plasmid Miniprep II Kit peqGOLD Gel Extraction Kit Nucleic Acid Miniscreen (Peqlab, Erlangen, Deutschland)(Peqlab, Erlangen, Deutschland)(Hampton Research, Journey, GB)

### 2.1.4. Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht vom Hersteller steril bezogen, autoklaviert oder steril filtriert. Für Arbeiten mit RNA wurden alle Puffer und Lösungen in DEPC-behandeltem zweifach deionisiertem Wasser angesetzt.

Ammoniumpersulfat	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in H <sub>2</sub> O			
(APS-Lsg. für PAGE)	Lagerung bei 4 °C			
BCIP-Lsg. Lagerung dunkel bei -20 ℃	0,5 % (w/v) B in DMF	CIP ( 5-Chlor-4-Chlor-3-Indolylphosphat)		
Blockpuffer	1 % BSA in TBS			
CAPS	10 mM 10 %	CAPS pH 11,0 Methanol		
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) 45 % (v/v) 10 % (v/v)	<i>Coomassie Brillant Blue R-250</i> Methanol Eisessig		
Coomassie-Entfärbelösung	45 % (v/v) 10 % (v/v)	Methanol Eisessig		
Detektionspuffer (CIAP)	0,1 M 4 mM	Tris-HCl pH 9,5 MgCl <sub>2</sub>		
DNA-Probenpuffer (6x)	50 % (w/v) 1 % (w/v) 0,1% (w/v) in 1x TAE-Put	Saccharose SDS Orange G ifer		

DNA-Restriktionspuffer O	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
(10x, Fermentas, St-Leon-	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
Roth, Deutschland)	100 M	NaCl
	0,1 mg/mL	BSA
DNA-Restriktionspuffer Kpnl	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
(10x, Fermentas, StLeon-	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
Roth, Deutschland)	0,01 %	Triton X100
	0,1 mg/mL	BSA
DNA-Restriktionspuffer	33 mM	Tris-Acetat (TrisOAc) pH 7,9
Tango (10x, Fermentas,	10 mM	MgOAc
StLeon-Roth, Deutschland)	66 mM	KOAc
	0,1 mg/mL	BSA
Entwickler	0,24 M	Natriumcarbonat
	0,02 %	Formaldehyd
	ad 100 mL	ddH <sub>2</sub> O
Färbelösung	0,1 %	Silbernitrat
	0,02 %	Formaldehyd
	ad 100 mL	ddH <sub>2</sub> O
Fixierer	30 %	Ethanol
	15 %	Essigsäure
	ad 100 mL	ddH <sub>2</sub> O
Inkubationslösung	0,5 M	Natriumacetat-Trihydrat
	0,5 %	Glutardialdehyd
	0,2 %	Natriumthiosulfat
	20 %	Ethanol
	ad 100 mL	ddH <sub>2</sub> O
Laufpuffer-PAGE (5x)	0,125 M	Tris pH 8,3 (nicht einstellen!)
	0,96 M	Glycin
	0,5 %	SDS
	ad 500 mL	ddH <sub>2</sub> O

(10x, Fermentas, 100 mM MgCl <sub>2</sub>		
St. Leon-Roth, Deutschland) 100 mM DTT		
Lagerung bei -20 °C 5 mM ATP		
NBT-Lsg. 0,1% (w/v) NBT		
Lagerung dunkel bei -20 °C 0,1 M Tris-HCl pH 9,5		
NBT-Reaktionsansatz 2,5 mL NBT-Lsg. (Oxidationsmittel)		
vor Gebrauch anzusetzen 22,5 mL 0,1 M Tris-HCl pH 9,5		
4 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H2O		
250 µL BCIP (Phosphatase Substra	at)	
PBS (10x) 1,37 M NaCl		
27 mM KCl		
15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
65 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4		
PCR-Puffer (10x) 200 mM Tris-HCl pH 8,8		
(New England Biolabs, $100 \text{ mM}$ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
Frankfurt am Main, 100 mM KCI		
Deutschland) 20 mM MgSO <sub>4</sub>		
1 % Triton X-100		
Dratain Loufouffor (5.) 0405 M Tria LICI all 0.0		
0,5 % SDS		
Protein-Probenpuffer (2x) 125 mM Tris-HCl pH 6.8		
Lagerung bei 4 °C 4 % (w/v) SDS		
40 % (v/v) Glycerin		
0.002 % (w/v) Bromphenolblau	0.002 % (w/v) Bromphenolblau	
4 mM DTT		
(ad 100 mL) H <sub>2</sub> O		
Puffer A	30 mM	Tris-HCl pH 6,8
----------------------------------	--------	-------------------
(Dicer-Enzym- <i>Assay</i> )	50 mM	NaCl
modifiziert nach [104]	2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
Puffer A2	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
(Dicer-Enzym-Assay)	250 mM	NaCl
(Strategene-Protokoll)	2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
Puffer B	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
(RNase III-Enzym- <i>Assay</i> )	350 mM	KCI
modifiziert nach [39]	0,1 mM	EDTA
	0,1 mM	DTT
	2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
RNA-Elutionspuffer	0,3 M	NaOAc pH 5,4
	0,1 %	SDS
	0,1 mM	EDTA

RNA-Probenpuffer A (0,25 x)10 M Urea in TBE

RNA-Probenpuffer B (2x)	95 %	Formamid		
Lagerung bei 4 °C	0,025 % (w/v) SDS			
	0,5 mM	EDTA		
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M	Tris-HCl pH 6,8		
	0,4 %	SDS		
	ad 100 mL	H <sub>2</sub> O		
Sammelgel	1,5 mL	40% Acrylamid		
	3,75 mL	Sammelgelpuffer 4x		
	9,8 mL	H <sub>2</sub> O		
	60 µL	10 % APS		
	12 µL	TEMED		
Selektionspuffer	10 mM	Hepes pH 7,4		
	100 mM	KCI		
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>		

Selektionspuffer (SAXS)	50 mM 500 mM 50 mM	Hepes pH 7,4 KCl MgCl <sub>2</sub>
Stop-Lösung	0,05 M ad 100 mL	EDTA ddH₂O
TAE (50x)	2 M 250 mM	Tris-Acetat pH 8,0 EDTA
TBE (5x)	445 mM 445 mM 10 mM	Tris-HCl Borsäure
TBS	20 mM 50 mM (ad 1 L)	Tris-HCl pH 7,5 Natriumchlorid H <sub>2</sub> O
TBST	0,2 % (v/v)	Tween 20 in TBS
Transkriptionspuffer	200 mM	Tris-HCl pH 7,9
(5x, Fermentas,	30 mM	MgCl <sub>2</sub>
St-Leo-Roth,	50 mM	DTT
Deutschland)	50 mM 10 mM	NaCl Spermidine
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M 0,4 % ad 100 mL	Tris-HCl pH 8,8 SDS H₂O
Trenngel	7,5 % 7,5 mL 14,9 mL 90 μL 24 μL	Acrylamid 40 % Trenngelpuffer (4x) H <sub>2</sub> O 10 % APS TEMED

Zellextraktionspuffer	10 mM	Tris-HCl pH 7,4
Lagerung bei -20 ℃	100 mM	NaCl
	35 µg/mL	Digitonin
	1x complete	protease inhibitor without EDTA

# 2.1.5. Nährmedien

Sämtliche Medien wurden, wenn nicht vom Hersteller steril bezogen, autoklaviert oder steril filtriert.

LB-Medium	10 g	NaCl
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	Bacto-Trypton
	ad 1 L	ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren
LB-Amp-Medium	100 µg /mL	Ampicillin, in Ethanol gelöst und steril filtriert
	Zugabe vor G	ebrauch bei maximal 40 $^{ m C}$
LB-Agar (für LB-Platten)	10 g	NaCl
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	Bacto-Trypton
	15 g	Agar
	ad 1 L	ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren
LB-Amp-Agar	100 µg /mL	Ampicillin, in Ethanol gelöst und steril filtriert
	Zugabe vor G	ebrauch bei maximal 40 $^{oldsymbol{\circ}}$
RPMI 1640	(GIDCO, UDEr I	nvitrogen bezogen, Karisrune, Deutschland)
SOC (Super Optimal Broth	10 mM	NaCl
+ Catobolite repression	2,5 mM	KCI
Glucose) Medium	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
Lagerung bei -20 ℃	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5,0 g	Hefe-Extrakt
	20 g	Trypton
	mit NaOH auf	pH 7,0 einstellen
	ad 1 L	ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren
	2 %	Glukose, steril filtriert

## 2.1.6. Fluoreszenzfarbstoffe

Emissions- und Absorptionsmaxima sind in Klammern aufgeführt.

Alexa Fluor 488 (Alexa488, 495/519	9)(Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Atto488 (504/521)	(als Markierung von RNA: IBA, Göttingen, Deutschland)
Atto647N (644/667)	(als Markierung von RNA: IBA, Göttingen, Deutschland)
<i>Cyanine</i> 5 (Cy5, 649/670)	(GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)
Rhodamin 6 Green (R6G, 525/555)	(Sigmal-Aldrich, München, Deutschland)
Sulforhodamin B (565/586)	(Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
Patent Blau V (PBV, 638/666)	(Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
Lagerung von gelösten Farbstoffen	bei -20 °C oder 4 °C

## 2.1.7. Enzyme, Antikörper und DNA-Längenstandards

<u>Enzyme</u> (Lagerung bei -20 ℃):	
Alkalische Phosphatase	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
(Calf intestinal Alkaline Phosphata	se, CAIP)
<i>E. coli</i> RNase III	(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)
HindIII	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
Humaner Dicer, in Insektenzellen	(Peqlab, Erlangen, Deutschland)
exprimiert	oder (Stratagene, Heidelberg, Deutschland)
Kpnl	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
Nhel	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
Notl	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
Pyrophosphatase	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
T7-RNA Polymerase	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
Taq-DNA Polymerase	(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)
Xbal	(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)

<u>Größenstandards</u> (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland; siehe Anhang): *RiboRuler<sup>™</sup> RNA Low Range Ladder Gene Ruler<sup>™</sup> DNA Ladder 1 kb Gene Ruler<sup>™</sup> DNA Ultra Low Range Ladder PAGE-Ruler<sup>™</sup> Prestained Protein-Ladder*  PAGE-Ruler<sup>™</sup> Unstained Protein-Ladder pUC19 DNA/Mspl Lagerung bei -20 ℃ oder 4℃

Primärantikörper:Anti-GAPDH (Maus), Lagerung bei -20 °C(Ambion, Darmstadt, Deutschland)Anti-Tetra-His (Maus), Lagerung bei 4°C(Qiagen, Hi Iden, Deutschland)

<u>Sekundärantikörper</u>, alkalische Phosphatase-gekoppelt, Lagerung bei 4 °C: Anti-Maus (Sigma, München, Deutschland)

## 2.1.8. Bakterienstämme und Vektoren

## Bakterienstämme:

*E. coli* DH5α (Promega, Mannheim, Deutschland) (Genotyp: F-, *deo*R, *end*A1, *gyr*A96, *hsd*R17, (rkmk+), *rec*A1, *rel*A1, *sup*E44, Φ80*lac*ZΔM15, *thi*-1,Δ(*lac*ZYA-*arg*FV169) *E. coli* Top10 F' (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) (Genotyp: *mcr*A, Δ(*mcr*BC-*hsd*RMS-*mrr*), *end* A1, *rec*A1, *rel*A1, *gyr*A96, Φ80*lac*ZΔM15, *deo*R, *nup*G, *ara*D139, F(*lac*Iq, Tn10(Tetr)), *gal*U, Δ*lac*X74, *gal*K, Δ(*ara-leu*)7697)

Vektoren:

Dicer_pBluescipt II SK(+)	von W. Filipowicz aus dem Friedrich Mischner Institut in Basel
	zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1(+)	(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
pEGFP-N1	(BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland)
Im Anhang sind die Vektork	arten und Multiple Cloning Sites dargestellt.

## 2.1.9. Nukleotide und Oligonukleotide

NTP und dNTP(Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)Alle Oligonukleotide wurden von IBA in Göttingen (Deutschland) bezogen (Tab. 1).

#### Tabelle 1 Oligonukleotidsequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	
BGH poly A-Pr		
(Sequenzier- <i>Primer</i> für pcDNA3.1(+))		
Experimente Kapitel 3.2:		
SRB2m-DNA-Templat mit T7-Promotor	tctaatacgactcactataggaacctcgcttcggcgaagatggtga	
(kursiv) [89]:	ggcgcaacgttaaccgcctcaggttcc	
T7-Pf (primer forward)	tctaatacgactcactatagg	
SRB2m-Pr, am C2-Atom der zwei Basen	agaacetgaggcggttaac	
am 5'-Terminus methoxyliert	gguaeolgaggoggliaue	
FB1-DNA-Templat mit T7-Promotor	tctaatacgactcactataggacggcaccacggtcggatccgtga	
(kursiv) [89]:	gttgtgacaatttagcgggtggtattagagcctactgccacagcaa	
	taggatcgatacagatct	
FB1-Pr	agatctgtatcgatccta	
G4-min-DNA-Templat [105]	tctaatacgactcactatagggagaauuccgaccagaagccug	
	cucaggggugggucguaggggggguagcauggauccuca	
G4-min-Pr	tgaggatccatgctacc	
SRBm-RNA	ggaaccucgcuucggcgacgaugggggggggcgcaacguuaa	
	ccgccucagguucc	
SRB2m2-RNA (fett gedruckte Basen	ggaaccucgcuucggcga <b>u</b> gaugg <b>a</b> gaggcgcaa <b>g</b> guuaa	
sind im Vergleich zu SRB2m mutiert)	ccgccucagguucc	
Experimente Kapitel 3.1 (Sequenzen von	n humanen GAPDH-Gen abgeleitet):	
22 nt sense-RNA	aaggcugagaacgggaagcuuu	
26 nt antisense RNA	gaaaagcttcccgttctcagccttga	
5 nt RNA	gaaaa	
humanes Dicer-Gen	kodierend, ca. 5.769 bp, siehe Anhang	
6 nt RNA	сииссс	

SRB2m-RNA wurde auch am 5'-Terminus chemisch markiert mit Atto488 bzw. Atto647N bezogen. Die 26 nt *antisense*-RNA und 5 nt RNA (Tab. 1) wurden am 5'-Terminus chemisch mit Cy5 oder Atto647N markiert, die 6 nt RNA mit Atto647N markiert bezogen.

## 2.1.10. Software

ABI PRISM3.3 Software (ABI, Langen, Deutschland) ConfoCor2 Software 4.3 (Zeiss, Jena, Deutschland) Corel Draw 11.633 (Corel, Ontario, Canada) Excel (2005 Microsoft Corporation, Redmond, USA) Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) *Mfold* 3.2 [106, 107]: (http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rnaform1.cgi) MultiAlin [108] (I.N.R.A. Toulouse, France) *NEBcutter* (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) (http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html) Origin (v7.5G SR2, Northampton, USA) Powerpoint (2005 Microsoft Corporation, Redmond, USA) RNAcofold [109, 110]: (http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/RNAcofold.html) Oligonucleotides Properties Calculator [111]: (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) Peptide Property Calculator (http://www.basic.nothwestern.edu/biotools/proteincalc.html)

# 2.2. Methoden

## 2.2.1. Allgemeine Methoden

Bei Arbeiten mit RNA wurden Handschuhe getragen. Ferner wurden sterile Polypropylen-Gefäße für die Arbeit mit RNA verwendet. Anzusetzende Lösungen sowie Wasser wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt. Dann wurde DEPC in Wasser im Verhältnis 1:1.000 verdünnt und 12 h unter Rühren bei 37 °C in kubiert. Das DEPC wurde im Anschluss durch Autoklavieren entfernt. DEPC gilt als karzinogen und ist leicht flüchtig! Alle Arbeiten mit DEPC wurden daher ausschliesslich mit Handschuhen sowie unter einem Abzug durchgeführt. Enzyme wurden erst nach vollständigem Einstellen der Versuchsbedingung (Verdünnung konzentrierter Puffer, pH) zum jeweiligen Ansatz gegeben.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

## 2.2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die aromatischen Ringe der Basen sind für die Absorption verantwortlich. Es gilt folgender Zusammenhang [112]:

1 OD<sub>260</sub>  $\approx$  50 µg/mL dsDNA und dsRNA

1 OD<sub>260</sub> ≈ 33 µg/mL ssRNA

Für die Aptamer-RNA und andere kurze RNA-Moleküle wurde die optische Dicht bei 260 nm, OD<sub>260</sub>, für eine 1 μM RNA-Lösung online sequenzabhängig mittels des *Oligonukleotid-Properties-Calculators* berechnet (Kap. 2.1.10.) [111]. Um die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen zu können, insbesondere hinsichtlich Proteinkontamination, wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt. Saubere Nukleinsäurelösungen ergaben einen Wert im Bereich von 1,8 bis 2.

# 2.2.2.2. PCR-Amplifikation von DNA-Templat zur *in vitro*-Transkription

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA [113, 114]. Sie wurde verwendet, um DNA-Templat für die *in vitro*-Transkription von RNA herzustellen.

PCR-Ansatz G4-min-DNA-Templat:

Pipettieransatz für 50 μL:	(µL)	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O	42	
G4-min-DNA (50 nM)	0,5	0,5 nM
dNTP (25 mM)	1	0,5 mM
T7-Pf (100 μM)	0,5	1 µM
G4-min-Pr (100 μM)	0,5	1 µM
Taq-Puffer (10x)	5	1x
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,5	0,05 U

## PCR-Programm G4-min

95 °C	2 min		
95 °C	30 s 🖳	1	Denaturierung
52 °C	30 s	30 x	Annealing
72 °C	30 s _		Elongation
72 °C	8 min		

### PCR-Ansatz FB1 oder SRB2m:

Pipettieransatz für 50 µL:	(µL)	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O	41,5	
FB1- oder SRB2m-DNA (0,1 µM)	1,5	3 nM
dNTP (25 mM)	0,5	0,2 mM
T7-Pf (100 μM)	0,5	1 µM
FB1-Pr oder SRB2m-Pr (100 µM)	0,5	1 µM
Taq-Puffer (10x)	5,0	1x
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,5	0,5 U

PCR-Programm FB1:			PCR-Programm SRB2m:				
95 °C	4 min			95 °C	4 min		
95 °C	30 s	_		95℃	30 s		
50℃	30 s		35 x	57℃	30 s	25 x	č
72 °C	1 min	_		72 °C	45 s	J	
72 °C	8 min			72 °C	8 min		

Der Erfolg der PCR wurde mit einer Polyacrylamidgelelektrophorese (10 %, nativ) überprüft (Kap. 2.2.2.3. und 2.2.2.4.).

## 2.2.2.3. Native PAGE zur DNA-Trennung

In einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden Moleküle in Abhängigkeit von der Masse und Ladung getrennt. Die negative Ladung des Ribosephosphates der DNA erlaubt es, mittels nativer Gelelektrophorese die molekulare Masse von linearisierter DNA zu bestimmen. Das Gel besteht aus einem Polymer von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Mit einer nativen PAGE kann DNA geringeren Molekulargewichtes getrennt werden (< 1.000 bp). Die Vorbereitung der Gelgießkammer für Gele mit den Abmessungen 130 x 80 x 1 mm erfolgte nach den Angaben des Herstellers der Elektrophoreseapparaturen.

Zusammensetzung eines 10 %igen Acrylamidgeles:

- 1 x TBE (Tris Borat EDTA)
- 0,1 % (v/v) Temed (N,N,N',N'-Tetramethylehtylendiamin)
- 0,1 % (v/v) APS (Ammoniumpersulfat)
- 10 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 19:1)

Temed wurde zum Schluss zugegeben, da es die Polymerisierungsreaktion startet. Eine Acrylamidlösung ist hochgiftig! Bei Arbeiten mit Acrylamid wurde immer auf geeignete Kleidung, Schutzbrille und Handschuhe geachtet. Nach dem Gießen des Gels wurde sofort der Probenkamm eingebracht. Die nach Polymerisation entstandenen Taschen wurden mit Wasser gespült, um nichtpolymerisierte Acrylamid-Reste zu entfernen. Das Gel wurde in die Gelkammer eingespannt und 1x TBE in die Gelkammer gefüllt.

Ein Teil der PCR wurde mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde *Gene Ruler<sup>™</sup> DNA ladder Ultra Low Range* oder *pUC19 DNA/Mspl* eingesetzt. Die

Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Wenn die Bande des Orange G des DNA-Probenpuffers aus dem Gel gelaufen war, wurde das Gel gestoppt (nach ca 1/2 h).

## 2.2.2.4. Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen mittels Ethidiumbromid

Die Ethidiumbromidfärbung gehört zu den schnellsten und empfindlichsten Färbemethoden für kleine Nukleinsäuremengen (ab ca. 20 ng). Ethidiumbromid ist ein organischer Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in Nukleinsäuren interkalieren kann. Die Gele wurden in einer Lösung aus 4  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in 1x TBE für 5 -10 min gefärbt und mit einer Geldokumentationsanlage (312 nm) aufgenommen. Ethidiumbromid ist ein starkes Mutagen und gilt als hoch krebserregend. Es wurde daher mit Handschuhen gearbeitet.

## 2.2.2.5. In vitro-Transkription von Nukleinsäuren

Unter Verwendung der T7-RNA-Polymerase wurde die SRB2m-, FB1- und G4-min-RNA *in vitro* transkribiert [115]. Die SRB2m2-RNA und die in SAXS-Versuchen verwendete SRB2m-RNA wurden aufgrund der benötigten hohen Menge chemisch synthetisiert. Es wurden 50 µL-Ansätze pipettiert, um durch Maximieren der Oberfläche die Ausbeute zu erhöhen (mündlicher Hinweis von Herrn Prof. Dr. Mathias Sprinzl; Universität Bayreuth). Eine weitere Steigerung der RNA-Ausbeute wurde erzielt durch Zugabe von Pyrophosphatase, die das chemische Gleichgewicht auf die Produktseite der Transkription verschiebt [116]. Ein an den zwei äußersten Basen des 5'-Terminus C2-methoxylierter *primer* (SRB2m-Pr) wurde zur *in vitro*-Transkription von SRB2m verwendet [117]. Dieser sollte gewährleisten, dass die T7-RNA-Polymerase homogene Termini synthetisiert. Dies war für die Kristallisations-experimente von Bedeutung.

<u>Pipettieransatz für 50 µL</u> :	Menge	Endkonzentration
5x Transkriptionspuffer	10 µL	1x
DNA	0,5 µg	0,01 µg/µL
NTP (25 mM)	4 µL	2 mM
Pyrophosphatase (0,1 U /µL)	1 µL	0,005 U/µL
T7-RNA Polymerase (20 U/µL)	1,5 µL	0,6 U/µL

DEPC- Wasser ad 50 µL

Bei 37 °C wurde für 3 h oder bei Raumtemperatur (RT) über Nacht inkubiert. Das Transkript wurde bei -20 °C gelagert. Ein Teil des Transkripte s wurde in einer denaturierenden PAGE analysiert (Kap. 2.2.2.7. und 2.2.2.4.). Bei ausreichender RNA-Ausbeute wurde Ethanol-gefällt und eine präparative denaturierende PAGE durchgeführt und die RNA isoliert (Kap. 2.2.2.6. - 2.2.2.8.).

## 2.2.2.6. Ethanolfällung

Um RNA und DNA zu reinigen und zu konzentrieren, wurden RNA und DNA mit 70 % Ethanol und 0,3 M NaOAc pH 5,2 ausgefällt. Dazu wurden zu der Probe 1/10 Volumen von 3 M NaOAc Lösung und 2,5 Volumenteile 100 % Ethanol gegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT oder über Nacht bei –20 °C wurde die Probe mit 13.000 upm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei RT über Nacht getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 – 40 µL Wasser aufgenommen. Die Konzentration der Lösung wurde wie in Kapitel 2.2.2.1. beschrieben photometrisch bestimmt.

## 2.2.2.7. Denaturierende PAGE zur RNA-Trennung

Die Gele setzten sich wie in Kapitel 2.2.2.3. beschrieben, unter Zusatz von 8 M Urea, zusammen. Präparative Gele wiesen die Maße 245 x 180 x 1,5 mm, analytische Gele wiesen Maße von von 130 x 80 x 1 mm auf. Die Vorbereitung der Gelgießkammer erfolgte nach den Angaben des Herstellers der Elektrophoreseapparaturen. Als Marker wurde *RiboRuler<sup>TM</sup> RNA Low Range Ladder* verwendet. Marker und RNA-Probe wurden mit RNA-Probenpuffer A (Aptamer-RNA in Kap. 3.2.1. und 3.2.5.) oder B (Dicer-*Assay* in Kap. 3.1.2.7.) versetzt. Die Proben wurden 15 min auf 70 °C erhitzt. Das Gel wur de parallel bei 12 W für 15 min vor Probenauftrag Spannung angelegt. Die Taschen wurden vor dem Probenauftrag gespült. Anschließend wurden die Proben sowie separat 1 µL Farbstoff auf das Gel aufgetragen und bei 12 W elektrophoretisch aufgetrennt bis die Bromphenolblau enthaltende Bande aus dem Gel herausgelaufen war (ca. 10 min). Ein analytisches Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, wie in Kapitel 2.2.2.4. beschrieben. Mit einem präparativen Gel wurde wie in Kapitel 2.2.2.8. verfahren.

## 2.2.2.8. Isolierung von RNA-Fragmenten aus präparativen Polyacrylamidgelen

Die mit Hilfe der denaturierenden PAGE gereinigte RNA wurde mittels *UV-Shadowing* detektiert. Dabei wurde das Gel auf eine kieselgelhaltige Folie gelegt. Bei Bestrahlen mit UV-Licht absorbieren Nukleinsäuren das Licht und heben sich so vom hellen Untergrund ab. Die RNA wurde durch Diffusionselution aus den ausgeschnittenen Gelstücken isoliert. Hierfür wurden die Gelstücke zerkleinert, zunächst für 10 s bei −20 ℃ und dann in RNA-Elutionspuffer (Kap. 2.1.4.) für 12 h bei RT inkubiert. Nach erstmaligem Auspressen der Gelstücke in einer Glaswolle enthaltenden Spritze, wurde erneut RNA-Elutionspuffer zugegeben und für 2 h bei 65 ℃ unter Schütteln ink ubiert. Die daraus erhaltenen Lösungen wurden gefällt wie in Kapitel 2.2.2.6. beschrieben. Anschließend konnte die RNA-Konzentration bestimmt werden (Kap. 2.2.2.1.).

### 2.2.2.9. De- und Renaturierung von Aptamer-RNA

Vor Titrationsexperimenten zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten, vor DLS-Messungen, Kristallisations- und SAXS-Experimenten wurde die RNA de- und renaturiert. Hierbei wurde die RNA in Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> gelöst, für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt und dann für 20 s auf Eis gestellt. Daraufhin wurde MgCl<sub>2</sub> hinzugegeben und die RNA 1 h bei RT zur Renaturierung inkubiert. Es wurde 1 h bei 13.000 upm bei RT zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und weiterverwendet.

## 2.2.2.10. Dicer- und RNase III-Enzym-Assay

Der Dicer- und RNase III-Enzym-*Assay* wurde mit fluoreszenzmarkierter RNA durchgeführt, um die RNA-Restriktion mittels FCS *online* und in Echtzeit verfolgen zu können. Die fluoreszierenden Restriktionsprodukte von Dicer wurden zusätzlich gelelektrophoretisch analysiert. Für den Dicer-*Assay* wurde RNA in Puffer A vorbereitet (Kap. 2.1.4.; modifiziert von [104]), für den RNase III-*Assay* in Puffer B (Kap. 2.1.4.; modifiziert von [39]). Die Dicer-Versuche mit Cy5 aus Kapitel 3.1.2.1. und 3.1.2.2. wurden mit Puffer A2 (Kap. 2.1.4.) durchgeführt, der von Stratagene vorgeschlagen wurde. MgCl<sub>2</sub> wurde erst nach dem De- und Renaturieren der Probe hinzugefügt. Für die dsRNA wurden der 26 nt fluoreszenzmarkierte *antisense*-Strang und der unmarkierte 22 nt *sense*-Strang hybridisiert. Nach dem Erhitzen für drei Minuten auf 95 ℃ wurde die Probe um 1 ℃ alle 1,2 Minuten abgekühlt bis eine Temperatur von 25 ℃ erreicht war [104].

Für den FCS-*Assay* wurden zum Bestimmen der Produktdiffusionszeit 5 nM RNA mit 1 U rekombinantem, käuflich erworbenem Dicer oder 2,5 U rekombinanter RNase III bei RT inkubiert. Zum Messen von Kinetiken wurde in der Regel zu 50 nM Substrat 0,5 U Dicer bei RT gegeben.

Eine optimale FCS-Messung zeichnet sich v.a. durch eine hohe molekulare Zählrate aus. Die molekulare Zählrate hängt von der Fluorophorkonzentration ab und wird meist bei Konzentrationen zwischen 1 und 100 nM erreicht. Deshalb wurden in Restriktionsexperimenten mit Zellextrakten neben 25 nM markierter dsRNA verschiedene Mengen nicht markierter RNA zugegeben.

Um Messungen mit Zellextrakten von Kontrollzellen und Dicer überproduzierenden Zellen vergleichbar zu gestalten, wurde die  $OD_{280}$  der Zellextrakte bestimmt und durch Verdünnung mit Zellextraktionspuffer ohne Digitonin auf denselben Wert eingestellt (Kap. 2.2.4.). Die  $OD_{280}$  entspricht dem Proteingehalt von BSA in mg/mL und wurde allgemein als Annäherung an den Gesamtproteingehalt verwendet. HEK293- und HeLa-Zellextrakte wurden in den Versuchen von Kapitel 3.1.3.4. auf 3,4 mg/mL bzw. 2,4 mg/mL eingestellt. Hingegen wurden HEK293-Extrakte in den Versuchen aus dem Kapitel 3.1.3.5. unter Verwendung einer größeren Zellzahl gereinigt (6 cm Platten, 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen) und mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/mL im FCS-*Assay* verwendet. Die Zellextrakte wurden bei 4  $^{\circ}$  gelage rt und innerhalb von 48 h verbraucht. Die Enzymaktivitäten veränderten sich innerhalb dieser Zeit nicht signifikant. Nach 48 h wurde jedoch ein Abfallen der Enzymaktivitäten verzeichnet. Die Reihenfolge der FCS-Messungen wurde routinemäßig zwischen Kontrollzellextrakten und Extrakten aus Dicer überproduzierenden Zellen geändert, um Temperaturartefakte auszuschließen.

Es wurden, um einen Einfluss von Digitonin auf die Dicer-Aktivität auszuschließen, HEK293-Zellextrakte mit 200 µL-Dialysegefäßen des *Eluta tube Dialysis Kit* gegen ein Volumen von 200 ml Zellextraktionspuffer ohne Digitonin für 24 h bei 4 °C dialysiert. Die Enzymaktivität zeigte keine Veränderung im Vergleich zu Zellextrakten ohne Dialyse. Aus Messungen mit dialysierten und nicht dialysierten Zellextrakten wurden deshalb Durchschnittwerte gebildet.

Bei der gelelektrophoretischen Trennung der Dicer-Produkte war eine RNA-Konzentration von 1 µM notwendig, um eine ausreichende Signalintensität im 2D-Imager Typhoon zu erhalten. DsRNA wurde mit 0,5 U Dicer bei 37 °C für 2,5 h inkubiert. Die Restriktion wurde mittels FCS überprüft.

### 2.2.2.11. Agarosegelelektrophorese zur DNA-Trennung

DNA-Proben wurden unter nativen Bedingungen mittels Agarosegelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt [118]. Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurden Gele mit 1 - 4 % Agarose (w/v) verwendet. Dabei wurde die Agarose in 1x TAE zum Sieden gebracht. Die Agarose-Lösung wurde, nachdem sie auf etwa 40 ℃ abgekühlt war, in horizontale Gelkammern gegossen. Es wurden analytische bzw. präparative Kämme eingesetzt. Nach der Verfestigung des Gels wurde die Laufkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Nach dem Versetzen der DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer wurden diese in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandards wurden *Gene Ruler<sup>™</sup> DNA Ladder 1 kb* oder *Gene Ruler<sup>™</sup> DNA Ultra Low Range Ladder* verwendet. Die Elektrophorese erfolgte abhängig vom Agarosegehalt bei 90 bis 110 V für 30 bis 90 min.

#### 2.2.2.12. DNA-Restriktion und – Präparation

Um das Dicer-Gen aus dem Vektor pBlueskript II SK(+) auszuschneiden und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) zu integrieren, wurde Dicer\_pBlueskript II SK (+) mit Notl und KpnI geschnitten. Eine Inkubation der DNA mit Notl in DNA-Restriktionspuffer O erfolgte bei 37 °C über Nacht (Kap. 2.1.4.). Die DNA wurde in einem Agarosegel getrennt, die linearisierte Vektor-Bande (etwa 8.650 bp) ausgeschnitten und mittels des *peqGOLD Gel Extraction Kits* entsprechend den Herstellerangaben gereinigt (Kap. 2.2.2.11.). Die DNA wurde daraufhin mit KpnI in DNA-Restriktionspuffer-KpnI geschnitten und die Insert-Bande (etwa 5.770 bp) gereinigt (Kap. 2.1.4.). Auch pcDNA3.1(+) wurde mit KpnI und NotI vollständig geschnitten und der linearisierte Vektor über ein Agarosegel getrennt, ausgeschnitten und gereinigt. Die Reinigung der DNA wurde mit einem analytischen Agaosegel überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.2.1., 2.2.2.4. und 2.2.2.11.). Das Plasmid Dicer\_pcDNA3.1(+) wurde zur Kontrolle mit Xbal in DNA-Restriktionspuffer Tango geschnitten (Kap. 2.1.4.). Es sollten Fragmente von 2.357 bp und 8.785 bp entstehen (11.145 bp Gesamtgröße).

#### 2.2.2.13. Ligation von DNA-Fragmenten

Um eine Religationen innerhalb des Vektors zu unterbinden, ohne dass ein Insert aufgenommen wurde, wurde der linearisierte Vektor am 3'-Ende dephosphoryliert. Die DNA-Ligase verknüpft 3`-Monophosphat-Termini mit 5'-Desoxyribose-Termini. Der linearisierte Vektor wurde 1 h mit 1 U CAIP (*Calf intestine alkaline phosphatase*; Alkalische Phosphatase von Kälbern) inkubiert, um eine Selbstligation zu unterbinden. Das Enzym wurde anschließend inaktiviert, indem der Ansatz für 15 Minuten bei 85 °C inkubiert wurde. Es wurden 100 bis 300 ng linearisierter Vektor und Insert im Verhältnis 1:1 bis 1:5 in Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase bei 16 °C inkubiert.

#### 2.2.2.14. Herstellung kompetenter Zellen

Das Transformieren von *E. coli*–Zellen mittels Elektroporation wurde als Methode 1988 etabliert [119]. Einzelkolonien des *E. coli*-Stammes Top10 wurden gepickt und 2 mL LB-Medium (Kap. 2.1.5.) angeimpft sowie über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln bei 220 upm wachsen gelassen. Mit der Vorkultur wurden 200 mL SOC-Medium angeimpft (Kap. 2.1.5.). Unter Schütteln bei 220 upm wurde bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen die mittlere Wachstumsphase erreichten, d.h. bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht wurde. Danach wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mittels Zentrifugation für 10 min bei 4.000 g bei 4 °C pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 50 mL eiskaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 10 min bei 4.000 g Erdbeschleunigung bei 4 °C zentrifugiert. Das Waschen mit ddH<sub>2</sub>O mit anschließendem Zentrifugieren wurde zwei weitere Male wiederholt. Das Pellet wurde in 2 mL eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 200 µL aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

## 2.2.2.15. Tranformation von kompetenten *E. coli*-Zellen und Amplifikation des Plasmids

Elektrokompetente Bakterien (50 µL) wurden auf Eis aufgetaut und zwei Mikroliter des Ligationsatzes zugegeben. In einer auf Eis gekühlten Elektroporationsküvette erfolgte die Transformation bei 1,8 kV für max. 1 s. Zu den Zellen wurden 500 µL SOC-Medium (Kap. 2.1.5.) gegeben, der Ansatz in ein 1,5 µL Reaktionsgefäß überführt und 1 Stunde unter

Schütteln bei 220 upm bei 37 °C inkubiert. Die Bakt erien wurden im Anschluss auf Ampicillin enthaltenden LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Kap. 2.1.5.). Drei Milliliter Ampicillin enthaltendes LB-Medium (Kap. 2.1.5.) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Zu r Präparation der DNA wurden 2 mL der Übernacht-Bakterienkultur mit dem *E.Z.N.A.* ® *Plasmid Miniprep II Kit* entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet (Kap. 2.1.3). Die in 50 µL ddH<sub>2</sub>O eluierte DNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle der Insertion des Di cer-Gens wurden 0,5 µg des Plasmids mit Xbal geschnitten und die Restriktion auf einem analytischen Gel elektrophoretisch getrennt und gefärbt (Kap. 2.2.2.4. und 2.2.2.11.).

## 2.2.2.16. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren und mit *ABI PRISM BigDye Terminators v 3.0 Cycle Sequencing Kit* [120]. Als *primer* wurden die Oligonukleotide T7-Pf bzw. BGH Poly A-Pr im Sequenzier-PCR-Ansatz verwendet:

0,5 µg	Plasmid-DNA
10 pmol	primer
2,5 µL	Half Term Reaction Puffer
1 µL	DMSO
ad 17 µL	ddH <sub>2</sub> O

### PCR-Programm:

Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 96  $^{\circ}$  wurde n dem Reaktionsansatz 3  $\mu$ L Big-Dye-PCR-Premix zugegeben. Danach wurde folgendes Programm verwendet:

30 s 96 °C 15 s 60 °C 4 min 60 °C

Der PCR-Ansatz wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (Kap. 2.2.2.6.). Die anschließende Sequenzanalyse erfolgte am Universitätsklinikum Eppendorf am Institut für Pathologie unter Verwendung des *ABI PRISM*® *3100 Genetic Analyzer* und der *ABI PRISM3.3-Software*.

## 2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

## 2.2.3.1. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE beruht auf dem Prinzip der Trennung von Proteinen bzw. Peptiden nach ihrem Molekulargewicht. Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) bindet mit seinem hydrophoben Anteil an die Proteine. Der negativ geladene Teil von SDS bewirkt eine negative Ladung der Proteine, die proportional zur Anzahl der Aminosäuren ist. Das hier verwandte diskontinuierliche System wurde von Laemmli entwickelt [121]. Es besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, deren Zusammensetzung in Kapitel 2.1.4. beschrieben ist. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde gegossen, indem erst das Trenngel gegossen wurde, das mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach dem Polymerisieren wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel auf das Sammelgel gegossen. Sofort wurde der Probenkamm eingebracht. Die nach Polymerisation entstandenen Taschen wurden mit Wasser gespült, um nichtpolymerisierte Acrylamid-Reste zu entfernen. Das Gel wurde in die Gelkammer eingespannt und Protein-Laufpuffer in die Gelkammer gefüllt. Als Größenstandard wurde bei späterer Coomassie- oder Silberfärbung der PAGE-Ruler<sup>™</sup> Unstained Protein-Ladder verwendet. Die Proben wurden zu gleichen Teilen in 2x Protein-Probenpuffer aufgenommen. Proben und Größenstandard wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert. Für das Immunoblotten wurde der PAGE-Ruler<sup>™</sup> Prestained Protein-Ladder verwendet, der nicht denaturiert werden durfte. Es wurde während der Elektrophorese eine Spannung von 150 V angelegt. Ein Färben aller Proteine erfolgte in Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler bei RT innerhalb von 2 - 12 h, ein Entfärben durch Coomassie-Entfärbelösung.

Zum immunologischen Nachweis von humanem Dicer in Zellextrakten wurde eine 7,5-%iges SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 ℃ im Protein-Probenpuffer denaturiert und für 30 s bei 13.000 upm zentrifugiert. Der Überstand und der nicht denaturierte *PAGE-Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein-Ladder* wurden auf das Gel aufgetragen und bei 150 V elektrophoretisch getrennt, bis die 35 kDa-Bande gerade noch zu sehen war. Damit sollte der Nachweis des 220 kDa Dicer und der 30 - 40 kDa-GAPDH-Untereinheiten gewährleistet werden. Es wurde wie in Kapitel 2.2.3.2. beschrieben weiter verfahren.

## 2.2.3.2. Immunoblotting

Die Nassblotkammer wurde in einer Styroporbox mit Eis umschichtet und mit CAPS gefüllt. Das Schwammgitter wurde in CAPS äquililibriert. Die PVDF-Membran wurde 2 s in Methanol geschwenkt, dann 15 min in destilliertem Wasser gewaschen. Die Membran und vier Filterpapiere wurden 10 min in CAPS inkubiert. Auf ein Schwämmchen des aufgeklappten *Sandwich*-Konstruktes wurden 2 Filterpapiere gelegt, dann die Membran und schließlich das Gel luftblasenfrei gelegt. Abschließend wurden zwei Filterpapiere aufgelegt, das *Sandwich*-Konstrukt geschlossen und in die Blotkammer eingebracht. Es wurde für 3 h eine Spannung von 50 V angelegt, wobei eine Stromstärke von etwa 150 mA erreicht wurde.

Die Membran wurde mehreren Wasch- und Inkubationsschritten unterzogen, die alle auf dem Schüttler und, soweit nicht anders angegeben, bei RT erfolgten. Zunächst wurde die Membran 2 x 10 min in TBS gewaschen, dann 1 h in Blockpuffer (Kap. 2.1.4.; 0,5-fach verdünnt in TBS) inkubiert. Darauf folgte ein zweimaliges Waschen mit TBST für je 10 min. Das Gel wurde nun horizontal so geschnitten, dass der Größenbereich der 30 - 40 kDa GAPDH-Untereinheiten von dem Größenbereich des 220 kDa Dicer getrennt wurde. Eine Inkubation mit dem Primärantikörper, gelöst in Blockpuffer, erfolgte bei 4 °C über Nacht. Dicer wurde mit Anti-His-*Tag*-Antikörper (Anti-Tetra-His; 1:5.000) nachgewiesen, GAPDH mit Anti-GAPDH-Antikörper (1:5.000) (Kap. 2.1.7). Das Gel wurde anschließend zweimal 10 min mit TBST gewaschen. Dann wurde es mit dem Sekundärantikörper, gelöst in Blockpuffer, für 2 h bei RT inkubiert. Anti-Tetra-His und Anti-GAPDH-Antikörper wurden mit Anti-Maus-Antikörper (1:10.000) nachgewiesen. Ein zweimaliges zehnminütiges Waschen mit TBST erfolgte und dann ein zehnminütiges Waschen mit Detektionspuffer. Die Membran wurde im Dunkeln mit frisch angesetztem NBT-Reaktionsansatz inkubiert, bis Banden sichtbar wurden (Kap. 2.1.4.). Die Membran wurde mit Wasser gespült, getrocknet und *eingescannt*.

### 2.2.3.3. Silberfärbung

Mittels Silberfärbung können Proteinmengen von bis zu 5 ng sichtbar gemacht werden, eine etwa zehnmal kleinere Menge als durch Coomassie-Färbung. Silber-Ionen ( $Ag^{2+}$ )-Ionen bilden Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten. Durch Reduktion entsteht elementares Silber, das im Gel sichtbar ist. Die Silberfärbung wurde in Glasschalen durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Trenngel für 30 min im Fixierer unter leichtem Schütteln inkubiert (Kap. 2.1.4.). Das Gel wurde anschließend in der Inkubationslösung 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert (Kap. 2.1.4.). Es folgte ein dreimaliges fünfminütiges Waschen des Gels in H<sub>2</sub>O auf dem Schüttler. Das Gel wurde für 30 Minuten in der Färbelösung inkubiert und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen (Kap. 2.1.4.). Eine Inkubation im Entwickler erfolgte, bis die gewünschten Banden zu sehen waren (Kap. 2.1.4.). Mit Stoplösung wurde der Entwicklungsvorgang beendet (Kap. 2.1.4.).

## 2.2.4. Zellbiologische Methoden

## 2.2.4.1. Kultivierung von Säugetierzelllinien

Es wurden zwei verschiedene adhärent wachsende Zelllinien verwendet: HeLa und HEK293. HeLa-Zellen (Henrietta Lacks) sind epitheloid wachsende, aus einem menschlichen Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) stammende Zellen und wurden 1951 erstmals in Kultur gebracht [122]. HeLa war die erste aneuploide, kontinuierlich kultivierte menschliche Zelllinie. Bei HEK293 (*human embryonic kidney*) handelt es sich um eine humane, embryonale Nierenzelllinie [123]. Die Zellinien HeLa und HEK293 wurden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U Penicillin G/mL und 100 mg Streptomycin/mL kultiviert (Kap. 2.1.5.). Waren mikroskopische Experimente (Kap. 2.2.6.) oder die Aufreinigung des Zellextraktes (Kap. 2.2.4.3.) geplant, wurden die Zellen in Phenolrot-freiem Medium kultiviert (Kap. 2.1.5.).

Die Zellen wurden in 25 oder 75 cm<sup>2</sup> großen Gewebekulturschalen mit Filter oder zur Transfektion in Zellkulturschalen von 6 cm Durchmesser oder in 24-*well*-Zellkulturplatten kultiviert. Um Zellen mikroskopisch zu analysieren, wurden diese in 2-*well* oder 8-*well*-Zellkulturgefäßen mit Glas-Boden kultiviert (Kap. 2.1.3. und 2.2.6.). Das fötale Kälberserum (FKS) wurde inaktiviert, indem es bei 65°C in einem Wasserbad für etwa 15 Minuten inkubiert wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurde das FKS anschließend bei –20°C eingefroren.

Zellen, die in flüssigem Stickstofftank gelagert wurden, wurden revitalisiert, indem sie zügig aufgetaut wurden. Um einer Mycoplasmeninfektion vorzubeugen, wurde das Zellen enthaltende Gefäß aus dem Tank mit flüssigem Stickstoff entnommen und kurz in 100 % Methanol getaucht. Die Zellsuspension wurde in eine Medium enthaltende Zellkulturflasche gegeben.

## 2.2.4.2. Passagieren von Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden passagiert, wenn sie den Boden der Kulturflaschen zu etwa 90 % bedeckten (zu 90 % konfluent waren), d.h. etwa alle drei Tage. Zunächst wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1 - 5 mL einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) auf diese gegeben. Die Kulturflasche wurde für maximal fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch vor sichtiges Abklopfen und Lichtmikroskopie wurde das Ablösen der Zellen überprüft. Mit der mindestens vierfachen Menge des FKSenthaltenden Mediums wurde das Trypsin gehemmt und bei 1.000 upm fünf Minuten zentrifugiert. Etwa ein Zehntel der Zellen wurde in eine frisches Medium enthaltende neue Kulurflasche gegeben. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die trypsinierten Zellen gezählt.

## 2.2.4.3. Transfektion von Zellen und Herstellung des Zellextraktes

Zellen wurden, nachdem sie 50 - 80 % konfluent waren, transfiziert. Im Folgenden ist die Transfektion von Zellen beschrieben, die auf 6 cm-Zellkulturplatten wuchsen. Für die 24 *well*-Platten wurden die Mengen in Klammern eingesetzt. Das Medium wurde in den Zellkulturschalen abgenommen und 2,4 mL (200  $\mu$ L) Transfektionsmedium (TM, Medium ohne Antibiotikum) auf die Zellen gegeben. Sechs (0,4) Mikrogramm der Plasmid-DNA wurde in 300  $\mu$ L (25  $\mu$ L) TM verdünnt und mit 40  $\mu$ L (4  $\mu$ L) Plus-Reagenz gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT wurde in einem zweiten 1,5 mL Reaktionsgefäß 20  $\mu$ L (1  $\mu$ L) Lipofektamin mit 280  $\mu$ L (25  $\mu$ L) TM gemischt und zu der DNA-Lösung gegeben. Die Lösung wurde gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde auf die Zellen pipettiert. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurden 3 mL (250  $\mu$ L) Medium mit 20 % FKS hinzugegeben. Nach 24 h im Inkubator wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Ernte der Zellen und die Transfektionseffizienz wurde bestimmt.

Die Transfektionseffizienz wurde durch Transfektion mit pEGFP-N1 ermittelt, indem die Anzahl grün fluoreszierender Zellen und die Gesamtzellzahl im kLRM bestimmt und ins Verhältnis gesetzt wurden. Die Transfektionseffizienz lag bei durchschnittlich 15 %.

Die weiterzuverarbeitenden Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Um Zellen für *Immunoblots* zu sammeln, wurden diese für 5 Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert und die Pellets eingefroren. Zellextrakt wurde hergestellt, indem die Zellen mit PBS gewaschen wurden und dann mit dem Zellschaber vom Kulturflaschenboden gelöst wurden. Das Ablösen der Zellen von 24-*well*-Platten (Versuche aus Kap. 3.1.3.4. mit HeLa- und HEK293-Zellen) erfolgte mittels Auf- und Abpipettierens, was zu einer höheren Menge an Zelltrümmern im Zellextrakt und damit zu einem höheren Ausmaß höhermolekularer Aggregate in FCS-Messungen führte als nach Verwendung von 6 cm-Platten und dem Ablösen mittels des Zellschabers (Versuche aus Kap. 3.1.3.5.). Die Zellen wurden in 200  $\mu$ L Zellextraktionspuffer auf Eis für 15 min inkubiert (Kap. 2.1.4.; modifiziert nach [124]). Digitonin ist giftig. Hautkontakt und Einatmen sollten vermieden werden. Daher wurden Handschuhe getragen und nur bei guter Belüftung mit diesem Puffer gearbeitet. Es folgte ein Zentrifugieren bei 3.000 x g und 4  $\mathfrak{C}$  für 8 s. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4  $\mathfrak{C}$  gelagert. D as Pellet wurde verworfen oder bei -20  $\mathfrak{C}$  zur weiteren Analyse eingefroren.

38

## 2.2.5. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

## 2.2.5.1. Fluoreszenz

Fluoreszenz kann nach dem Besetzen eines höheren Energiezustands der Außenelektronen eines Chromophors (S<sub>1</sub>) nach Absorption von Photonen (180 bis 800 nm) entstehen (Abb. 5) [125]. Das Chromophor fällt während der Fluoreszenz unter Emission von Photonen auf den Energiegrundzustand (S<sub>0</sub>) zurück. Für die Energiezustände S<sub>0</sub> und S<sub>1</sub> existieren mehrere Energieniveaus, die sich geringfügig voneinander unterscheiden. Weil die Emission vom untersten Energieniveau des S<sub>1</sub>-Zustands erfolgt, ist die Wellenlänge des Absorptionsmaximums etwas niedriger als die Wellenlänge des Emissionsmaximums eines Chromophors. Das heißt, dass die Emissionsenergie etwas niedriger ist als die Absorptionsenergie. Dieses Phänomen wird Stokes-Shift genannt.

In den Energiezuständen  $S_0$  und  $S_1$  kommen Elektronenpaare mit entgegengesetztem Spin (Singulettzustände) vor. Aus dem angeregten Singulettzustand  $S_1$  können Chromophore unter Fluoreszenzemission zu  $S_0$  zurückkehren oder durch Spinumkehr in den Triplettzustand  $T_1$  übergehen, in welchem Elektronenpaare einen parallelen Spin aufweisen (**Abb.** 5) [126, 127].



#### Abbildung 5 Jablonski-Diagramm

Darstellung elektronischer Energiezustände (fett gedruckte Linien) eines Fluorophors durch das Jablonski-Diagramm [127]. Die Höhe der Ebenen entspricht dem relativen Energiegehalt. Im Grundzustand S<sub>0</sub> können Elektronen Energie aufnehmen, d.h. Photonen absorbieren, und gelangen in den angeregten Singulettzustand S<sub>1</sub> (Absorption). Durch Fluoreszenzemission kann ein Rückfallen auf den Singulettzustand S<sub>0</sub> erfolgen. Hierbei geht Energie verloren, d.h. die Wellenlänge des Absorptionsmaximums ist kürzer als die korrrespondierende Wellenlänge des Emissionsmaximums (Stokes *Shift*). Durch Spinumkehr (*Intersystem Crossing*; Singulett-Triplett-Übergang) können Chromophore von S<sub>1</sub> in den Triplettzustand T<sub>1</sub> übergehen. Von T<sub>1</sub> kann ein Rückfall auf S<sub>0</sub> ohne Emission von Photonen erfolgen. Durch interne Konversion können zusätzlich innerhalb S<sub>1</sub>, S<sub>0</sub> oder T<sub>1</sub> geringfügigere Änderungen der Energiezustände ohne Spinumkehr erfolgen (dünn gedruckte Linien). Die Tendenz zum quantenmechanisch verbotenen Singulett-Triplett-Übergang (Spinumkehr) wächst mit dem Besetzen des S<sub>1</sub>-Zustands an. Deshalb ist der Anteil T<sub>T</sub> (Kap. 2.2.5.3.) der Chromophore, die den Triplettzustand besetzen, direkt von der Laserenergie abhängig [126, 128]. Die Besetzung des Triplettzustands erhöht zudem das Risiko des Photobleichens, d.h. der irreversiblen Zerstörung des Chromogens [128, 129]. Aus dem Triplettzustand fällt ein Chromophor auf den Grundenergiezustand S<sub>0</sub> ohne Fluoreszenzemission zurück. Das geschieht in der Regel in Mikro- bis Millisekunden und wird durch die Triplettzeit  $\tau_T$  wiedergegeben (Kap. 2.2.5.3.). Dies muß im Zusammenhang mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy, FCS; siehe Kap. 2.2.5.3.) berücksichtigt werden. Es existieren auch höherenergetische Zustände, wie z.B. S<sub>2</sub> und T<sub>2</sub>, die hier nicht betrachtet werden sollen.

Für die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie, mit der im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich Versuche durchgeführt wurden, eignen sich besonders Fluorophore von hoher Quantenausbeute (Verhältnis emittierter zu absorbierter Photonen), mit einem hohem Extinktionskoeffizienten und von hoher photochemischer Stabilität [65, 71, 130]. Eine hohe photochemische Stabilität zeichnet sich z.B. durch eine geringe Tendenz zur Spinumkehr aus. Das Photobleichen kann durch eine zeitabhängige Verringerung der Fluoreszenzintensität erkannt werden. Besonders, wenn zeitabhängige Fluoreszenzintensitätsänderungen gemessen werden, wie durch FCS, kann dieses Phänomen Messergebnisse verfälschen [131]. Fluorophore, die sich für die Einzelmoleküldetektion mittels FCS eignen, sind z.B. die neu entwickelten Atto-Farbstoffe, aber auch Cyanine 5 (Cy5), Alexa Fluor 488 (Alexa488) oder Rhodamine 6 Green (R6G), die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden (Kap. 2.1.6.) [131-133]. Es existieren auch natürlich vorkommende Proteine die nach Anregung durch Licht fluoreszieren, wie das GFP (green fluorescent protein) oder dessen Mutante EGFP (enhanced green fluorescent protein) [101, 102]. Das Chromophor wird autokatalytisch durch die Aminosäuren Serin, Glycin und Tyrosin geformt. EGFP weist ein Absorptionsmaximum bei 489 nm und ein Emissionsmaximum bei 508 nm auf [134]. Es ähnelt damit in den spektralen Eigenschaften Alexa Fluor 488, das ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 519 nm aufweist. Mit GFP und EGFP sind FCS-Messungen möglich [135, 136]. Auch rot fluoreszierende Proteine sind mittlerweile bekannt und für FCS-Messungen eingesetzt worden [77].

## 2.2.5.2. Aufbau eines konfokalen Mikroskops

Die in der vorgelegten Arbeit erstellten einzelmolekülspektroskopischen (FCS-) Messungen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops durchgeführt. In **Abbildung 6** ist der Aufbau

eines konfokalen Mikroskops dargestellt. Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wird im Folgenden mit Hilfe von Abbildung 6 erläutert. Licht (grün dargestellt) einer bestimmten Wellenlänge wird von einer Laserguelle (Argon- oder Helium-Neon-Laser) emittiert. Es wird vom dichroitischen Strahlteiler reflektiert (Hauptfarbteiler, HFT) und durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert (Anregungsvolumen), wo es von Chromophoren absorbiert werden kann. Der dichroitische Strahlteiler schützt den Detektor vor dem Anregungslicht, das meist eine weitaus höhere Signalintensität aufweist. Es wird hierbei das Phänomen des Stokes Shift ausgenutzt, das erlaubt, das Anregungslicht von emittiertem Licht spektral zu trennen (siehe Kap. 2.2.5.1.; Abb. 5). Licht wird von den angeregten Chromophoren emittiert (rot dargestellt; Abb. 6) und durch das Objektiv gesammelt [131]. Es passiert den dichroitischen Strahlteiler und einen Emissionsfilter der den vom Detektor regristrierten Wellenlängenbereich zusätzlich einschränkt.



#### Abbildung 6 Aufbau eines konfokalen Mikroskops

Der Laserstrahl (grüne Linie) wird von einer Laserquelle emittiert, vom dichroitischen Strahlteiler reflektiert (mittelgraue Linie) und durch ein Objektiv auf die Probe (orange) fokussiert. Das emittierte Licht (rote Linie) passiert dichroitischen Strahlteiler, Emissionfilter und *pinhole* (schwarze Linie). Nur emittiertes Licht, dass das *pinhole* passiert, kann vom Detektor detektiert werden. Die Größe des *pinholes* bestimmt die Größe des konfokalen Punktes (blau).

Ein *bandpass* (BP)-Emissionsfilter ist für Licht eines definierten Wellenlängenbereiches durchlässig. Ein *longpass* (LP)-Emissionsfilter ist für Licht der Wellenlängen oberhalb eines bestimmten Wertes durchlässig. Es wird vom Detektor ausschließlich Licht detektiert, das das *pinhole* (Lochblende) passiert hat. Das Hintergrund-Signal außerhalb der fokalen Ebene wird ausgeblendet. Die Schichtdicke der detektierten konfokalen Ebene wird durch die Größe des *pinholes* definiert, wodurch ein hoher Grad an optischer Messgenauigkeit erreicht werden kann. Es handelt sich exakter gesagt um einen konfokalen Punkt (konfokales Detektionsvolumen) (**Abb. 7**). Dieser weist in der Regel in FCS-Messungen eine Größe von unter einem Femtoliter auf. Die experimentell bestimmten Dimensionen des konfokalen Volumens sowie die verwendeten Gleichungen sind im Kapitel 2.2.5.3. und **Tabelle 2** aufgeführt. Das konfokales Detektionsvolumen ähnelt der Form eines *baseballs* aufgrund der Punktverbreiterungsfunktion (*pointspreadfunction*) des Laserlichtes (**Abb. 7**).



Abbildung 7 Das konfokale Detektionsvolumen

Dargestellt sind das konfokale Detektionsvolumen in einem konfokalen Mikroskop (a) sowie das durch FCS-Messungen definierte konfokale Detektionsvolumen (b). a) Die Punktverbreiterungsfunktion des Laserstrahls definiert das *baseball*-förmige konfokale Volumen, das in z-, x- und y-Richtung bestimmt ist. Diese Koordinaten wurden zur Kalibrierung des konfokalen Detektionsvolumens in FCS-Messungen (Kap. 2.2.5.4.) sowie in mikroskopischen Aufnahmen mittels des konfokalen Laser-Rastermikroskops (kLRM) (Kap. 2.2.6. und Versuche aus Kap. 3.1.4. und 3.2.8.) genutzt. b) Das in seinen Abmessungen durch FCS bestimmte konfokale Detektionsvolumen wird durch den axialen und radialen Abstand, z<sub>0</sub> und r<sub>0</sub>, zwischen dem Fluoreszenzintensitätsmaximum und dem  $1/e^2$ -Wert des Maximalwertes definiert. Z<sub>0</sub> und r<sub>0</sub> verhalten sich proportional zueinander (siehe Kap. 2.2.5.3.).

Die Minimalgröße des Detektionsvolumens ist beugungsbegrenzt und hängt somit von der Wellenlänge des Laserlichtes ab. Dies spiegelt sich in den experimentell bestimmten Volumina der unterschiedlichen Laserlinien mit den dazugehörigen Strahlgängen wieder (**Tab. 2** in Kap. 2.2.5.3.; siehe auch zu den verwendeten Einstellungen Kap. 2.2.5.4.). Die durch FCS gemessenen Diffusionszeiten sind direkt abhängig von der Einstellung des *pinholes*, weshalb dessen Kalibrierung routinemäßig durchgeführt wurde (Kap. 2.2.5.4.). In einem konfokalen Laser-Rastermikroskop wird der konfokale Punkt in x- und y-Richtung verschoben, so dass eine konfokale Ebene ensteht (Kap. 2.2.6.). Durch Verschiebung in z-Richtung werden konfokale dreidimensionale Darstellungen des Objektes möglich.

### 2.2.5.3. Theoretische Grundlagen

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) ist eine Methode, die die Diffusion einzelner Moleküle in Lösung statistisch erfasst [69-71, 130]. Diffusion im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> kann mittels FCS bestimmt werden, was einem Molekulargewichtsbereich zwischen etwa 0,5 Kilodalton (Fluorophor) und mehreren Megadalton entspricht. Die geringe Größe des offenen Detektionsvolumens eines konfokalen Mikroskops erlaubt es, bei pico- und nanomolaren Konzentrationen das Hinein – und Herausdiffundieren einzelner fluoreszierender Moleküle zu verfolgen (**Abb. 7** und **8a**) [65].





a) Der durch den optischen Aufbau fokussierte Laser (grau) definiert das konfokale Detektionsvolumen (gestrichelte Linie), in dem fluoreszenzmarkierte Partikel angeregt und detektiert werden (blau gefüllte Symbole). Fluoreszenzmarkierte kleine Partikel (kleine blaue Kreise) treten in Wechselwirkung mit einem signifikant größeren unmarkierten Molekül. Es entstehen fluoreszierende Komplexe, die durch die höhere Diffusionszeit mittels FCS identifiziert werden können (große blaue Kreise). b) Zeitabhängige Fluktuationen der Zählrate im Detektionsvolumen werden bestimmt durch das Ein- und Ausdiffundieren von Partikeln. c) Die Fluoreszenz-intensitätsfluktuationen werden zeitabhängig autokorreliert, um die Diffusionszeiten und Konzentrationen der verschieden großen Partikel zu bestimmen (Glg. 1 - 3). Unterschiedliche Molekulargewichte führen zu Verschiebungen der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  auf der x-Achse. Zum einfacheren Vergleich wurden die Funktionen bei 0,2 µs normiert.

Aus durch Ein- und Ausdiffundieren begründeten Änderungen der Fluoreszenzintensität wird die Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff}}$  bestimmt (**Abb. 8b**). Die Analyse der Änderung der Fluoreszenzintensität  $\delta$ F, die sich mittels  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  errechnet, erfolgt in Abhängigkeit von der Zeitdifferenz  $\tau$  durch die Intensitäts-normalisierte Autokorrelationsfunktion G( $\tau$ ):

$$G(\tau) = \left\langle \delta F(t+\tau) \delta F(t) \right\rangle / \left\langle F(t) \right\rangle^2, \tag{1}$$

wobei die Klammern $\langle \cdot \rangle$ einen zeitlichen Mittelwert bezeichnen (**Abb. 8c**).

Der strahlungslose Übergang von T<sub>1</sub> zu S<sub>0</sub> trägt zu Fluoreszenzintensitätsfluktuationen mittels  $\tau_T$  bei, die sich im Mikrosekunden- bis Millisekunden-Bereich befinden können, jedoch bei den für FCS verwendeten Fluorophoren in der Regel im unteren Mikrosekunden-Bereich auftreten. In **Abbildung 9** ist eine typische Autokorrelationsfunktion dargestellt, durch die unterschiedliche photodynamische Prozesse beschrieben werden, wie die translative Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$ , die Relaxationszeit des Triplett-Zustands  $\tau_T$  und einige Größenordnungen kleiner, die Rotationsdiffusion oder weitere intramolekulare photodynamische Prozesse [137]. Die Relaxationszeit des Triplett-Zustands  $\tau_T$  setzt sich aus den Übergangsraten der Zustände S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> und T<sub>1</sub> zusammen, die von dem Fluorophor besetzt wurden [138]. Triplettzeit und –anteil wurden auch in Übereinstimmung mit der Literatur als Parameter der Singulett-Triplett-Wechselwirkung beschrieben [128].





Eine Autokorrelationsfunktion charakterisiert verschiedene photodynamische Prozesse: die Zeit der translativen Diffusion durch das Detektionsvolumen (schwarze Quadrate), die durch die Relaxationszeit  $\tau_{Diff}$  charakterisiert wird, die Triplettzeit  $\tau_{T}$  (rote Dreiecke) sowie photodynamische Prozesse im Nanosekunden-Bereich (blaue Kreise), die im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert wurden. Aus der Amplitude der Autokorrelationsfunktion können der Anteil der Moleküle im Triplettzustand T<sub>T</sub> sowie die mittlere Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen  $\langle N \rangle$  bestimmt werden.

Aufgrund der Abhängigkeit der Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff}}$  von der molekularen Masse m

$$\tau_{Diff} \propto \sqrt[3]{m}$$
 (2)

können signifikante Änderungen des Molekulargewichtes, die z.B. durch Wechselwirkung eines markierten Liganden mit einem unmarkierten signifikant größeren Molekül verursacht werden, mittels FCS detektiert werden (**Abb. 8**).

Zur Beschreibung der dreidimensionalen Diffusion aus der normalisierten Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  wird folgendes Modell verwendet [69, 139].

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \left( \frac{1 - T + Te^{\frac{-\tau}{\tau}}}{1 - T} \right) \cdot \left\{ \sum_{i=1}^{n} \frac{f_i}{(1 + \tau / \tau_{Diff,i})} \sqrt{1 + \tau \left(S^{-2} \tau_{Diff,i}\right)} \right\}.$$
(3)

Dieses Modell ist auch im konfokalen Mikroskop ConfoCor2 von Zeiss implementiert (Glg. 3) [131]. Es beschreibt die in der Intensität normalisierte Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  in Abhängigkeit von der Zahl der Partikel im Detektionsvolumen N, von der Diffusionszeit  $\tau_{Diff,i}$  und dem Anteil  $f_i$  der Partikel einer bestimmten Diffusionsspezies von n verschiedenen Diffusionsspezies. Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion ist umgekehrt proportional zur Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen N, und damit zur Konzentration der Partikel [131]. Sie sinkt mit zunehmender Konzentration der fluoreszierenden Moleküle. Dies begrenzt Fluorophorkonzentrationen in der Regel auf Werte zwischen 10<sup>-7</sup> und 10<sup>-10</sup> M [65, 130-132]. Zusätzlich enthalten sind in Glg. 3 der Anteil T<sub>T</sub> von Chromophoren im Detektionsvolumen,

die einen Triplettzustand besetzen und der Triplettrelaxationszeit  $\tau_T$  (**Abb. 5**; siehe auch Kap. 2.2.5.1.) [126, 138]. Weil die Fluoreszenzintensitätsfluktuationen, die von  $\tau_{\text{Diff}}$  und  $\tau_T$  herrühren, in einer Mobilitätsanalyse durch  $\tau_T \ll \tau_{\text{Diff}}$  unterschieden werden müssen, existiert ein Grenzwert von 20 - 30 % für den Triplettanteil T<sub>T</sub> und von 5 - 10 µs für die Triplettzeit  $\tau_T$  [126, 128, 131, 132].

Der Strukturparameter S des Modelles nach Gleichung 3 beschreibt die Relation der Abstände zwischen dem Fluoreszenzintensitätsmaximum und des  $1/e^2$ -Wertes des Maximums in axialer und radialer Richtung,  $z_0$  und  $r_0$  (**Abb. 7b**) [131]:

$$S = z_0 / r_{0.}$$

Die Messdaten der Autokorrelationsfunktion wurden entsprechend **Abbildung 8** an Gleichung 3 mit Hilfe der ConfoCor2-Software *gefittet* (Kap. 2.1.10). Ausgegeben wurden die Parameter  $\tau_{\text{Diff},i}$  (µs), f<sub>i</sub> (%), N, S, T<sub>T</sub> (%) und  $\tau_{T}$  (µs) sowie die gemessene Zählrate (kHz) und die molekulare Zählrate (kHz). Die molekulare Zählrate entsteht aus der Division von Zählrate durch N. Sie entspricht der gemessenen Fluoreszenzintensität eines einzelnen Moleküls [131]. Die molekulare Zählrate ist proportional zum Signal-zu-Hintergrund-

45

(4)

Verhältnis in FCS-Messungen [132]. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ist außerdem proportional abhängig zur Quadratwurzel aus der Messzeit. Laserstärke und Fluorophorkonzentration können die molekulare Zählrate verändern. Es existiert für die molekulare Zählrate ein Maximum in Abhängigkeit dieser Parameter.

Bis zu drei Diffusionsspezies (n = 1,...,3) können berücksichtigt werden [131]. Eine Unterscheidung von zwei Diffusionsspezies ist nach Gleichung 3 möglich, wenn sich die Diffusionszeiten von zwei Diffusionsspezies um mindestens einen Faktor von 1,6 unterscheiden [140]. Eine genaue Quantifizierung der Anteile von zwei Diffusionsspezies an der Gesamtpopulation ist nach systematischer Analyse nur möglich, wenn die Fraktionen mindestens 10 % betragen. Auf diese Studie wurde sich bei der Beschreibung des ConfoCor2 in der Literatur bezogen [131]. Zu beachten sind jedoch die Messparameter (Zählrate, molekulare Zählrate, Messzeit, usw) und das Messsystem der zitierten Studie.

Die Verlässlichkeit des *fits* konnte durch den  $\chi^2$ -Test und die Symmetrie der Abweichung der Residuen nach Vergleich von Autokorrelationsfunktion und *fit*-Resultat überprüft werden [131]. Je kleiner das Ergebnis des  $\chi^2$ -Tests ist, umso besser ist die Qualität des *fits*. In der Regel wurden Werte zwischen 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-7</sup> erhalten.

Die Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff},i}$  der i-ten Komponente kann unter Verwendung von Kalibrierungsmessungen in den Diffusionskoeffizienten D<sub>i</sub> umgerechnet werden [131]. Mit Hilfe eines Standardfluorophores wird dafür r<sub>0</sub> bestimmt:

$$D_{i} = r_{0}^{2} / 4\tau_{Diff,i}.$$
 (5)

Der mittels Standardfluorophor bestimmte Strukturparameter S wurde bei der Auswertung der Experimente, die unter gleichen Messbedingungen (Laser, Emissionsfilter) durchgeführt wurden, fixiert [77, 131, 132]. In **Tabelle 2** sind die Standardfluorophore, die entsprechenden Diffusionskoeffizienten und FCS-Parameter aufgeführt.

Laserwellenlänge (nm)	Standardfluorophor	D (x 10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	S	r <sub>0</sub> (nm)	$V_{eff}$ (fl)
488	Alexa488 (495/519)	2,8	5	169	0,13
543	R6G (525/555)	2,8	5,8	189	0,30
633	Cy5 (649/670)	3,16	8	250	0,71

#### Tabelle 2 Typische Parameter der FCS-Messungen von Standardfluorophoren

Laserwellenlänge, Diffusionskoeffizient D, der Strukturparameter S, der radiale Durchmesser r<sub>0</sub> und das effektive Volumen V<sub>eff</sub> des konfokalen Detektionsvolumens und Wellenlängen des Absorptions- bzw. Emissionsmaximums (in Klammern) der Standardfluorophore. Es wurde jeweils ein Strahlgang für die jeweilige Laserlinie verwendet (siehe **Tab. 3** in Kap. 2.2.5.4.).

Mittels Glg. 5 und 4 wird  $z_0$  errechnet, welches für die Berechnung des effektiven Detektionsvolumens V<sub>eff</sub> folgendermaßen verwendet wird (**Abb. 7b**):

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \cdot r_0^{2} \cdot z_0.$$
 (6)

Die Avogadro-Konstante  $N_A$  (6,023 x 10<sup>23</sup> mol<sup>-1</sup>) und  $V_{eff}$  erlaubt es, die Konzentration der fluoreszierenden Partikel, [N], zu bestimmen mit

$$[N] = \frac{N}{(N_A \cdot V_{eff})}$$
(7)

Mittels der Stokes-Einstein-Gleichung

$$r_{H} = \kappa \cdot T / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D_{i}) \tag{8}$$

ist es weiterhin möglich, unter Verwendung von Temperatur T, Viskosität  $\eta$  (Wassser: 1,002 x 10<sup>-3</sup> kg m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) und der Boltzmann-Konstante k (1,38 x 10<sup>-23</sup> kg m<sup>2</sup> s<sup>-2</sup> K<sup>-1</sup>), den hydrodynamischen Radius r<sub>H</sub> aus dem Diffusionskoeffizienten zu berechnen.

Die Mobilität von zylindrischen Molekülen, wie dsDNA und dsRNA, kann mit Hilfe einer modifizierten Stokes-Einstein-Gleichung [141, 142]

$$D_i = A \cdot \kappa \cdot T / (3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot L) \tag{9}$$

unter Verwendung des Parameters A

$$A = \ln(L/d) + 0.312 + 0.565/(L/d) - 0.1/(L/d)^{2}$$
(10)

der sich aus der Länge L (0,3 nm) und dem Durchmesser d eines Moleküles (ssRNA: 1,19 nm; dsRNA: 2,38 nm) berechnet, vorhergesagt werden. Das Fluorophor-Molekulargewicht wurde gleichwertig zu einem Basenpaar oder zwei Nukleotiden gewertet. Der hydrodynamische Radius von globulären Molekülen konnte in Abhängigkeit von der molekularen Masse m und Dichte  $\rho$  (Proteine: 1,4 g/cm<sup>3</sup>) mittels folgender Gleichung vorhergesagt werden:

$$r_{H} = \sqrt[3]{3 \cdot m/(N_{A} \cdot 4 \cdot \pi \cdot \rho)}. \tag{11}$$

Unterscheiden sich die Diffusionszeiten von zwei Molekülspezies nicht signifikant, kann durch unterschiedliche Markierung beider Spezies mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) eine Wechselwirkung nachgewiesen werden (**Abb. 10**) [65, 143]. Der experimentelle Aufbau ist aufwendiger als bei der Autokorrelationsanalyse, da die zwei Anregungs- und Detektionsvolumina aus zwei Strahlengängen zur maximalen Überlappung gebracht und die unterschiedlichen Signale unabhängig voneinander detektiert (zwei Detektorkanäle) werden müssen (siehe Kap. 2.2.5.4.; **Abb. 10a** und **b**) [144].

Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (*fluorescence crosscorrelation spectroscopy*, FCCS) - Messungen identifizieren das gleichzeitige Diffundieren von spektral unterschiedlichen Fluorophoren, die im Folgenden schematisch als blau und rot bezeichnet werden sollen (**Abb. 10**) [65, 143].

47



#### Abbildung 10 Schematische Darstellung von FCCS-Messungen

a) Der durch den optischen Aufbau fokussierte Laser (grau) definiert das konfokale Detektionsvolumen (gestrichelte Linie), in dem fluoreszenzmarkierte Partikel angeregt und detektiert werden (blau und rot gefüllte Symbole). Unterschiedlich markierte Moleküle (blaue Kreise und rote Elipsen), die interagieren, diffundieren gleichzeitig als zweifach markierte Fluoreszenzspezies (blau-rote Doppelkreise) und können durch Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) identifiziert werden. b) Zeitabhängige Fluktuationen der Zählrate im Detektionsvolumen werden bestimmt durch das Ein- und Ausdiffundieren von Partikeln zweier unterschiedlicher Fluorophorspezies. c) Die Fluoreszenzintensitätsfluktuationen der beiden Fluorophorspezies werden zeitabhängig autokorreliert (blaue Dreiecke, rote Quadrate; Glg. 1 - 3). Es erfolgt außerdem eine zeitabhängige Kreuzkorrelation der Fluoreszenzintensitätsänderungen beider Fluorophorspezies (schwarze Rhomben). Dadurch kann ein gleichzeitiges Diffundieren zweifach unterschiedlich markierter Spezies identifiziert werden (Glg. 12).

Die Farbbezeichnung blau und rot orientiert sich nicht an der sichtbaren Erscheinung der Fluorophore sondern ist eine standardisierte Bezeichung für den kurzwelligeren (blau: z.B. Atto488 (504/521); Alexa488 (495/519)) bzw. längerwelligeren (rot: z.B. Atto647N (644/667); Cy5 (649/670), PBV (638/666)) Spektralbereich in der Fluoreszenzspektroskopie. Die spektral unterschiedlichen Fluorophore können Teil desselben Moleküls oder Teil von miteinander interagierenden Molekülen sein.

Es gilt für zwei Fluoreszenzspezies b und r mit der Fluoreszenzintensität Fb bzw. Fr:

$$G(\tau) = \left\langle \delta F_r(t+\tau) \delta F_b(t) \right\rangle / \left\langle F_b(t) \cdot F_r(t) \right\rangle$$
(12a)

oder

$$G(\tau) = \left\langle \delta F_b(t+\tau) \delta F_r(t) \right\rangle / \left\langle F_b(t) \cdot F_r(t) \right\rangle.$$
(12b)

Die Amplitude dieser Funktion steigt, im Gegensatz zur Autokorrelation (siehe oben), proportional zum Anteil der Kreuzkorrelation.

Das effektive Detektionsvolumen V<sub>eff, rb</sub> wird mit V<sub>eff, rb</sub> = 1,56 x V<sub>eff, b</sub> errechnet. Die Zahl der ungebundenen blauen und roten Partikel, N<sub>b, frei</sub> und N<sub>r, frei</sub>, kann mit Hilfe der Partikelzahlen roter und blauer Moleküle, N<sub>b</sub> und N<sub>r</sub>, und der kreuzkorrelierten Partikel N<sub>rb</sub> durch

$$N_{b,frei} = N_b - N_{rb} \tag{13a}$$

und

 $N_{r,frei} = N_r - N_{rb} \tag{13b}$ 

berechnet werden.

Der Anteil kreuzkorrelierter Partikel Fcc kann durch Glg. 7 sowie

$$F_{cc} = \frac{[N_{rb}]}{[N_{r,frei}] + [N_{b,frei}]}$$
(14)

bestimmt werden.

#### 2.2.5.4. Versuchseinstellungen

Alle FCS-Messungen wurden mit dem ConfoCor2 durchgeführt [131]. In Abbildung 6 ist der Aufbau eines konfokalen Mikroskops dargestellt. Die Emissionsfilter, Messzeiten und Einstellungen des pinholes und der Laserintensität (AOTF: acousto-optic tunable filter) sind für die verschiedenen Fluorophore in Tabelle 3 aufgeführt. Für FCS-Messungen wurde der pinhole-Durchmesser abhängig von der Laserwellenlänge auf 70 bis 90 µm festgelegt, um eine Einzelmoleküldetektion von femto- bis nanomolaren Lösungen zu ermöglichen [131]. Mit dem Ziel reproduzierbarer Messergebnisse wurde das pinhole zudem routinemäßig kalibriert (siehe unten). Die Größe des Detektionsvolumens wurde regelmäßig durch Standardfluorophore bestimmt, um allgemeingültige Diffusionskoeffizienten berechnen und temporäre Schwankungen des Detektionsvolumens ausgleichen zu können (Tab. 2; Glg. 4 und 5). Für Kreuzkorrelationsmessungen wurde, um zwei unterschiedliche Fluoreszenzsignale detektieren zu können, zusätzlich der Nebenfarbteiler NFT 635/VIS verwendet [131]. Zwei Detektionskanäle werden im ConfoCor2 verwendet: Detektionskanal 1 für Messungen mit Laserlicht der Wellenlängen 543 und 633 nm (Helium-Neon-Laser) sowie Detektionskanal 2 für Messungen mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm (Argon-Laser). Diese leiten Licht von jeweils einem pinhole weiter zu den den Detektoren 1 und 2. Der Detektionskanal 1 ist vorgesehen für die längerwelligeren Bereiche von mehr als 560 nm [131]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei Anregung bei 543 nm und 633 nm Detektionskanal 1 verwendet, der sensitiver als der zweite Detektionskanal ist. Der Detektionskanal 2 ist vorgesehen für die kürzerwelligeren Bereiche unterhalb von 650 nm [131]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei Anregung bei 488 nm Detektionskanal 2 verwendet. Zwei Detektionskanäle ermöglichen FCCS-Messungen und eine optimale Einstellung für den jeweiligen Wellenlängenbereich. Als Detektoren wurden Avalanche Photodioden (SPCM-AQR-13-FC, PerkinElmer, Fremont, USA) verwendet, die einzelne Photonen detektieren können. Ein AOTF regulierte die Laserstärke der drei Laserlinien: Argon (488, 458 und 514 nm), 543 nm (Helium-Neon) und 633 nm (Helium-Neon) [132]. Es wurde ein C-Apochromat 40x, 1,2 NA Wasser-Immersionsobjektiv verwendet, das sich für Auto- und Kreuzkorrelationsmessungen eignet [131]. Es formt einen beugungsbegrenztes Anregungsvolumen von einer Größe von unter einem Femtoliter. Im ConfoCor2 kann eine

Probe durch zwei Laserlinien simultan angeregt werden, was v.a. für Kreuzkorrelationsmessungen eine Voraussetzung ist.

Farbstoff	Laser	HFT	Emissions- filter	AOTF (%)	pinhole (µm)	Messzeit	
Cy5 und Atto647N	633 nm	633	LP 650	3	90	10 x 10 s Kinetik: alle 15 s: 5 s oder alle 30 s: 10 s	
PBV	633 nm	633	LP 650	3	90	30 x 10 s	
R6G und Sulforhodamin B	543 nm	543	BP 585/615	15	78	10 x 10 s (z.T. 5 oder 40 x 10 s)*	
Alexa 488, Atto488 und EGFP	488 nm	488	BP 505-530	2	70	10 x 10 s	
FCCS mit Atto488 + Atto647N	488 nm + 633 nm	488/ 633	BP 505-530 + LP 650	3,3 + 2,0	70	10 x 10 s	

\* siehe Kapitel 3.2.1. und 3.2.2.

Die Zählrate der Messung war in der Regel mehr als zehnmal geringer als in der Messung des Hintergrundes (Puffer). Dies und die auf Zählrate und molekulare Zählrate abgestimmten Messzeiten (Kap. 2.2.5.3.) ermöglichten ein ausreichendes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis [131, 132, 145]. Messzeiten und andere Versuchseinstellungen der FCS-Messungen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Temperatur im Messraum wurde durch eine Klimaanlage bei 22 ℃ konstant gehalten. Die Temperatur in der Probe wurde mittels eines Infrarot-Thermometers überprüft. Das Messvolumen betrug in der Regel 20 µL. Eine durch Verdunstung bedingte Reduktion des Messvolumens wurde durch die Verwendung eines kleinen Plastikdeckels und durch das Nachfüllen von ddH<sub>2</sub>O ausgeglichen. Mittels eines beheizbaren Objekttisches (Tempcontrol37) enzymkinetischen wurde in den Messungen zunächst eine Probentemperatur von 37 °C oder 30 °C eingestellt (Kap. 3.1.2.1.). Durch Beheizen des gesamten Mikroskops wurde indirekt der Glasobjektträger erwärmt. In der kälteren Jahreszeit konnte die Probe nach Einstellung der Maximaltemperatur von 60 °C im

Objekttisch weder auf 37 ℃ noch auf 30 ℃ erhitzt werden. Andere Systeme wären zu kostenintensiv gewesen. Deshalb wurden die enzymkinetischen Versuche nach Kapitel 3.1.2.1. bei 22 ℃ durchgeführt.

Zu Beginn der FCS-Messungen wurde die Probe (ddH<sub>2</sub>O) mittels der CCD-Kamera des konfokalen Laser-Rastermikroskops (kLRM) fokussiert. Dazu wurden die Lichtreflexe der oberen und unteren Kante des Deckgläschens während des Anhebens oder Absenkens des Objekttisches zur Orientierung genutzt.

Das *pinhole* (Lochblende) wurde mit etwa 1 µM Fluorophor-Lösungen kalibriert [131]. Es wurde eine automatisierte Kalibrierungsmethode genutzt, die das Signal während des Verschiebens des *pinholes* in x-, y- und z-Richtung aufnahm (**Abb. 7a**). Signalmaxima legten die *pinhole*-Position fest.

Bei FCCS-Messungen wurde das *pinhole* von Detektionskanal 2 (blau) zunächst mit Alexa488 (blau) und Laserlinie 488 (blau) kalibriert, dann das *pinhole* von Detektionskanal 1 (rot) mit Cy5 (rot) und Laserlinie 633 (rot) und daraufhin das *pinhole* von Detektionskanal 1 mittels der Laserlinie 488 (blau). Verglich man die Positionsmarken in x- und y-Richtung der zweiten und dritten Kalibrierung, so sollten sich die x- oder y-Werte nicht um mehr als 7 nm voneinander unterscheiden. Des Weiteren wurden die Kreuzkorrelations-komponenten isoliert vermessen, um den *crosstalk* zu bestimmen. Der *crosstalk* ist ein Maß für die nichtideale Detektion des Signals des blauen Farbstoffs im roten Detektionskanal und die Anregung des roten Farbstoffs durch den blauen Laser (**Abb. 10**).



#### Abbildung 11 Crosstalk in FCCS-Messungen

In Kreuzkorrelationsmessungen wird zeitaufgelöst die Fluoreszenzintensität von zwei Farbstoffspezies, rot (R) und blau (B) (siehe Text Kap. 2.2.5.3.) gemessen. Diese werden entsprechend ihres Absorptionsmaximums durch Laserlicht (B, R) angeregt. Die emittierte Strahlung wird entsprechend des Emissionsmaximums in zwei unterschiedlichen Detektionskanälen (B, R) detektiert. Die Signale der beiden Fluoreszenzspezies können nicht vollständig getrennt erfasst werden. Zum einen kann der rote Farbstoff durch die blaue Laserquelle angeregt werden (Kreuzanregung). Zum anderen kann emittierte Strahlung des blauen Farbstoffs im roten Detektionskanal detektiert werden (Kreuzemission). Diese Phänomene werden als *crosstalk* bezeichnet. Das Messen der molekularen Zählraten  $\eta_a$ ,  $\eta_b$  und  $\eta_c$  unter den dargestellten und im Text beschriebenen Einstellungen ermöglicht es, das Ausmaß des *crosstalks* zu bestimmen (modifiziert von [146]).

Das Ausmaß des *crosstalks* kann durch die Kalibrierung der *pinholes* minimert werden und wurde wie im Folgenden beschrieben bestimmt. Der rote Farbstoff wurde in Detektionskanal 1 mit Laserlinie 633 vermessen (a) und dann mit Laserlinie 488 (b). Schließlich wurde der blaue Farbstoff in Detektionskanal 1 mit der Laserlinie 488 vermessen (c). Die molekularen Zählraten der Messungen a - c,  $\eta_a$ ,  $\eta_b$  und  $\eta_c$ , wurde folgendermaßen verrechnet, um den *crosstalk C* zu bestimmen [143, 144]:

$$C = \frac{\eta_b \cdot \eta_c}{\eta_a} \,. \tag{15}$$

Der *crosstalk* sollte kleiner als 10 % sein [131]. Eine zweite Kontrollrechnung wurde durchgeführt [143]:

$$\frac{\eta_c + \eta_b + \eta_a}{\eta_c} > 4.$$
(16)

#### 2.2.5.5. Datenanalyse

Die mittels FCS bestimmten Parameter, v.a. die Komponentenkonzentrationen wurden mittels *Excel*, *GraphPad* und *Origin* ausgewertet (Kap. 2.1.10.).

Einzelne FCS-Messungen wurden nicht ausgewertet, wenn die Diffusionszeiten höher als 10 ms waren, um unspezifische Aggregate aus der Analyse auszuschließen. Aus diesem Grund wurden in der Versuchauswertung in Kapitel 3.1.3.6. Einzelmessungen mit Diffusionszeiten der nicht fixierten Komponente von mehr als 1.000  $\mu$ s von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Einzelmessungen mit einem Triplettanteil T<sub>T</sub> von mehr als 40 % oder einer Triplettzeit  $\tau_T$  von mehr als 40  $\mu$ s wurden in der Regel nicht ausgewertet. Der typische Triplettanteil T<sub>T</sub> von Cy5-markierter RNA von etwa 40 % wurde im Rahmen der Arbeit diskutiert (Kap. 3.1.2.4.).

Ähnelten sich die Diffusionszeiten der fixierten und der nicht fixierten Diffusionsspezies, so wurden diese Messungen nicht weiter betrachtet. In diesem Fall wurde geschlussfolgert, dass keine zu den fixierten Diffusionsspezies unterschiedliche weitere Diffusionsspezies vorhanden seien. Die Diffusionszeiten der nicht fixierten Komponente des Enzym-*Assays* (Kap. 3.1.2.) mussten mindestens 30 µs niedriger oder höher als die des Produktes (falls fixiert), mindestens 50 µs niedriger oder höher als die des Substrates (falls fixiert) und mindestens 70 µs niedriger oder höher als die des ES-Komplexes (falls fixiert) sein.

Um Mittelmaße zu berechnen und eine Aussage über die Abweichung der Daten vom Mittelmaß machen zu können, wurden der arithmetische Mittelwert und Standardabweichungen berechnet. Es wurde der arithmetische Mittelwert  $\overline{x}_{arithm}$  errechnet aus n Einzelwerten x<sub>i</sub> mit i = 1,...,n und

$$\overline{x}_{arithm} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i .$$
(17)

Eine Standardabweichung  $s_x$  von n Einzelwerten  $x_i$  mit i = 1,...,n wurden berechnet mit

$$s_{x} = \sqrt{\frac{n\sum_{i=1}^{n} x_{i}^{2} - (\sum_{i=1}^{n} x_{i})^{2}}{n \cdot (n-1)}}.$$
(18)

Enzymaktivitäten wurden wie folgt berechnet:

Initialgeschwindigkeiten wurden mit linearer Regressionsanalyse aus der Zeitabhängigkeit des Produktanteils bestimmt. Daten von linearen Regressionsanalysen wurden verwendet, wenn die Steigungen signifikant von 0 abwichen. Der durchschnittliche R<sup>2</sup>-Wert aller Analysen der Versuche aus Kapitel 3.1.3.5. betrug  $0.8 \pm 0.1$ . Im Substrat wurde nach *Fitten* der Daten an ein Modell für zwei Diffusionsspezies ein Produktanteil von 15 % bestimmt. Die Substratkonzentration wurde deshalb durch 85 dividiert, um die prozentuale Substratkonzentration zu erhalten. Die zeitliche Produktanteilsveränderung wurde mit der prozentualen Substratkonzentration multipliziert und so die zeitliche Produktkonzentrationsänderung errechnet.

Um die zeitliche Entwicklung des Produktanteils besser erkennbar zu machen, wurde ein exponentieller Algorithmus zur nichtlinearen Regressionsanalyse verwendet: Eine exponentieller Anstieg des y-Wertes in Abhängigkeit von x wurde bestimmt mittels der Amplituden  $A_1$  und  $A_2$ , der Weiten  $t_1$  und  $t_2$  sowie  $y_0$ , d.h. dem y-Wert bei x = 0:

$$y = A_1 \cdot (1 - e^{(\frac{-x}{t_1})}) + A_2 \cdot (1 - e^{(\frac{-x}{t_2})}) + y_0.$$
(19)

Das Lambert-Beersche Gesetz

$$E = c \cdot d \cdot \mathcal{E} \tag{20}$$

beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen der Extinktion E und der Konzentration c einer Lösung, der durch den Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  und und die Schichtdicke der Küvette d definiert wird [147].

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität bzw. der ES-Komplex-Konzentration von der Substratkonzentration wurde mittels der Hill-Gleichung [148]

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]^{h}}{[S]_{1/2}^{h} + [S]^{h}}$$
(21a)

oder

$$\log(\frac{v}{V_{\max} - v}) = h \cdot \log[S] - \log[S]_{1/2},$$
(21b)
durch nichtlineare (Glg. 21a) oder lineare (21b) Regressionsanalyse analysiert, wobei die Parameter der Substratkonzentration [S], der Enzymaktivität v und der Substratkonzentration bei halbmaximaler Aktivität [S]<sub>1/2</sub> sowie des Hill-Koeffizienten h enthalten waren.

Es besteht eine teilweise Übereinstimmung von einer Dissoziationskonstante und einem  $[S]_{1/2}$ -Wert. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  eines Komplexes errechnet sich aus den chemischen Bildung- und Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}/k_1$  [149].

$$K_{d} = \frac{k_{-1}}{k_{1}}$$
(22)

Der  $[S]_{1/2}$ -Wert ist definiert durch  $k_1$  und  $k_{-1}$  sowie durch  $k_2$ , der Geschwindigkeitskonstante des Umsatzes von im ES-Komplex gebundenem Substrat in Produkt (siehe auch Kap. 3.1.1.; **Abb. 14a**), mittels der Gleichung [149]:

$$[S]_{1/2} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}.$$
(23)

Eine sigmoidale Abhängigkeit des y-Wertes (Produktanteil) von x (Zeit) wurde mittels der sigmoidalen Boltzmann-Funktion und nichtlinearer Regressionsanalyse untersucht:

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{1 + e^{\left(\frac{(x - x_0)}{dx}\right)}} + A_2$$
(24)

unter Verwendung des Ausgangswertes  $A_1=0$  und des Endwertes  $A_2=0$  sowie des Zentrumswertes  $x_0=0$  und der Zeitkonstanten dx.

Der Median wurde verwendet, um in einer asymmetrischen Werteverteilung ein robustes Mittelsmaß zu berechnen. Ein Wert w ist Median  $\tilde{x}$  einer Stichprobe, wenn höchstens die Hälfte der Beobachtungen in der Stichprobe einen Wert < w und höchstens die Hälfte einen Wert > w hat. Der Median  $\tilde{x}$  wurde folgendermaßen berechnet:

$$\widetilde{x} = \begin{cases} \frac{x_{n+1}}{2} & \text{n ungerade} \\ \frac{1}{2} (x_n + x_n) & \text{n gerade} \end{cases}$$
(25)

Die katalytische Konstante k<sub>cat</sub> wurde mit der maximalen Enzymaktivität und, in Annäherung an die Enzymgesamtkonzentration, der maximalen ES-Komplex-Konzentration mittels folgender Gleichung berechnet:

$$k_{cat} = \frac{V_{\text{max}}}{[ES]_{\text{max}}}.$$
(26)

Unter der Voraussetzung einer Spezifitätskonstanten im diffusionslimitierten Bereich wurde auf  $k_2 = k_{cat}$  geschlossen [149] und die ES-Komplex-Konzentration [ES] in Abhängigkeit von der Enzymaktivität und  $k_{cat}$  berechnet [149]:

$$[ES] = \frac{v}{k_2} \tag{27a}$$

bzw.  $[ES] = \frac{v}{k_{cat}}$ . (27b)

Um die Substratabhängigkeit der ES-Komplex-Konzentration [ES] zu bestimmen, wurden in Gleichung 21a der Parameter v durch das Produkt aus [ES] und  $k_2$  und der Parameter V<sub>max</sub> durch das Produkt aus [ES]<sub>max</sub> und k<sub>cat</sub> ersetzt. Es ergab sich nach dem Kürzen von k<sub>2</sub> und k<sub>cat</sub> folgende Gleichung:

$$[ES] = \frac{[ES]_{\max} \cdot [S]^{h}}{[S]_{1/2}^{h} + [S]^{h}}$$
(28)

Bei Nichtgleichheit von  $k_2$  und  $k_{cat}$  wäre ein Proportionalitätsfaktor in der Hillgleichung erhalten geblieben.

Die Spezifitätskonstante k<sub>sp</sub> wurde durch

$$k_{sp} = k_{cat} [S]_{1/2}$$
 (29)

mit dem [S]<sub>1/2</sub>-Wert der Dicer überproduzierenden Zellen bestimmt.

Der Komplexanteil Y des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers wurde mit der Konzentration des ungebundenen Fluorophors [F]<sub>frei</sub> und des RNA-Fluorophor-Komplexes [RNA-F] nach der Beziehung

$$Y = \frac{[RNA - F]}{[RNA - F] + [F]_{frei}}$$
(30)

berechnet.

Um Änderungen der molekularen Zählrate auszugleichen wurde der Komplexanteil Y zu Y' korrigiert [150] unter Einbeziehung der molekulare Zählrate des freien und des gebundenen Fluorophors,  $\eta_1$  bzw.  $\eta_2$  und

$$Y' = Y \cdot \eta_2^{2} / (1 - Y) \cdot \eta_1^{2} + Y \cdot \eta_2^{2}.$$
(31)

Der Komplexanteil Y' wurde mit Hilfe von *Origin* oder *Graphpad* gegen die Gesamtkonzentration der RNA aufgetragen und mittels nichtlinearer Regressionsanalyse an eine hyperbolische Funktion

$$Y' = \frac{P \cdot [RNA]}{K_d + [RNA]}$$
(32)

*gefittet*, die den Parameter P und die Gesamt-RNA-Konzentration [RNA] enthielt, um die Dissoziationskonstante  $K_d$  (Glg. 22) zu bestimmen. Es wurden anstelle von Y' auch andere Parameter (N, Zählrate; Triplettzeit) zur Bestimmung des  $K_d$  verwendet.

## 2.2.6. Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Es wurde das konfokale Laser-Rastermikroskop (kLRM, englisch: *confocal laser scanning microscope*, cLSM) LSM 510 Meta verwendet, um mikroskopische Aufnahmen von lebenden Zellen durchzuführen. Die Probe wird bei einem Rastermikroskop in x- und y- Richtung abgetastet (*gescannt*). Das Prinzip des konfokalen Mikroskops wurde in Kapitel 2.2.5.2. erläutert (**Abb. 6**). Durch das *Scannen* in z-Richtung wird das Erstellen eines exakten dreidimensionalen Bildes der Zelle möglich. Routinemäßig wurde eine *airy-unit* im *pinhole* eingestellt [131]. Bei geringer Signalintensität kann das *pinhole* des kLRM vergrößert werden, wodurch sich jedoch die Schichtdicke der fokalen Ebene erhöht und der konfokale Charakter der Messungen verloren gehen kann. Das LSM 510 Meta verwendete *photomultiplyer tubes* als Detektoren. KLRM- und FCS-Messungen können im LSM 510 META-ConfoCor2-System kombiniert werden [131]. Dabei können in kLRM-Aufnahmen mit Kreuzmarken die Positionen für FCS-Messungen festgelegt werden. Das anschließende Wechseln in den FCS-Modus erlaubt an diesen Stellen FCS-Messungen. Mittels eines z-*Scans* wurde sichergestellt, dass sich das Detektionsvolumen im Bereich des Fluorophore enthaltenden Zellkörpers befand.

Mit Hilfe eines R6G-beschichteten Deckgläschens wurde sichergestellt, dass die markierte Position in der kLRM-Aufnahme mit der Position der FCS-Messung übereinstimmte. Auf ein Deckgläschen wurde zu diesem Zweck eine R6G-Ethanol-Lösung gegeben [131]. Nachdem das Ethanol verdunstet war, blieb eine Farbstoffschicht zurück. Blieb nach FCS-Messung auf der markierten Stelle ein ausgeblichener Punkt zurück, konnte darauf geschlossen werden, dass die Positionsangaben im kLRM-Bild genau waren. Andernfalls konnte der Unterschied gemessen und als automatisch zu korrigierender *offset* am ConfoCor2 eingestellt werden.

Bei der Verwendung des Argon-Lasers (bei 488 nm) wurde ein Emissionsfilter BP 505-530 (*bandpass*), bei Anregung mit dem Helium-Neon-Laser bei 633 nm wurde ein Emissionsfilter LP 650 und bei Verwendung des Helium-Neon-Laser bei 543 nm ein Emissionsfilter LP 560 eingesetzt.

Bei der Mikroinjektion von RNA oder Farbstoff wurden zunächst *Femtotips II* mit RNA oder Fluorophor befüllt und dann am *Femtojet* installiert. Eine einzelne Zelle wurde im kLRM fokussiert und die Injektionsnadel in die Nähe der Zelle mit Hilfe des *InjectMan* dirigiert. Die RNA oder der Farbstoff wurde mittels des *Femtojet* und *InjectMan* mit einem

Kompensationsdruck (Pc) von 50 hPa, einem Injektionsdruck (Pi) von 120 hPa und einer Injektionszeit von 0,3 s in die Zelle injiziert [151, 152].

### 2.2.7. Dynamische Lichtstreuung

Mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) kann die Dispersität einer Lösung bestimmt werden [153-155]. Ein in das Messvolumen fokussierter Laserstrahl wird von gelösten Molekülen gestreut. Die Strahlungsintensität der gestreuten Strahlung wird zeitabhängig und in einem bestimmten Winkel detektiert und ausgewertet. Eine Analyse der Interferenzschwankungen ergibt den Diffusionskoeffizenten. Der Diffusionskoeffizient kann aus DLS-Messungen erhalten werden. Die Stokes-Einstein-Gleichung (Glg. 8) erlaubt, aus dem Diffusionskoeffizienten den hydrodynamischen Radius zu berechnen. Die DLS-Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel am Institut für Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Hamburg. Mittels des *Spectroscatter* 201 wurden mit einem Laser bei 682 nm und einem Streuwinkel von 90 ° bei 21 °C DLS-Messungen von SRB2m-RNA vorgenommen. Die Zählrate lag bei 10 bis 60 kHz. Die *Software* des *Spectroscatter* 201 berechnete den hydrodynamischen Radius.

### 2.2.8. Roentgenkleinwinkelstreuung

Durch Beschleunigung von Elektronen in Teilchenbeschleunigern entsteht Synchrotronstrahlung, die zur Analyse von Biomolekülen verwendet werden kann. Sie weist Wellenlängen von 0.1 bis 0.15 nm auf. Hierbei wird ein Elektronenstrahl in einem starken Magnetfeld abgelenkt und quer zu seiner Ausbreitungsrichtung beschleunigt. Von den Probenmolekülen wird diese Strahlung gestreut (Abb. In 12a). einer Roentgenkleinwinkelstreuungsmessung (RKWS)-Messung wird das Streumuster, d.h. die Intensität der gestreuten Strahlung auf einem Plattendetektor. aufaezeichnet (Abb. 12b). Die Strahlungintensität wird in Abhängigkeit vom Streuwinkel mit Hilfe mathematischer Modelle analysiert [99]. Der durch die gestreute Strahlung definierte reziproke Raum (I(s) vs s) kann durch Fouriertransformation in den realen Raum (p(r) vs r) überführt werden (Abb. 12c). Der Trägheitsradius beschreibt die maximale Distanz der Atome zum Molekülzentrum und kann aus der Steigung der Auftragung nach Guinier (I(s) vs s<sup>2</sup>) abgelesen werden [156]. Der Trägheitsradius entspricht bei globulärer

Konformation dem hydrodynamischen Radius. Bei flexiblen Ketten, ist ein 1,5-fach höherer Wert des Trägheitsradius im Vergleich zum hydrodynamischen Radius zu erwarten [157, 158]. Vergleiche mit hydrodynamischen Daten sind daher möglich. Die Intensitätsverteilung I(s) vs s ermöglicht des Weiteren eine Aussage über die Form des Moleküls. Eine *ab initio* Struktur wurde in einer früheren Studie für die *Thermus flavus* 5S rRNA erstellt [100].



#### Abbildung 12 RKWS-Messungen

Schematisch dargestellt sind das Prinzip und die Auswertung von RKWS-Messungen [99]. a) Ein Synchrotronstrahl (grün) wird von der Probe mit dem Winkel 20 gestreut und durch einen Plattendetektor aufgezeichnet. Der Momenttransfer s wird ausgewertet, indem die Strahlungsintensität I in Abhängigkeit von s aufgetragen wird. b) Der so definierte reziproke Raum wird durch Fouriertransformation in den realen Raum überführt. Es ergibt sich eine Wahrscheinlichkeitsverteilung der Abstände zwischen zwei Atomen, die in Abhängigkeit von der Distanz r aufgetragen wird. Weitere Entfernungen (gestrichelte Linie) und kürzere Entfernungen (durchgezogene Linie) erscheinen im realen und reziproken Raum umgekehrt.

Alle RKWS-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. Dmitri Svergun und Dr. Petr Konarev, EMBL-Outstation Hamburg am Desy, durchgeführt und ausgewertet. Die

Synchrotronstrahlungsstreudaten wurden durch eine X33-Kamera des EMBL gesammelt [159] und nach Standardprotokoll analysiert [160].

Um ein vollständiges Binden der RNA durch Fluorophore zu erreichen, wurde ein Überschuß von Sulforhodamin B von etwa 300 und von PBV von mindestens 2 zur RNA gegeben. Die RNA-Lösungen wurden bei Konzentrationen zwischen 18 und 45  $\mu$ M (0,3 – 0,8 mg/mL) vermessen. Die Daten wurden mit einem zweidimensionalen Plattendetektor gesammelt. Der Proben-Detektor-Abstand betrug 2,7 m. Die Wellenlänge der Synchrotronstrahlung betrug 0,15 nm. Der Momenttransfer s berechnete sich unter Verwendung des Streuwinkels 2 $\Theta$  aus  $s = 4\pi \cdot \sin \Theta / \lambda$ . (33)

Um mögliche Strahlungsschäden der RNA zu bestimmen, wurden die Daten aus zwei zweiminütigen Bestrahlungen verglichen. Diese Messungen ergaben keine Veränderungen der Streumuster mit fortschreitender Zeit. Entsprechend konnte keine Schädigung der RNA durch Bestrahlung festgestellt werden. Die Streuintensitäten wurden bezüglich der Intensität des Ausgangsstrahls normalisiert und gemittelt. Streuwerte des Puffers wurden von diesen Daten subtrahiert [161]. Es wurde keine konzentrationsabhängige Veränderung der Streuintensität beobachtet. Die Daten aus hohen und niedrigen Konzentrationen wurden daher zur weiteren Analyse gemittelt. Der Trägheitsradius r<sub>G</sub> wurde nach Guinier ermittelt [156]. Dieser Parameter wurde zusätzlich von den Gesamtstreudaten bestimmt unter Verwendung des Programms GNOM [162]. GNOM errechnete außerdem die Abstandsverteilungsfunktion p(r) der Partikel und den maximalen Partikeldurchmesser D<sub>max</sub>. Das ausgeschlossene Volumen V<sub>p</sub> wurde bestimmt nach Porod [163]. Eine niedrigaufgelöste Strukturanalyse (model shape analysis) von monomerem SRB2m wurde mittels des ab initio-Programmes DAMMIN durchgeführt [164]. Das Programm stellt Moleküle mit einer molekularen Masse m >> 1 Dalton als dicht angeordnete Kugeln innerhalb eines Raumes mit dem Durchmesser D<sub>max</sub> dar. Das Dimermodell von SRB2m wurde mittels des Programms SASREF [165] erstellt. Die Streuintensitätsamplitude von monomerem SRB2m wurde mit dem Programm CRYSOL berechnet [166]. Das Programm OLIGOMER [161] wurde verwendet, um das Verhältnis von monomerer zu dimerer RNA in SRB2m-Lösungen ohne Fluorophor und nach Zusatz von Sulforhodamin B zu bestimmen.

## 2.2.9. Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel am Institut für Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Hamburg durchgeführt. Zur Kristallisation von RNA wurde das Verfahren des *,hanging drops*' (hängenden Tropfens) angewandt (**Abb. 13**). Die RNA-Lösung wurde vorbereitet, wie unter Kapitel 2.2.2.9. beschrieben. In die Vertiefungen einer Zellkultur-*Multiwell*-Platte wurden 500 µL 35 % MPD (2-Methyl-2,4-Pentandiol) pipettiert. Ein Mikroliter der RNA-Lösung wurde mit 2 µL der Kristallisationsbedingung 1 bis 24 des *Nucleic Acid Miniscreen* Kits gemischt und auf ein silikonisiertes Deckgläschen pipettiert. Dieses wurde mit der Tropfenseite nach unten auf ein *well* der Zellkulturplatte aufgesetzt. Zuvor wurde der Rand der Vertiefung mit Baysilone-Paste beschichtet, um einen luftdichten Abschluß zu ermöglichen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 19 °C oder 4 °C inkubiert. Etwa alle 7 Tage wurde im Lichtmikroskop unter Verwendung eines Polarisationsfilters überprüft, ob Kristalle mit doppelbrechenden Eigenschaften gewachsen waren.



#### Abbildung 13 Kristallisation im , hanging drop'

Dargestellt ist ein *well* einer Zellkulturplatte. Auf dem Boden des *wells* befindet sich das Detergenz (35 % MPD, grau). Das *well* ist mit einem Deckgläschen aus Glas verschlossen. Auf dieses Deckgläschen wurde in der Regel 1 µL RNA-Lösung und 2 µL dem Reservoirpuffer pipettiert und vorsichtig gemischt. Das Deckgläschen wurde mit dem Tropfen (türkis) nach unten auf das *well* gelegt, wobei Baysilone-Paste im Übergang zwischen *well* und Deckgläschen einen luftdichten Abschluß erlaubte.

## 3. Ergebnisse, Diskussion und Ausblick

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich zum einen mit der Charakterisierung der RNAspaltenden Funktion des humanen Enzyms Dicer mittels FCS und zum anderen mit der Anwendung des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers in der Fluoreszenzmarkierung von RNA mittels FCS.

## 3.1. Charakterisierung der RNA-spaltenden Aktivität von humanem Dicer

## 3.1.1. Konzeption des Enzym-Assays

Es wurde ein auf FCS basierter Enzym-*Assay* entwickelt, der auf der Änderung der Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff}}$  des Substrates nach Spaltung durch Dicer beruht (**Abb. 14a**; Kap. 1.3. und 2.2.5.). Ein fluoreszenzmarkiertes Minimalsubstrat wurde entworfen, das von einem Teil des humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Gens kodiert wird (**Abb. 14b**).



#### Abbildung 14 Schema des Dicer-Assays und Substratsequenz

a) Prinzip des auf Mobilität basierten Enzym-*Assays*. Fluoreszenzmarkiertes Substrat (S) wird durch das nicht markierte Enzym (E: mindestens 1,6-fach höheres Molekulargewicht) gebunden und der fluoreszierende ES-Komplex (ES) gebildet. Die Geschwindigkeitskonstanten der Formierung und des Zerfalls des ES-Komplexes sind  $k_1$  und  $k_1$ . Dieser zerfällt nach der Katalyse in Enzym und Produkt (P: mindestens 1,6-fach geringeres Molekulargewicht als das des Substrates). Fluoreszenzmarkierte Komponenten sind schwarz dargestellt. Die Geschwindigkeitskonstante der Katalyse ist  $k_2$ . b) Fluoreszenzmarkiertes dsRNA-Substrat (Kap. 2.1.9.). Die angenommenen Spaltstellen von humanem Dicer sind durch Pfeile markiert (siehe Text). Eine nichtfluoreszierende 21 bp dsRNA und ein fluoreszierendes 5 nt ssRNA Fragment sind die angenommenen Dicer-Produkte.





Schematische Darstellung des auf Diffusionszeiten basierten Enzym-Assays anhand der Entwicklung der Komponenten und der mittels FCS detektierbaren Diffusionsspezies (Kap. 2.2.5.). Auf der linken Seite sind Produktanteil (rote Linie), Substratanteil (schwarze Linie) und ES-Komplexanteil (gestrichelte Linie) gegen die Zeit aufgetragen. Hellgraue Flächen dokumentieren das für die FCS-Analyse relevante Stadium des assays. Auf der rechten Seite ist das offene Detektionsvolumen eines konfokalen Mikroskops dargestellt (gestrichelte Linie). Durch das Detektionsvolumen diffundierende Moleküle werden registriert (rot gefüllte Kreise). Drei Stadien der Enzymreaktion sind dargestellt: a) Fluoreszenzmarkiertes Substrat ohne Enzym wird vermessen. Ein *Fitting*-Modell für eine Diffusionsspezies (1 DS) definiert die Substratdiffusionszeit. b) *Steady state*: Enzym (große Kreise) wurde zum Substrat gegeben. Die ES-Komplex-Konzentration ist konstant. Die Produktkonzentration (kleine Kreise) erhöht sich linear. Ein *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies unterscheidet zwischen Substrat-, Produkt- und ES-Komplex-Diffusionszeiten (3 DS). c) Das Substrat wurde vollständig prozessiert. Ein *Fitting*-Modell für eine Diffusionsspezies definiert die Produktdiffusionszeit (1 DS).

Ein zwei-Nukleotide enthaltender Überhang des Substrates am 3'-Terminus des antisense-Einzelstranges sollte die Spaltstelle von humanem Dicer definieren und so das Entstehen eines kurzen fluoreszierenden Fragmentes einheitlicher Größe sicherstellen (Abb. 14, siehe Kap. 1.2.) [49]. Die zwei Nukleotide des Überhangs weisen mit der Sequenz AG optimale Voraussetzungen zum Binden durch Dicer auf (siehe auch Kap. 1.2.). Der Überhang der antisense-ssRNA am 5'-Terminus sollte eine Bindung des Substrates am markierten Terminus zusätzlich verhindern. Die signifikant verringerte Molekülgröße des Dicer-Produktes, verbunden mit einer erhöhten Mobilität, sollte eine Unterscheidung zwischen Substrat und Produkt mittels FCS ermöglichen (Abb. 14 und 15; Glg. 1 - 3) [65, 69, 72, 140]. Mit Hilfe von mathematischen Modellen sollte der Anteil von Produkt und Substrat bestimmt werden, wodurch das Berechnen von Enzymaktivitäten ermöglicht werden sollte (Abb. 15a - c; Glg. 3; Kap. 2.2.5.3. [65, 131]. Durch das hohe Molekulargewicht des Enzyms von etwa 220 kDa im Vergleich zum Substrat von etwa 16 kDa sollte zusätzlich die ES-Komplex-Mobiliät von der Substrat- und Produkt-Mobilität unterschieden werden können (Abb. 14a sowie 15a und b). Damit sollte die auf FCS basierte Konzentrationsbestimmung von Substrat, Produkt und ES-Komplex möglich sein.

## 3.1.2. Diffusionszeiten von Substrat, Produkt und ES-Komplex

#### 3.1.2.1. Diffusionszeiten von Cy5-markiertem Substrat und Produkt

Zunächst wurde das in **Abbildung 14b** dargestellte Substrat statt mit Atto647N mit Cyanin 5 (Cy5) markiert und auf eine Anwendbarkeit in einem auf Mobilität basierten Enzym-*Assay* getestet. Wie in Kapitel 2.2.2.10. beschrieben, wurde die Cy5-markierte, 26 Nukleotide enthaltende *antisense*-ssRNA zusammen mit der unmarkierten 22 Nukleotide enthaltenden *sense*-ssRNA hybridisiert. Die Substratdiffusionszeit wurde in einem *Fitting*-Modell für eine Diffusionspezies bei 37 °C auf 151  $\pm$  3 µs bestimmt (Glg. 3 mit n = 1; D = 1,04 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,10 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; Glg. 3 und 5; Kap. 2.2.5.).

Es wurde zunächst überprüft, ob die dsRNA bei einem Verhältnis von unmarkierter *sense*ssRNA zu markierter *antisense*-ssRNA von 1:1 vollständig hybridisiert war. Die Diffusionszeit dieser dsRNA wurde mit der Diffusionszeit nach Hybridisierung von unmarkierter *sense*ssRNA zu markierter *antisense*-ssRNA im Verhältnis von 2:1 verglichen. Die Werte unterschieden sich um etwa 1 %.



Abbildung 16 FCS-Kinetik von Cyanin 5-markierter dsRNA ohne und nach Zugabe von Dicer

FCS-Messung von Cy5-markierter dsRNA (5 nM) nach Zugabe von rekombinantem humanen Dicer (0,25 U; Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.; 37 °C). a) Die Daten wurd en an ein Modell für eine Diffusionsspezies *gefittet* (Glg. 3 mit n = 1). Die Diffusionszeiten  $\tau_{Diff}$  wurden gegen die Zeit aufgetragen. b) und c) Die Daten wurden an ein Modell für zwei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und Substratdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 2) *gefittet*. b) Der Produktanteil f<sub>1(Produkt)</sub> wurde in Abhängigkeit von der Zeit an eine exponentielle Funktion *gefittet* (Glg. 19). c) Die Zählrate (geschlossene Symbole) und molekulare Zählrate (offene Symbole) wiesen keine signifikanten Veränderungen während der Messzeit auf. d) – f) Es wurde Cy5-markierte dsRNA ohne Zugabe von Enzym vermessen (eine Messung mit 10 nM markierter dsRNA, eine Messung mit zusätzlich 3 µM unmarkierter dsRNA). Zeitabhängigkeit der Diffusionszeit (d; Glg. 3 mit n = 1), des Produktanteils (e; Glg. 3 mit n = 2 und fixierter Produktdiffusionszeit), der Zählrate (f, geschlossene Symbole) molekularen Zählrate (f, offene Symbole). Arithmetische Mittelwerte wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

Daraus wurde geschlossen, dass die dsRNA schon bei einer Relation von 1:1 von *sense-* zu *antisense-*RNA vollständig hybridisiert war. DsRNA wurde deshalb im Folgenden im Verhältnis 1:1 hybridisiert.

Nach Zugabe des rekombinanten Dicer zu Cy5-markierter dsRNA konnte ein Absinken der Diffusionszeit beobachtet werden (**Abb. 16a**; Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Produktdiffusionszeit wurde nach vollständiger Restriktion des Substrates durch Dicer, d.h. nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes, der sich durch eine zeitlich konstante Diffusionszeit auszeichnete, bestimmt. Es ergab sich ein Wert von etwa 85  $\mu$ s nach dem *Fitten* an ein Modell für eine Diffusionszeit. Somit var eine wichtige Voraussetzung zur Differenzierung zwischen Substrat und Produkt aufgrund unterschiedlicher Diffusionszeiten durch ein *Fitting*-Modell erfüllt (Glg. 3 mit n = 2 oder 3; siehe **Abb. 15** zur Konzeption des *assays*) [140]. Die entsprechenden Autokorrelationsfunktionen von Substrat und Produkt sind in **Abbildung 17** dargestellt. Eine Verschiebung der Autokorrelationsfunktion auf der X-Achse nach Restriktion durch Dicer ist deutlich zu erkennen. Die Abweichungen der mittels Gleichung 3 (n = 1) *gefitteten* von der experimentell bestimmten Autokorrelationsfunktion



Abbildung 17 Autokorrelationsfunktionen von Cy5-markierter dsRNA und von dsRNA nach vollständiger Restriktion durch Dicer

Die bei 0,2 µs normalisierten Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von Cy5-markierter dsRNA (offene Symbole) und von Cy5-markierter dsRNA nach vollständiger Restriktion durch humanen rekombinanten Dicer (gefüllte Symbole) (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.; 37 °C). Die Messungen wurden im Gleichgewichtszustand vorgenommen. Arithmetische Mittelwerte wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet. Die Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von den Ergebnissen eines *fits* an ein Modell für eine Diffusionsspezies sind unterhalb derselben dargestellt (Glg. 3 mit n = 1).

Es wurde aufgrund der geringen Substratkonzentration keine signifikante dritte Diffusionsspezies identifiziert (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde ein Modell für zwei Diffusionsspezies verwendet, um den Produktanteil zu bestimmen (Glg. 3 mit n = 2) [140]. Die Produktdiffusionszeit wurde fixiert. Der Produktanteil erhöhte sich nach Zugabe von Dicer von etwa 70 % auf bis zu 100 % (**Abb. 16b**). Signifikantes Photobleichen konnte ausgeschlossen werden, weil es zu keinem wesentlichen zeitabhängigen Abfall der Zählrate kam (< 10 %; **Abb. 16c**; Kap. 2.2.5.1.). Auch die molekulare Zählrate veränderte sich nicht signifikant (**Abb. 16c**). Ohne Zugabe des Enzyms blieben die Diffusionszeit bei etwa 150 µs und der Produktanteil der RNA bei etwa 50 % konstant (**Abb. 16d - f**). Es wurde somit ein relativ hoher Basisproduktanteil identifiziert. Höhere Konzentrationen von unmarkierter dsRNA verursachten keine Aggregation (**Abb. 16d**).

## 3.1.2.2. Identifizierung des ES-Komplexes mittels Multikomponentenmodell-Analyse und Restriktionshemmung

Der ES-Komplex sollte nach Bindung des Substrates an Dicer, ein Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 220 kDa, theoretisch eine im Vergleich zu Substrat und Produkt erheblich erhöhte Diffusionszeit aufweisen. Diese sollte eine Unterscheidung der drei Komponenten mittels FCS ermöglichen (Vergleich Kap. 3.1.1. und 2.2.5.3.) [140]. Aufgrund des Molekulargewichtes von humanem Dicer von 220 kDa und des Substrates von 16 kDa wurde für einen Dicer-Substrat-Komplex eine Diffusionszeit von 282 µs vorhergesagt (Glg. 5, 8 und 11 bei 37 °C). Das Binden von kleineren Kompo nenten an den ES-Komplex, wie TRBP, würde die Diffusionszeit nicht signifikant verändern (Glg. 2). Theoretisch könnte auch ein Enzym-Produkt-Komplex detektiert werden. Da im Enzym-Produkt-Komplex jedoch vermutlich ausschließlich die nicht fluoreszierende 21 bp dsRNA zur Bildung von RISC gebunden bleibt, ist es wahrscheinlich, dass das fluoreszierende kurze einzelsträngige Fragment nach dem Spalten freigesetzt und somit vor allem der ES-Komplex mittels FCS detektiert wird [56]. Die FCS-Daten wurden hinsichtlich einer dritten Diffusionsspezies bei einer Substratkonzentration von etwa 100 nM analysiert (Abb. 18a). Dies sollte die Chance erhöhen, Photonen einer unterrepräsentierten Diffusionsspezies zu detektieren. Bei Substratkonzentrationen von mehr als 50 nM wurde zu nanomolaren Konzentrationen markierter dsRNA (in der Regel 25 nM) zusätzlich unmarkierte dsRNA gegeben [75]. Dies sollte die für die Einzelmoleküldetektion optimale Konzentration fluoreszenter Partikel gewährleisten (siehe Kap. 2.2.5.3.). Das Verhältnis von markierter zu unmarkierter dsRNA veränderte in Übereinstimmung mit der Literatur die Enzymaktivität nicht signifikant (Tab. 4; siehe Kap. 2.2.2.10. und 2.2.5.5.).

Anteil markierter dsRNA	Enzymaktivität v (U)
0,05	$3,0 \times 10^{-8} \pm 1,1 \times 10^{-8}$
0,15	$3,9 \times 10^{-8} \pm 2,7 \times 10^{-8}$
0,25	$2,9 \times 10^{-8} \pm 1,2 \times 10^{-8}$
0,45	3,0 x 10 <sup>-8</sup> ± 1,1 x 10 <sup>-8</sup>

#### Tabelle 4 Verhältnis markierter zu unmarkierter dsRNA

Zu 100 nM Substrat, das unterschiedliche Anteile von Cy5-markierter dsRNA enthielt, wurden 0,25 U rekombinanter humaner Dicer gegeben und eine FCS-Messung durchgeführt (Kap. 2.2.2.10. und 2.2.5.; 37 °C). Arithmetische Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

Zur Analyse einer dritten Diffusionsspezies wurden die FCS-Daten an ein Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und Substratdiffusionszeit *gefittet* (Glg. 3 mit n = 3). Eine dritte Diffusionsspezies konnte identifiziert werden. In **Abbildung 18b** ist eine Häufigkeitsverteilung der Diffusionszeiten dieser Diffusionsspezies mit einer Intervallgröße von 20  $\mu$ s abgebildet.





a) Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  von Cy5-markierter dsRNA (50 nM) nach Zugabe von 50 nM unmarkierter dsRNA und von rekombinantem humanen Dicer (0,5 U; Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.; 37 °C). Die Daten wurden an ein Modell f ür eine Diffusionsspezies *gefittet* und gegen die Zeit aufgetragen (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet. b) Die Daten wurden an ein Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und Substratdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 3) *gefittet* und die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diffusionszeiten der dritten Komponente  $\tau_{\text{Diff}, 3}$  analysiert (Intervall = 20 µs).

Es ergab sich eine asymmetrische Verteilung der Diffusionszeiten zwischen 200 und 2.000 µs (**Abb. 18b**). Eine asymmetrische und breite Verteilung ist typisch für Daten aus Einzelmolekülexperimenten [132]. Deshalb wurden die Daten trotz der breiten Streuung weiter analysiert. Diffusionszeiten zwischen 260 und 280 µs traten am häufigsten auf.

Deshalb wurde auf eine Diffusionszeit der dritten Komponente von etwa 270 µs geschlossen. Diese Diffusionsspezies könnte aufgrund der hohen Übereinstimmung mit der theoretisch vorhergesagten Diffusionszeit des Komplexes von 282 µs identisch mit dem ES-Komplex sein (siehe oben).

Zwei weitere Analysen wurden vorgenommen, um eine Detektion des ES-Komplexes zu bestätigen. Zum einen wurde die Reinheit des Enzyms untersucht, um unspezifische Bindungen auszuschließen (Kap. 3.1.2.5.). Zum anderen sollte ausgenutzt werden, dass Dicer in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> anstelle von MgCl<sub>2</sub> dsRNA nicht spalten kann [18]. Von E. coli RNase III ist bekannt, dass CaCl<sub>2</sub> zwar ein Spalten des Substrates verhindert, die Affinität zum Substrat jedoch erhalten bleibt [39]. Ein solcher Effekt sollte im Rahmen dieser Arbeit für humanen Dicer untersucht werden. Strukturstudien ergaben eine mögliche Ursache für die beobachtete Hemmung der RNase III-Aktivität durch Ca<sup>2+</sup>. Ein Ca<sup>2+</sup>-Ion im katalytischen Zentrum von *Mycobacterium tuberculosis* RNase III stimmte mit der Position eines Mg<sup>2+</sup>-Ions (Mg-1) in der Aquifex aeolicus RNase III-Struktur überein [167, 168]. Dicer und RNase III stimmen in Substratspezifität (sequenzunspezifisch, dsRNA) und in der Produktbildung überein (zwei Nukleotide enthaltende Überhänge am 3'-Terminus; 5'-Phosphat- und 3'-OH-Termini) [16, 36, 37, 44, 51]. Die katalytisch aktiven RNase III-Domänen von RNase III bilden ein intermolekulares Homodimer [168]. Die RNase III-Domänen von humanem Dicer und G. intestinalis Dicer bilden ein intramolekulares Heterodimer [50, 51]. Es wurde zudem nachgewiesen, dass die RNase III-Domäne b von humanem Dicer ein katalytisch aktives Homodimer bilden kann [169]. Die zwei Mg<sup>2+</sup>-Ionen (Mg-1) im katalytischen Zentrum der Monomere weisen in G. intestinalis Dicer und bakterieller RNase III vergleichbare Abstände voneinander auf und sind vermutlich an der Katalyse beteiligt [50, 167, 168]. Es wurde aufgrund dieser Übereinstimmungen ein ähnlicher katalytischer Mechanismus von bakterieller RNase III und humanem Dicer vermutet. Es wurde daher angenommen, dass bei Verwendung von CaCl<sub>2</sub> die Bindung von Dicer an die dsRNA erhalten bleibt.

Zu dsRNA wurde CaCl<sub>2</sub> anstelle von MgCl<sub>2</sub> zugegeben (Kap. 2.2.2.10.). Zum Restriktionsansatz wurden 25 mM CaCl<sub>2</sub> gegeben, um eventuell in der Enzymlösung vorhandenes MgCl<sub>2</sub> zu verdrängen (siehe Kap. 1.2., 2.1.4. und 2.2.2.10.). Man konnte eine Diffusionszeit hauptsächlich im Bereich zwischen 200 und 350 µs beobachten (**Abb. 19a**). Diese verringerte sich während der Beobachtungszeit nicht. Zum Vergleich wurde bei 25 mM MgCl<sub>2</sub> rekombinanter Dicer zum Substrat gegeben. Hier konnte zu Beginn der Messzeit eine Diffusionszeit von etwa 170 µs gemessen werden, die in Abhängigkeit von der Zeit abfiel (**Abb. 19a**). Es scheint sich also um einen CaCl<sub>2</sub>-spezifische Erhöhung der Substratdiffusionszeit zu handeln.



## Abbildung 19 Detektion eines höhermolekularen Komplexes mit Cy5-markierter dsRNA nach Zugabe von Dicer und Ersatz von MgCl<sub>2</sub> durch CaCl<sub>2</sub>

FCS-Messung von 8 nM Cy5-markierter dsRNA nach Zugabe von rekombinantem humanen Dicer (0,5 U; 200 nM) und von 25 mM CaCl<sub>2</sub> (offene Punkte) oder 25 mM MgCl<sub>2</sub> (gefüllte Quadrate) (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.; 37 °C). a) Diffusionszeiten  $\tau_{Diff}$ , die nach dem *fitten* der Daten an ein Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 1) und gegen die Zeit aufgetragen wurden. Die Daten von zwei unabhängigen Messungen nach Zugabe von 25 mM MgCl<sub>2</sub> wurden arithmetisch gemittelt (Glg. 17), Standardabweichungen berechnet (Glg. 18) und an einen exponentiellen Algorithmus *gefittet* (Glg. 19). Die Daten von zwei unabhängigen Einzelmessungen nach Zugabe von 25 mM CaCl<sub>2</sub> sind als Einzelwerte dargestellt (Messung 1: kleine Symbole; Messung 2: große Symbole). b) Zählrate (Punkte) und molekulare Zählrate (Dreiecke) der dsRNA nach Dicer-Zugabe bei 25 mM CaCl<sub>2</sub>. c) Die Daten wurden an ein Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und Substratdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 3) *gefittet*. b) Produktanteil f<sub>1(Produkt)</sub> von dsRNA nach Zugabe von 25 mM CaCl<sub>2</sub> (Glg. 3 mit n = 3) *gefittet*. b) Produktanteil f<sub>1(Produkt)</sub> von dsRNA nach Zugabe von 25 mM CaCl<sub>2</sub> (Glg. 3 mit n = 1; Intervallgröße = 5 µs; 200 - 400 µs). Eingefügt ist der gesamte Bereich der Diffusionszeiten.

Die Zählrate und molekulare Zählrate waren während des Beobachtungszeitraumes nach  $CaCl_2$ -Zugabe konstant (**Abb. 19b**). Sowohl Photobleichen als auch zeitabhängiges *quenching* konnten demnach ausgeschlossen werden. Bei 25 mM MgCl<sub>2</sub> konnte nach dem *fitten* der Daten an ein Modell für drei Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 3) ein Zuwachs des

Produktanteils  $f_{1(Produkt)}$  von 50 auf 70 % festgestellt werden (**Abb. 19c**). Die Einzelwerte des Produktanteils bei 25 mM CaCl<sub>2</sub> waren mit einem Mittelwert von 42 ± 12 % zufällig verteilt im Bereich zwischen 20 und 50 %. Der Basisproduktanteil, der durch das *fitten* der Daten an ein Modell für zwei Diffusionsspezies identifiziert werden konnte, lag bei etwa 50 % (**Abb. 16e**). Es gelang also, durch CaCl<sub>2</sub> die Produktbildung und damit die RNA-Spaltung zu hemmen und das Formieren einer höhermolekularen Diffusionsspezies zu verursachen. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diffusionszeiten nach CaCl<sub>2</sub>-Zugabe wurde daraufhin mit einer Intervallgröße von 5 µs untersucht (Glg. 3 mit n = 1; **Abb. 19d**). Es ergab sich eine asymmetrische Verteilung. Das Diffusionszeiten-Intervall mit den häufigsten Vorkommen war zwischen 240 und 245 µs. Dieser Wert befindet sich in der Größenordnung der Diffusionszeit der dritten Komponente im Dicer-*Assay* von etwa 270 µs (**Abb. 18b**).

Tabelle 5	FCS-Parameter von Cy5-markiertem Substrat vor und nach Zugabe von Dic	ər
	unter Verwendung von MgCl <sub>2</sub> oder CaCl <sub>2</sub>	

Dicer	Puffer	Molekulare Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> * (%)	τ <sub>T</sub> * (μs)
-		25 ± 9	41 ± 1	4,1 ± 0,2
+	MgCl <sub>2</sub>	$19\pm5$	$41\pm2$	$\textbf{6,3} \pm \textbf{3,1}$
+	CaCl <sub>2</sub>	$20\pm10$	39 ± 2	$6,3\pm0,3$

\* Relaxationszeit beschreibt Singulett-Triplett-Wechselwirkung und cis/trans-Isomerisierung

FCS-Daten von Cy5-markierter 22 und 26 Nukleotide enthaltenden dsRNA, vor und nach Zugabe von rekombinantem Dicer und nach Zugabe von 25 mM MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> wurden experimentell bestimmt (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.; Versuch aus **Abb. 19**). Zählrate, molekulare Zählrate,  $T_T$  und  $\tau_T$  wurden mittels eines *Fitting*-Modelles für eine Diffusionsspezies errechnet (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) von zwei unabhängigen Messungen wurden berechnet.

Mittels des *Peptide Properties Calculator* (Kap. 2.1.10.) wurde der Extinktionkoeffizient von reinem humanem Dicer (siehe Kap. 3.1.2.5.) auf 203.040 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> errechnet und mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Glg. 20) die Konzentration des rekombinanten Dicer auf 4  $\mu$ M (0,5 U/ $\mu$ L und 0,9  $\mu$ g/ $\mu$ L) bestimmt. Das Enzym wäre in dem in **Abbildung 19** dargestellten Experiment 25-fach konzentrierter als das Substrat. Eine vollständige Bindung des Substrates wurde u.U. erreicht. Ein geringer Anteil von ungebundenem Substrat könnte die Diffusionszeit jedoch etwas verringert haben.

In **Tabelle 5** sind molekulare Zählrate, Triplettanteil und –zeit des Substrates und der Kinetik nach Dicer-Zugabe bei 25 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. CaCl<sub>2</sub> aufgeführt (siehe **Abb. 19**). Die molekulare Zählrate des Substrates verringerte sich von 25 kHz auf 19 bzw. 20 kHz nach Zugabe von Dicer und MgCl<sub>2</sub> bzw. CaCl<sub>2</sub>. Triplettanteil und –zeit veränderten sich ebenfalls nicht

erheblich nach Dicer-Zugabe. Die photochemischen Eigenschaften von Cy5 weisen somit keine signifikante Veränderung nach Dicer-Zugabe auf. Dies deutet auf eine korrekte Anwendbarkeit der Multikomponentenmodell-Analyse für drei Komponenten hin. Der Einsatz von MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> führte zu nahezu identischer molekularer Zählrate und Triplet-Singulett-Wechselwirkung. Dies weist auf die Bildung eines Komplexes aus Dicer und dsRNA sowohl nach MgCl<sub>2</sub>- als auch CaCl<sub>2</sub>–Zugabe hin.

#### 3.1.2.3. Temperaturabhängigkeit der dsRNA-Diffusionszeiten

FCS-Messungen wurden bei 37 ℃, 30 ℃ und Raumtempe ratur (22 ℃) durchgeführt (siehe auch Kap. 2.2.5.4.). Durch die Temperaturwahl von 30 oder 37 ℃ sollten optimale Bedingungen für eine enzymkinetische Charakterisierung von Dicer geschaffen werden [18]. Aufgrund der technischen Schwierigkeiten, diese Temperaturen in der Probe zu erreichen (siehe Kap. 2.2.5.4.), wurden alle folgenden Versuche bei 22 ℃ durchgeführt. Die Mobilität ist abhängig von der Temperatur (Glg. 8). In **Tabelle 6** sind die Diffusionszeiten von Cy5-markierter dsRNA und von dsRNA nach Restriktion mittels Dicer bei 22, 30 und 37 ℃ aufgeführt.

Temperatur	τ <sub>Diff</sub> (μs)	D (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
37 °C	151 ± 3	$1,04 \times 10^{-10} \pm 0,10 \times 10^{-10}$
30 °C	$159\pm8$	$0,98 \times 10^{-10} \pm 0,04 \times 10^{-10}$
22 °C	163 ± 10	$0,96 \times 10^{-10} \pm 0,04 \times 10^{-10}$

 Tabelle 6
 Diffusionszeiten von dsRNA bei verschiedenen Temperaturen

Diffusionszeiten  $\tau_{Diff}$  (Glg. 3) und Diffusionskoeffizienten D (Glg. 5) von Cy5-markierter dsRNA wurden experimentell mittels FCS bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten wurden im Gleichgewichtszustand aufgenommen und mittels eines *Fitting*-Modelles für eine Diffusionsspezies ermittelt (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet.

Die Unterschiede in den Diffusionszeiten waren mit 151 bis 163 µs nicht sehr hoch und befanden sich z.T. im Bereich der Standardabweichungen der Mittelwerte.

Der temperaturbedingte Unterschied der Diffusionszeit kann auch mittels der Stokes-Einstein-Gleichung theoretisch vorhersagt werden (Glg. 8 und 5). Bei einer Diffusionszeit von 282 µs bei 37 °C wäre theoretisch bei 22 °C eine Di ffusionszeit von 294 µs zu erwarten gewesen. Aufgrund der vergleichbaren Größenordnung wurde die Diffusionszeit des putativen ES-Komplexes von etwa 260 µs, die bei 37 °C bestimmt wurde (Kap. 3.1.2.2.), mit der Diffusionszeit, die bei 22 °C bestimmt wurde (Kap. 3.1.2.9.), verglichen.

#### 3.1.2.4. Vergleich von Cy5- und Atto647N-markierter dsRNA

Die Kriterien der Eignung eines Fluorophors für FCS-Messungen wurden in Kapitel 2.2.5.1. diskutiert. Vor allem ein hoher Extinktionskoeffizient, eine hohe Quantenausbeute sowie eine hohe Photostabilität zeichnen ein für FCS geeignetes Fluorophor aus. Eine hohe Photostabilität verhindert ein ausgeprägtes Besetzen des Triplettzustandes und ermöglicht so genaue FCS-Messungen (Kap. 2.2.5.1. und 2.2.5.3.). Weil Triplettanteil  $T_T$  oder –zeit  $\tau_T$ sensitiv für Veränderung der Mikroumgebung sind [126, 128] könnte es in Messungen in lebenden Zellen oder Zellextrakten zu einer zusätzlichen Erhöhung dieser Parameter kommen. Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit gemacht (Kap. 3.1.3. und 3.1.4.). Die Cy5-markierte dsRNA wies einen relativ hohen Triplettanteil auf, der in der Autokorrelationsfunktion im Bereich zwischen 1 bis 10 µs gut erkennbar ist (**Abb. 17**).

Markierung	Absorptions- maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)	Extinktionskoeffizient $\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Quantenausbeute	
Cy5	649	670	2,5 x 10 <sup>5</sup>	0,28	
Atto647N	644	669	1,5 x 10 <sup>5</sup>	0,65	

#### Tabelle 7 Spektrale Eigenschaften von Cy5 und Atto647N

Eine ausgeprägte Tendenz von Cy5 zu Fluoreszenzintensitätsfluktuationen, die von einer cis/trans-Isomerisierung verursacht wurden und eine Relexationszeit im Bereich der Singulett-Triplett-Wechselwirkung aufweisen, wurde in einer früheren Studie beobachtet [170]. Die photoinduzierte cis/trans Isomerisierung bedeutet einen Wechsel zwischen nicht fluoreszierendem und fluoreszierendem Zustand. Das Modell der ConfoCor2-Software (Glg. 3) beschreibt diesen Prozess nur ungenügend. Damit könnte u.U. auch die Analyse der Diffusionszeit beeinträchtigt sein. Im Folgenden wurden jedoch die Fluoreszenzintensitätsfluktuationen im Bereich der Triplettzeit vereinfacht als Triplettparameter bezeichnet, da sie als solche durch das Modell ausgegeben wurden. Weil eine hohe Genauigkeit in den in vitro-Messungen angestrebt wurde und eine Anwendung des assays in zellulärer Umgebung erfolgen sollte, wurde Atto647N, ein Fluorophor von hoher photochemischer Stabilität und damit geringerer Tendenz zur Besetzung des Triplettzustandes oder anderen zusätzlichen Fluoreszenzintensitätsfluktuationen im Bereich der Triplettzeit, als terminale Markierung des 26 Nukleotide enthaltenden RNA-Einzelstranges getestet [133]. Die spektralen Eigenschaften von Cy5 und Atto647N sind in Tabelle 7 aufgeführt (siehe Kap. 2.2.5.). Atto647N und Cy5 haben nahezu identische Absorptions- und Emissionsmaxima. Atto647N weist zwar einen etwas geringeren Extinktionskoeffizienten wie Cy5 auf, jedoch eine etwa

doppelt so hohe Quantenausbeute. Dies bedeutet, dass die Anzahl emittierter Photonen bei gleicher Anzahl absorbierter Photonen erheblich höher ist. Weil mittels FCS einzelne Moleküle detektiert werden und die Zahl emittierter Photonen pro Molekül begrenzt ist, ermöglicht eine höhere Quantenausbeute ein besseres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis.

Die spektralen Eigenschaften eines Fluorophors können sich nach kovalenter Bindung an ein Protein oder eine Nukleinsäure verändern. Deshalb wurden neben den bekannten spektralen Eigenschaften der Fluorophore auch die experimentell bestimmten FCS-Parameter Triplettanteil und –zeit der unterschiedlich markierten dsRNA verglichen. Diese sind in **Tabelle 8** aufgeführt.

Tabelle 8	FCS-Parameter von Cy5- und Atto647N-markierter dsRNA				
Markierung	τ <sub>Diff</sub> (μs)	D (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>τ</sub> (µs)	f <sub>1(Produkt)</sub> (%)
Cy5	163 ± 10	0,96 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,04 x 10 <sup>-10</sup>	$38\pm3$ *	5 ± 2 *	49 ± 1
Atto647N	$165\pm3$	0,95 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,02 x 10 <sup>-10</sup>	9 ± 1	$8\pm 2$	$15\pm 6$

\* Relaxationszeit beschreibt Singulett-Triplett-Wechselwirkung und cis/trans-Isomerisierung

FCS-Daten von Cy5- und Atto647N-markierter dsRNA wurden experimentell bestimmt (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten  $\tau_{\text{Diff}}$  (22 °C; Glg. 3), D (22 °C; Glg. 5), T <sub>T</sub> und  $\tau_{\text{T}}$  wurden mittels eines *Fitting*-Modelles für eine Diffusionsspezies errechnet (Glg. 3 mit n = 1), f<sub>1(Produkt)</sub> wurde nach dem Fitten an ein Modell für zwei Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 2) nach Fixieren der Produktdiffusionszeit bestimmt. Arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet.

Die Versuche mit Atto647N-markierter dsRNA und rekombinatem Dicer sind in Kapitel 3.1.2.6. – 3.1.2.9. ausführlich dargestellt. In diesem Kapitel soll ausschließlich der Vergleich zur Cy5-markierten RNA erfolgen. Die Triplettzeiten der unterschiedlich markierten dsRNA befanden sich mit 5 und 8 µs in einer ähnlichen Größenordnung. Atto647N-markierte dsRNA wies mit 9 % jedoch einen erheblich geringeren Triplettanteil als die Cy5-markierte dsRNA mit 38 % auf.

Auch in den Autokorrelationsfunktionen ist dies erkennbar (**Abb. 17** und **22a**; Vergleich mit dem Schema in **Abb. 9**). Die Abweichungen der mittels Gleichung 3 (n = 1) *gefitteten* von der experimentell bestimmten Autokorrelationsfunktion waren bei Atto647N-markierter dsRNA geringer als bei Cy5-markierter dsRNA (**Abb. 17** und **22a**). Dies weist auf eine höhere Qualität des *fits* aber auch auf eine höhere Messgenauigkeit hin.

Die verschieden markierte dsRNA wies nahezu übereinstimmende Diffusionszeiten mit 165  $\mu$ s und 163  $\mu$ s auf (**Tab. 8**). Nach Anwendung des *Fitting*-Modells für zwei Diffusionsspezies bei fixierter Produktdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 2) wurde für Atto647N-markierte dsRNA mit 15 % ein erheblich geringerer Basisproduktanteil f<sub>1(Produkt)</sub> als mit 49 % für Cy5-markierte dsRNA gefunden (**Tab. 8**). Aufgrund des großen Unterschiedes im

Triplettanteil wurde vermutet, dass die verstärkte Tendenz zur Spinumkehr eine ungenauere Differenzierung zwischen Diffusionsspezies bewirken könnte (Kap. 2.2.5.3.).



Abbildung 20 FCS-Kinetik von Atto647N-markierter dsRNA nach Zugabe von Dicer

a) Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  von Atto647N-markierter dsRNA (5 nM) nach Zugabe von rekombinantem humanen Dicer (0,25 U; Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.; 30 °C). Die Date n wurden an ein Modell für eine Diffusionsspezies *gefittet* und gegen die Zeit aufgetragen (Glg. 3 mit n = 1). b) Die Daten wurden an ein Modell für zwei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und Substratdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 2) *gefittet*. Der Produktanteil f<sub>1(Produkt)</sub> wurde in Abhängigkeit von der Zeit an eine exponentielle Funktion *gefittet* (Glg. 19). c) Die Zählrate. Arithmetische Mittelwerte wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

Die vollständige Spaltung von Atto647N-markierter dsRNA konnte analog zu der Spaltung von Cy5-markierter dsRNA durch eine Abnahme der Diffusionszeit und Zunahme des Produktanteils verfolgt werden, wobei entsprechend der hohen Photostabilität von Atto647N keine signifikante Veränderung der Zählrate oder molekularen Zählrate zu beobachten war (< 10 %; **Abb. 20**).

Die Diffusionszeiten nach vollständiger Restriktion von Atto647N- und Cy5-markierter dsRNA unterschieden sich mit 76 µs und 83 µs geringfügig (**Tab. 9**). Die Diffusionszeiten von einem chemisch synthetisierten Atto647N- und Cy5-markierten 5 Nukleotide enthaltenden ssRNA-

Fragment, dem putativen fluoreszenzmarkierten Produkt (siehe **Abb. 14b**), wiesen mit 76 µs und 79 µs ebenfalls geringfügig unterschiedliche Diffusionszeiten auf (**Tab. 9**). Diese Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen photochemischen Eigenschaften und Molekulargewichte der an die RNA kovalent gebundenen Fluorophore erklärt werden (**Tab. 8** und **9**). Die ssRNA ergab eine vergleichbare Singulett-Triplett-Wechselwirkung wie die dsRNA (**Tab. 8** und **9**). Atto647N- und Cy5-markierte RNA wiesen demzufolge vergleichbare Substrat- und Produkt-Diffusionszeiten auf. Die Mobilität der Cy5-markierten RNA scheint somit trotz der ungenügenden Beschreibung der cis/trans-Isomerisierung durch Gleichung 3 eine relativ hohe Genauigkeit aufzuweisen. Aufgrund des geringeren Triplett- und Basisproduktanteils von Atto647N-markierter RNA wurden alle folgenden Experimente mit Atto647N-markierter RNA durchgeführt.

Markierung	τ <sub>Diff</sub> (μs)	D (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>τ</sub> (μs)
Cy5 <sup>+</sup>	83 ± 2	1,88 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,04 x 10 <sup>-10</sup>	40 ± 4 *	2,1 ± 0,3 *
Cy5	$79\pm2$	$1,98 \times 10^{-10} \pm 0,06 \times 10^{-10}$	40,7 ± 0,2 *	3,8 $\pm$ 0,4 $^{*}$
Atto647N <sup>+</sup>	77 ± 4	2,11 x $10^{-10} \pm 0,11$ x $10^{-10}$	11 ± 1	7 ± 2
Atto647N	76 ± 4	2,05 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,11 x 10 <sup>-10</sup>	3 ± 1	3 ± 1

#### Tabelle 9 FCS-Parameter von Cy5- und Atto647N-markierter ssRNA

\* Relaxationszeit beschreibt Singulett-Triplett-Wechselwirkung und cis/trans-Isomerisierung

FCS-Daten von Cy5- und Atto647N-markierter 5 Nukleotide enthaltender ssRNA und Fragmenten nach Spaltung von dsRNA durch rekombinanten Dicer (<sup>+</sup> = Produkt) wurden experimentell bestimmt (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten  $\tau_{\text{Diff}}$ , D, T<sub>T</sub> und  $\tau_{\text{T}}$  wurden mittels eines *Fitting*-Modelles für eine Diffusionsspezies errechnet (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet.

#### 3.1.2.5. Reinheit des rekombinanten Dicer

Die Reinheit von rekombinant hergestelltem und käuflich erworbenem humanem Dicer wurde mittels Silberfärbung überprüft. Man konnte nur eine Bande auf dem silbergefärbten SDS-Gel oberhalb der Markerbande von 200 kDa sehen (**Abb. 21**). Die Versuche mit Cy5-markierter RNA wurden mit diesem nachweislich reinen rekombinanten Dicer von Stratagene und Peqlab durchgeführt. Die dritte Diffusionsspezies bzw. die Diffusionsspezies nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> anstelle von MgCl<sub>2</sub> könnte deshalb identisch mit dem ES-Komplex sein (**Abb. 18b** und **19a** und **d**).

Die Versuche ab Kapitel 3.1.2.6. wurden mit einer anderen Charge von Dicer von der Firma Peqlab durchgeführt. Die Reinheit dieses Enzyms war geringer (Daten nicht gezeigt). Es wurden mit beiden Versuchsreihen vergleichbare Produktdiffusionszeiten bestimmt. Jedoch traten bei Verwendung der neuen Charge von rekombinantem Dicer vermehrt hochmolekulare unspezifische Aggregate auf, die die Diffusionszeitenanalyse aufwendig gestalteten und die höhere Standardabweichungen verursachten (siehe **Abb. 23**). Deshalb wurden in den folgenden Experimenten teilweise Einzelwerte analysiert.



Tabelle 10

#### Abbildung 21 SDS-PAGE von rekombinantem Dicer

Rekombinanter Dicer (0,5 U) von Stratagene (Bahn 2) und Peqlab (Bahn 3) wurde auf ein 7,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 150 V elektrophoretisch getrennt (Kap. 2.2.3.1.). In Bahn zwei ist der *PAGE-Ruler<sup>TM</sup> Unstained Protein-Ladder* zu sehen. Das Gel wurde silbergefärbt (Kap. 2.2.3.3.). Dieser Versuch wurde von Herrn Dr. Patrick Ziegelmüller durchgeführt.

## 3.1.2.6. Diffusionszeiten von Atto647N-markiertem Substrat und Produkt

Die Diffusionszeit von Atto647N-markiertem Substrat wurde vor Zugabe von humanem, rekombinant hergestelltem Dicer in einem *Fitting*-Modell für eine Diffusionspezies auf 165  $\mu$ s bestimmt (Glg. 3 mit n = 1; Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Theoretisch (Glg. 5, 9 und 10) und experimentell ermittelte Diffusionszeiten der dsRNA stimmten in hohem Maß überein (**Tab. 10**).

RNA	Enzym	Fluoreszierende RNA (nt)	Theorie τ <sub>Diff</sub> (μs)	τ <sub>Diff</sub> (µs)	Experiment D (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
ssRNA	-	5	65	76 ± 4	2,05 x 10 <sup>-10</sup> ±0,11 x 10 <sup>-10</sup>
dsRNA	-	22 + 26	167	$165\pm3$	$0,95 \ge 10^{-10} \pm 0,02 \ge 10^{-10}$
dsRNA	Dicer	5	65	76 ± 5	2,05 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,13 x 10 <sup>-10</sup>

Diffusionszeiten von Atto647N-markierter RNA

Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  und Diffusionskoeffizienten D von Atto647N-markierter ssRNA und dsRNA wurden theoretisch vorhergesagt (Glg. 5, 9 und 10) bzw. experimentell mittels FCS ohne und nach Inkubation (etwa 1h) mit rekombinantem humanen Dicer bestimmt (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten wurden im Gleichgewichtszustand aufgenommen und mittels eines *Fitting*-Modelles für eine Diffusionsspezies ermittelt (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet.

a)

b)

In Abbildung 22a sind die enprechenden Autokorrelationsfunktionen dargestellt.



## Abbildung 22 Autokorrelationsfunktionen von Atto647N-markierter dsRNA und von dsRNA nach vollständiger Restriktion durch Dicer

a) Die bei 0,2  $\mu$ s normalisierten Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von Atto647N-markierter dsRNA (offene Symbole) und von Atto647N-markierter dsRNA nach vollständiger Restriktion durch humanen rekombinanten Dicer (gefüllte Symbole) (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). b) Die bei 0,2  $\mu$ s normalisierten Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) der 5 Nukleotide enthaltenden Atto647N-markierten ssRNA (offene Symbole) und des Spaltproduktes von Dicer (aus a, gefüllte Symbole). Die Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von den Ergebnissen eines *fits* an ein Modell für eine Diffusionsspezies sind unterhalb der jeweiligen Autokorrelationsfunktion dargestellt (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

77

Die Abweichungen der mittels Gleichung 3 (n = 1) *gefitteten* von der experimentell bestimmten Autokorrelationsfunktion waren gering. Die Produktdiffusionszeit von 76  $\mu$ s ergab sich nach Zugabe des Enzyms nach vollständiger Restriktion des Substrates ebenfalls in einem *Fitting*-Modell für eine Diffusionsspezies. Sie war etwas höher als vorhergesagt (**Tab. 10**). Die Genauigkeit der Vorhersage ist für Fragmente mit einem Verhältnis der Länge zum Durchmesser von weniger als 2 eingeschränkt [142]. Die 5 Nukleotide enthaltende RNA befindet sich mit 1,8 im Grenzbereich der Gültigkeit dieser Theorie. Die Produktdiffusionszeit unterschied sich um den Faktor 2,2 von der Substratdiffusionszeit, was eine Differenzierung zwischen beiden Diffusionsspezies in einem *Fitting*-Modell für mehrere Diffusionsspezies ermöglichte (siehe Konzept des *assays*: **Abb. 15**; Glg. 3) [140]. Die molekulare Zählrate des Substrates von 69 ± 4 kHz blieb nach Zugabe von Enzym nahezu unverändert mit 72 ± 13 kHz, wie nach Mittelung der Daten von drei unabhängigen Versuchen festgestellt werden konnte (Zählraten: 453 und 476 kHz) [132, 140]. Die FCS-Parameter aller Experimente von dsRNA mit rekombinantem Dicer sind in **Tabelle 11** aufgeführt.

Dicer	Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>T</sub> (μs)
-	85 ± 1	$257\pm17$	9 ± 1	8 ± 2
+	97 ± 4	$351\pm33$	$12\pm3$	10 ± 6

Tabelle 11 Parameter der FCS-Messungen mit rekombinantem Dicer und dsRNA

Zählrate, molekulare Zählrate, Triplettanteil T<sub>T</sub> und Triplettzeit  $\tau_T$  von fluoreszenzmarkierter dsRNA ohne Enzym und nach Zugabe von rekombinantem Dicer. Die Daten wurden nach vollständigem Schneiden (5 nM Substrat; Kap. 3.1.2.6.) und während Kinetiken (50 nM Substrat; Kap. 3.1.2.9.) generiert. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet. Die Standardabweichungen der einzelnen Experimente wurden gemittelt, um die Entwicklung der Parameter während eines Experimentes zu dokumentieren. Die  $\chi^2$ -Test-Ergebnisse bewegten sich in der Regel zwischen 1 x 10<sup>-5</sup> und 1 x 10<sup>-7</sup>.

Triplettanteil T<sub>T</sub> und –zeit T<sub>T</sub> überschritten nicht die Grenzwerte von 20 - 30 % bzw. 5 - 10  $\mu$ s (Kap. 2.2.5.3.) [132]. Die Zählrate und molekulare Zählrate wiesen hohe Werte auf und ermöglichten damit eine ausreichende Signalintensität. Molekulare Zählraten wie auch die Singulett-Triplett-Wechselwirkung von Substrat ohne und nach Zugabe von Dicer (Kinetiken und Produktdaten) unterschieden sich nicht signifikant [131, 140]. Deshalb konnte Gleichung 3 zur Multikomponentenanalyse angewendet werden [140].

Die Diffusionszeit des enzymatisch hergestellten Produktes war identisch mit der Diffusionszeit des chemisch synthetisierten 5 Nukleotide enthaltenden Fragments, das theoretisch nach enzymatischer Spaltung des Substrats neben einer 21 bp enthaltenden nichtfluoreszierenden dsRNA entstehen würde (Schema: **Abb. 14b**; **Tab. 10**). Dies konnte

auch in den Autokorrelationsfunktionen der chemisch synthetisierten 5 Nukleotide enthaltenden ssRNA und des enzymatisch hergestellten Dicer-Produktes beobachtet werden (**Abb. 22b**). Es wurde deshalb angenommen, dass Dicer das Substrat überwiegend am zwei Nukleotide enthaltenden 3'-Überhang bindet und mit einem Abstand von etwa 21 bp schneidet.

#### 3.1.2.7. Gelelektrophoretische Analyse des Dicer-Produktes

Eine gelelektrophoretische Trennung der Dicer-Produkte bestätigte das Spalten des Substrates durch Dicer und das Entstehen eines im Vergleich zum Substrat signifikant kleineren Hauptproduktes von etwa 85 % (**Abb. 23**, Kap. 2.2.2.7. und 2.2.2.10.).



#### Abbildung 23 Gelelektrophoretische Trennung der Dicer-Produkte

Rekombinater Dicer (0,5 U) wurde zu Atto647N-markiertem dsRNA-Substrat (20  $\mu$ L von 1  $\mu$ M; Kap. 2.1.8) gegeben und bei 37 °C inkubiert. Die chemisch synth etisierte, Atto647N-markierte 5 nt ssRNA (Bahn 1), das Substrat (Bahn 2) und das Substrat nach Inkubation mit Dicer (Bahn 3;  $\tau_{Diff}$  = 77  $\mu$ s) wurden gelelektrophoretisch mittels eines 20 %igen denaturierenden Polyacrylamidgels getrennt (7  $\mu$ L von 1  $\mu$ M; Kap. 2.2.2.7. und 2.2.2.10.). Das Fluoreszenzsignal wurde durch einen *Typhoon 2D* Gel-*Imager* bei 633 nm aufgenommen.

Weniger starke zusätzliche Banden unter- und oberhalb des Hauptproduktes waren zu sehen. Die Bande oberhalb des Hauptproduktes könnte durch das Binden des Substrates am fluoreszenzmarkierten Terminus entstanden sein (Abb. 14b). Verunreinigungen der Stocklösung von rekombinantem Dicer durch weitere RNasen könnten zu den zusätzlich zu sehenden Banden beigetragen haben (siehe Kap. 3.1.2.5.). Die Sensititvität des assays hinsichtlich der Detektion von Nebenprodukten ist im Vergleich zur Gelelektrophorese eingeschränkt. Das enzymatisch entstandene Hauptprodukt (Abb. 23 Bahn 3) zeigte zudem eine geringere gelelektrophoretische Mobilität als das chemisch synthetisierte 5 Nukleotide enthaltende Fragment (Abb. 23 Bahn 1). Hinzuzufügen ist, dass aufgrund der logarithmischen Abhängigkeit der elelektrophoretischen Mobilität Fragmente von geringerem Molekulargewicht stärker aufgetrennt werden als größere Fragmente [147]. Es könnte sich deshalb hierbei um einen nur wenige Nukleotide ausmachenden Unterschied handeln. Eine Ursache für die unterschiedlichen gelelektrophoretischen Mobilitäten von putativem und enzymatisch hergestelltem Produkt könnte die Variabilität von Dicer-Produkten im Bereich zwischen 19 und 23 bp sein. Statt der vorausgesagten 21 bp enthaltenden RNA entstanden u.U. 19 bp enthaltende dsRNA-Fragmente und entsprechend etwas größere, fluoreszierende ssRNA-Fragmente als erwartet. Eine weitere mögliche Ursache wäre ein unvollständiges Denaturieren der RNA vor der Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.7.). Sowohl die enzymatisch hergestellte fluoreszente RNA als auch die chemisch hergestellte RNA wiesen 3'-OH-Termini und Atto647N-markierte 5'-Termini auf.

Ob sich der Unterschied eines einzelnen Nukleotids auf die Diffusionszeit von 5 Nukleotide enthaltenden ssRNA-Fragmenten signifikant auswirkt, wurde im Folgenden überprüft. Die Diffusionszeit einer 6 Nukleotide enthaltenden Atto647N-markierten ssRNA war mit 83  $\pm$  1 µs (0,89 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,03 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) von der Diffusionszeit der 5 Nukleotide enthaltenden Atto647N-markierten ssRNA mit 76  $\pm$  4 µs (0,95 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,02 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) bei unterschiedlicher Sequenz unterscheidbar (Kap. 2.1.9.). Ein Unterschied von einem Nukleotid scheint bei gleicher Fluoreszenzmarkierung dem entsprechend mittels FCS messbar zu sein. Eine gelelektrophoretische Trennung der 5 und 6 Nukleotide enthaltenden ssRNA ergab unter denaturierenden Bedingungen ein schnelleres Laufverhalten der 6 nt ssRNA als der 5 nt ssRNA (**Abb. 24**).



#### Abbildung 24 Gelelektrophoretische Tennung von Atto647N-markierter RNA

Die chemisch synthetisierte Atto647N-markierte 5 nt ssRNA (Bahn 1), 6 nt ssRNA (Bahn 2) und 26 nt ssRNA (Bahn 3) wurden gelelektrophoretisch mittels eines 20 %igen denaturierenden Polyacrylamidgels getrennt (1 µL von 100 µM; Kap. 2.2.2.7.). Das Polyacrylamidgel wurde mittels Ethidiumbromid gefärbt (Kap. 2.2.2.4.).

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Erwartung, dass Moleküle geringeren Molekulargewichts ein schnelleres gelektrophoretisches Laufverhalten zeigen, als Moleküle größeren Molekulargewichts [147]. Es wurde damit gezeigt, dass Laufverhalten in diesem Größenbereich deutlich von der Basenzusammensetzung abhängt. Dieser Unterschied konnte durch ein zusätzliches Nukleotid nicht ausgeglichen werden. Es wurde bereits nachgewiesen, dass bei Molekülen sehr geringer Nukleotidzahl das Laufverhalten erheblich von der Basenzusammensetzung beeinflusst werden kann [171]. Ein Unterschied von ein oder zwei Nukleotiden bei identischer sonstiger Sequenz kann entsprechend zu Unterschieden in der gelelektrophoretische Analyse unter denaturierenden Bedingungen kann demzufolge über die genaue Nukleotidanzahl des Dicer-Produktes keinen sicheren Aufschluss geben. Vielmehr erscheint die Diffusionszeitenanalyse als robustere Methode, um sequenzunabhängig geringe Unterschiede im Molekulargewicht von etwa 5 Nukleotide enthaltenden ssRNA-Molekülen nachzuweisen. Die weitestgehend übereinstimmende

Diffusionszeiten von putativem chemisch synthetisierten und enzymatisch hergestelltem Produkt unter Verwendung von reinem Dicer (**Tab. 9**) weisen auf geringe Molekulargewichtsdifferenzen hin, die u.U. von ein oder zwei zusätzlichen Nukleotiden im Produkt herrühren können (Kap. 3.1.2.4. und 3.1.2.5.).

Aus den Ergebnissen der Gelelektrophorese konnte geschlossen werden, dass ein Produkt von überwiegend einheitlicher Größe nach Spaltung durch Dicer entsteht, das sich zudem von der Größe des Substrates signifikant unterscheidet. Weil damit die wichtigsten Voraussetzungen für eine auf Mobilität basierte Messung der Enzymaktivität gegeben waren, wurde mit diesem Substrat weitergearbeitet.

#### 3.1.2.8. Dicer-Spezifität der RNA-Spaltung und Produktmobilität

Es wurde eine 26 Nukleotide enthaltende ssRNA mit rekombinantem Dicer unter vergleichbaren Bedingungen wie die 26 und 22 Nukleotide enthaltende dsRNA inkubiert.

RNA	Enzym	Fluoreszierende	Theorie		Experiment
		RNA (nt)	τ <sub>Diff</sub> (µs)	τ <sub>Diff</sub> (µs)	D (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
ssRNA	-	26	130	130 ± 5	1,20 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,04 x 10 <sup>-10</sup>
	Dicer	26	130	$132\pm1$	$1,18 \times 10^{-10} \pm 0,01 \times 10^{-10}$
	RNase III	26	130	$138\pm7$	$1,13 \times 10^{-10} \pm 0,05 \times 10^{-10}$
	-	5	65	$76\pm4$	$2,05 \times 10^{-10} \pm 0,11 \times 10^{-10}$
dsRNA	-	22 + 26	167	$165\pm3$	$0,95 \times 10^{-10} \pm 0,02 \times 10^{-10}$
	Dicer	5	65	$76\pm5$	$2,05 \times 10^{-10} \pm 0,13 \times 10^{-10}$
	RNase III	12 + 8	120	129 ± 11	1,21 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,10 x 10 <sup>-10</sup>

## Tabelle 12 Diffusionszeiten von Atto647N-markierter RNA ohne und nach Inkubation mit Dicer oder RNase III Dicer oder RNase III

Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  (Glg. 3) und Diffusionskoeffizienten D (Glg. 5) von Atto647N-markierter ssRNA und dsRNA wurden theoretisch vorhergesagt (Glg. 5, 9 und 10) bzw. experimentell mittels FCS ohne und nach Inkubation mit rekombinantem humanen Dicer oder *E.coli* RNase III bestimmt (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten wurden im Gleichgewichtszustand aufgenommen und mittels eines *Fitting*-Modelles für eine Diffusionsspezies ermittelt (Glg. 3 mit n = 1; D: Glg. 3 - 5). Es wurden arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) berechnet.

Die Diffusionszeit der ssRNA wurde durch Zugabe von Dicer nicht verringert ( $\tau_{Diff}$  = 130 µs und 132 µs, **Tab. 12**). Die Autokorrelationsfunktion von ssRNA wies ebenfalls keine signifikante Veränderung vor und nach Inkubation mit Dicer auf (**Abb. 25** und Kap. 3.1.2.9.). Demzufolge konnte die Spezifität von Dicer für dsRNA im FCS-*Assay* in Übereinstimmung mit früheren Studien festgestellt werden [16]. Die Diffusionszeit der ssRNA war zudem identisch mit der theoretisch vorhergesagten Diffusionszeit (**Tab. 12**).



#### Abbildung 25 Autokorrelationsfunktion von Atto647N-markierter ssRNA vor und nach Inkubation mit Dicer

Die bei 0,2  $\mu$ s normalisierten Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von Atto647N-markierter 26 Nukleotide enthaltender ssRNA vor (offene Symbole) und nach Inkubation mit humanem rekombinanten Dicer (gefüllte Symbole) (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von den Ergebnissen eines *fits* an ein Modell für eine Diffusionsspezies sind unterhalb dargestellt (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 (a und b) und Standardabweichungen nach Gleichung 18 (a) berechnet.

Um die Dicer-Aktivität von unspezifischem Abbau unterscheiden zu können, wurde exemplarisch die RNase mit der höchsten Übereinstimmung in Substratspezifität und enzymatischem Mechanismus im *assay* getestet, die bakterielle RNase III (siehe auch Kap. 1.2. und 3.1.2.2.) [36, 37]. Die Gene von RNase III und Dicer sind ortholog.

Nach Inkubation von dsRNA mit *E. coli* RNase III wurde ein deutlicher Abfall der Diffusionszeit gemessen. Nach Einstellung eines Gleichgewichts, d.h. nachdem die Diffusionszeit sich zeitlich nicht mehr veränderte, wurde die RNase III-Produktdiffusionszeit bestimmt.



Abbildung 26 Autokorrelationsfunktionen von RNA vor und nach Inkubation Zugabe von Dicer oder RNase III

a) und b) Die bei 0,2  $\mu$ s normalisierten Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von Atto647N-markierter dsRNA (a) bzw. ssRNA (b) (schwarze offene Quadrate) und von Atto647N-markierter dsRNA (a) bzw. ssRNA (b) nach Inkubation mit humanem rekombinanten Dicer (rote gefüllte Quadrate) oder *E. coli* RNase III (blaue gefüllte Dreiecke) (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von den Ergebnissen eines *fits* an ein Modell für eine Diffusionsspezies sind unterhalb der jeweiligen Autokorrelationsfunktion dargestellt (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

a)

b)

Das Produkt von RNase III wies mit 129 µs eine ähnliche Diffusionszeit auf wie der theoretisch berechnete Wert von 120 µs für ein aus 12 und 8 Nukleotiden bestehendes dsRNA-Fragment (**Tab. 12**). Dieses wäre bei 22 °C thermodynamisch stabil. Zu m Vergleich ist die Diffusionszeit des Dicer-Produktes in **Tabelle 12** aufgeführt. Es weist mit 76 µs einen signifikant geringeren Wert auf.

Auch die Autokorrelationsfunktionen von dsRNA, Dicer-Produkt und RNase III-Produkt unterschieden sich signifikant voneinander (**Abb. 26a**). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass sich die mittels Produktmobilität bestimmte Aktivität von Dicer von der Aktivität von RNase III unterscheiden läßt.

Die 26 Nukleotide enthaltende ssRNA wurde unter identischen Bedingungen mit RNase III inkubiert wie die dsRNA. Die Diffusionszeiten der ssRNA änderten sich nach Inkubation mit RNase III nicht signifikant (**Tab. 12**). Dies ist auch in den Autokorrelationsfunktionen erkennbar (**Abb. 26b**).

Ago2 ähnelt in seiner Aktivität RNase III-Enzymen [172]. Obwohl Ago2 in erster Linie mRNA, die an siRNA hybridisiert ist, spaltet, kann das Enzym auch den Einzelstrang einer 21 bp enthaltenden dsRNA spalten, sodass ein 9 Nukleotide und 12 Nukleotide enthaltendes ssRNA-Fragment entsteht. Der nichtfluoreszierende RNA-Einzelstrang des Dicer-Substrates würde vermutlich an Ago2 als *guide strand* binden. Da der 5'-Terminus der markierten ssRNA anstelle eines OH<sup>-</sup> ein Fluorophor trägt, ist die Wahrscheinlichkeit verringert, dass dieser als *guide strand* fungiert [173]. Nach Schneiden durch Ago2 würde ein Produkt von geringerer Mobilität als das Dicer-Produkt entstehen. Daraus konnte gefolgert werden, dass die Dicer-Aktivität in zellulärer Umgebung spezifisch messbar sein sollte.

# 3.1.2.9. Kinetik der RNA-Spaltung von Atto647N-markierter dsRNA und Diffusionszeit des ES-Komplexes

Die Analyse der Kinetik der Spaltung von dsRNA durch Dicer ergab Hinweise auf eine zusätzliche höhermolekulare Diffusionsspezies. Nach Zugabe von rekombinatem Dicer zu ssRNA oder dsRNA wurde die Diffusionszeit mittels FCS gemessen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in **Abbildung 27** dargestellt. Im Zeitverlauf der Dicer-Reaktion konnte nach dem *fitten* der FCS-Daten an ein Modell für eine Diffusionsspezies eine vorüber-gehende Erhöhung der Diffusionszeit von dsRNA und ssRNA auf Werte von etwa 300 µs beobachtet werden (**Abb. 27a** und **b**). Es wurde auf die vorübergehende Bildung eines dsRNA- oder ssRNA-Dicer-Komplexes geschlossen. Der dsRNA-Dicer-Komplex könnte aufgrund der dsRNA-Spezifität von Dicer ein ES-Komplex sein. Eine Bindung von ssRNA an humanen Dicer wurde bereits früher beobachtet [174]. Das 5'-terminale Fluorophor könnte die Bindung an das Enzym destabilisieren [174] und somit eine längerfristige Erhöhung der Diffusionszeit verhindern.

Die Diffusionszeit von ssRNA verringerte sich nach Zugabe von Dicer nicht (**Abb. 27a**), während die Diffusionszeit der dsRNA nach einer vorübergehenden Erhöhung nach Zugabe von humanem Dicer abfiel und sich der Produktdiffusionszeit annäherte (**Abb. 27b**). Ohne Dicer-Zugabe blieb die Diffusionszeit der dsRNA konstant (**Abb. 27b**). Ein Basisproduktanteil von 15 % wurde bestimmt, der sich im Laufe der Messzeit nicht veränderte (**Abb. 27c**).

Durch ein Fitten der Daten an ein Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und Substratdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 3) konnten Produkt- und Substratmobilitäten von höheren Diffusionsspezies unterschieden und die Produktbildung bestimmt werden (Abb. 27d). Der Produktanteil erhöhte sich von 15 auf etwa 100 %. Der Substratanteil verringerte sich entsprechend (Daten nicht gezeigt). Die Diffusionszeit der dritten Komponente wies mit hoher Häufigkeit Werte im Bereich zwischen 200 und 400 us auf (Abb. 27e). Die Häufigkeitsverteilung der Diffusionszeiten der dritten Diffusionsspezies war breiter als die Verteilung der dritten Diffusionsspezies von Cy5-markierter dsRNA nach Zugabe von reinem rekombinantem Dicer (Abb. 28a und 18b). Eine Ursache könnte die geringere Reinheit des Enzyms in dem Versuch mit Atto647N-markierter dsRNA sein. Der Bereich zwischen 220 und 360 µs wurde mittels eines kleineren Intervalls genauer untersucht (Abb. 28b). Ein Maximum zwischen 260 und 280 µs wurde bestimmt. Aufgrund einer nahezu symmetrischen Verteilung wurde ein Mittelwert errechnet. Es ergab sich eine Diffusionszeit von 271 ± 34 µs (D = 0.58 x  $10^{-10} \pm 0.07$  x  $10^{-10}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; Glg. 5). Diese ähnelt der theoretischen Diffusionszeit von 294 µs. Sie stimmt mit der mit mittels Cy5-markierter dsRNA bestimmten Diffusionszeit überein.



Abbildung 27 FCS-Kinetik von Atto647N-markierter RNA ohne und nach Zugabe von Dicer

Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  von 5 nM Atto647N-markierter ssRNA (a) und 50 nM Atto647N-markierter dsRNA (b) ohne Zugabe (offene Symbole) und nach Zugabe von rekombinantem humanen Dicer (geschlossene Symbole) (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten wurden an ein Modell für eine Diffusionsspezies *gefittet* (Glg. 3 mit n = 1). c) Das *Fitten* der Daten von dsRNA ohne Dicer an ein Modell für zwei Diffusionsspezies mit fixierter Produktdiffusionszeit ergab den Produktanteil f<sub>1(Produkt)</sub> (Glg. 3 mit n = 2). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 und 18 berechnet. Die weitere Analyse wurde mittels der Einzelwerte durchgeführt. d und e): *Fitten* der Daten von dsRNA nach Dicer-Zugabe an ein Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Substrat- und Produktdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 3). d) Produktanteil f<sub>1(Produkt)</sub>. e) Diffusionszeit der dritten Komponente  $\tau_{\text{Diff},3(\text{ES-Komplex})}$  im Bereich von theoretisch berechneten ES-Komplex-Diffusionszeiten. f) *Fitten* der Daten an ein Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter ES-Komplex- und Produktdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 3). Die Diffusionszeiteneinzelwerte der dritten Komponente  $\tau_{\text{Diff},3(\text{Substrat})}$  traten im Bereich der Substratdiffusionszeit auf. Als Kontrolle wurde auf die kinetischen Daten ein *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und ES-Komplex-Diffusionszeit angewendet. Die Diffusionszeit der dritten Komponente wies, in Übereinstimmung mit der Vorstellung einer Lösung aus fluoreszenzmarkiertem Substrat, Produkt und ES-Komplex, hauptsächlich Werte im Bereich der Substratdiffusionszeit auf (**Abb. 27f**). Aufgrund der 1,6- und 3,6-fach höheren Diffusionszeit des ES-Komplexes im Vergleich zu Substrat und Produkt scheint es somit möglich zu sein, den ES-Komplex von Substrat und Produkt durch ein *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies zu unterscheiden (siehe Konzeption des *assays* in **Abb. 15**) [140].



Abbildung 28 Histogramm der Diffusionszeiten der dritten Diffusionsspezies

FCS-Messung von 50 nM Atto647N-markierter dsRNA (Versuch aus **Abb. 27**) nach Zugabe von rekombinantem humanen Dicer (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Ein *Fitten* der Daten an ein Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Substrat- und Produktdiffusionszeit erfolgte (Glg. 3 mit n = 3). a) Die Häufigkeitsverteilung der Diffusionszeiten der dritten Komponente  $\tau_{\text{Diff},3(\text{ES-Komplex})}$  ist abgebildet (Intervall = 20 µs). b) Die Häufigkeitsverteilung von  $\tau_{\text{Diff},3(\text{ES-Komplex})}$  im Bereich zwischen 220 und 360 µs ist dargestellt (Intervall = 10 µs).

Ein hydrodynamischer Radius des ES-Komplexes von  $3,7 \pm 0,5$  nm wurde berechnet (Glg. 8). Weil über das Holoenzym humaner Dicer keine Strukturinformationen bekannt sind, kann dieser Wert nicht im Vergleich zu Literaturwerten diskutiert werden.

Durch Ersatz von MgCl<sub>2</sub> durch 25 mM CaCl<sub>2</sub> konnte die Spaltung von dsRNA, in Übereinstimmung mit den Versuchen mit Cy5-markierter dsRNA gehemmt werden (Kap. 3.1.2.3.). Die geringere Reinheit des Enzyms, das in diesen Versuchen verwendet wurde, könnte die etwas höheren durchschnittlichen Diffusionszeiten von etwa 350  $\mu$ s verursacht haben (Kap. 3.1.2.5.). In drei unabhängigen Experimenten wurde die Diffusionszeit von 5 nM dsRNA direkt nach Zugabe von Dicer und nach einer Stunde gemessen. Es wurde mit 353  $\pm$  27  $\mu$ s und 366  $\pm$  104  $\mu$ s keine Veränderung festgestellt. Auch der Produktanteil veränderte sich nicht. In **Abbildung 29** sind die Kinetiken zweier Einzelexperimente zu sehen, unter Verwendung von 25 mM CaCl<sub>2</sub> oder 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Es ergab sich somit ein zu Cy5-markierter dsRNA vergleichbares Ergebnis (**Abb. 19a**).



Abbildung 29 Detektion eines höhermolekularen Komplexes mit Atto647N-markierter dsRNA nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> und Dicer

FCS-Messung von 5 nM Atto647N-markierter dsRNA nach Zugabe von rekombinantem humanen Dicer (0,25 U) und von 25 mM CaCl<sub>2</sub> (offene Punkte) oder 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (gefüllte Quadrate) (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.; 22 °C). Die Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$ , die nach dem *Fitten* der Daten an ein Modell für eine Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 1) bestimmt wurden, wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten nach Zugabe von 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> wurden an einen exponentiellen Algorithmus *gefittet* (Glg. 19).

Die Ergebnisse der mit Cy5-markierter dsRNA und nachweislich reinem Enzym durchgeführten Versuche, sind konsistent mit den Ergebnissen der Versuche mit Atto647Nmarkierter dsRNA und weniger reinem Enzym (Kap. 3.1.2.2. und 3.1.2.5.). Es wurde daraus geschlossen, dass während der Spaltung von dsRNA durch Dicer mit Hilfe der Diffusionszeit der dritten Diffusionsspezies der ES-Komplex detektiert werden konnte. Mit der mittels Atto647N-markierter dsRNA bestimmten Diffusionszeit von 271 µs wurde unter der Voraussetzung eines geringen Anteils hochmolekularer Komplexe im Folgenden in Zellextrakten die Konzentration des ES-Komplexes bestimmt (Kap. 3.1.3.4.).

### 3.1.3. Dicer-Aktivität in Zellextrakten

Aufgrund der geringen Aktivität von gereinigtem Dicer und der Identifizierung von zahlreichen Kofaktoren, die z.T. die Aktivität von Dicer verändern können, sollte die Katalyse von Dicer in Gegenwart stöchiometrischer Mengen zytosolischer Komponenten aus Zellextrakten charakterisiert werden (Kap. 1.2.).

#### 3.1.3.1. Klonierung des Dicer-Gens in einen Expressionsvektor

Um das humane Dicer-Gen in menschlichen Zellinien exprimieren zu können, wurde dieses aus dem Vektor Dicer\_pBlueskript II SK(+) [104] geschnitten und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert (Dicer-Sequenz: siehe Anhang). Der Vektor Dicer\_pBlueskript II SK(+) (8.650 bp) enthielt die Dicer-kodierende DNA-Sequenz von etwa 5.770 bp und sechs Histidin-Aminosäuren am C-Terminus [104]. Dicer\_pBlueskript II SK(+) wurde mit NotI und KpnI geschnitten. Nach vollständiger Restriktion wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (**Abb. 30a**; Kap. 2.2.2.12., 2.2.2.4. und 2.2.2.11.).





Gelelektrophoretische Trennung von Dicer\_pBlueskript II SK(+) (a) und Dicer\_pcDNA3.1(+) (b) in einem 1 % igen Agarosegel (Kap. 2.2.2.11. und 2.2.2.4). In Bahn 1 wurde der Größenstandard *Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder 1 kb* aufgetragen. a) Dicer\_pBlueskript II SK(+) wurde ungeschnitten (Bahn 2) oder nach vollständiger Restriktion mit KpnI und NotI (Bahn 3) aufgetragen (Kap. 2.2.2.12.). b) Dicer\_pcDNA3.1(+) wurde ungeschnitten (Bahn 2) oder nach vollständiger Restriktion mit Xbal (Bahn 3) aufgetragen.

Das Insert (etwa 5.770 bp) wurde präparativ gereinigt (Kap. 2.2.2.12.). pcDNA3.1(+) wurde ebenfalls mit KpnI und NotI geschnitten und der linearisierte Vektor präparativ gereinigt.
Nach Ligation von Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:1 bis 1:5 wurden *E. coli* -Zellen transformiert (Kap. 2.2.2.13. - 2.2.2.15.).

1	10		20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
AYLI	LQAFTHA	SYHYNTII	IDCYQRL	EFLGDAI	LDYLITKHLYE	SPGYLTE DPRQHSPGYLTE SPGYLTE	)LRSALYNNTJ )LRSALYNNTJ )LRSALYNNTJ	(Faslavky) (Faslavky) (Faslavky)	)Yhkyfkavsp )Yhkyfkavsp )Yhkyfkavsp	ELFHYIDDFY( ELFHYIDDFY( ELFHYIDDFY(	QFQLEKNEMQ Qfqleknemq Qfqleknemq	GHDSELRRSEE GHDSELRRSEE GHDSELRRSEE	DEEKEEDIE DEEKEEDIE DEEKEEDIE	vpkangd vpkangd vpkangd
131	140	1	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
IFE IFE IFE	SLAGAIY) SLAGAIY) SLAGAIY)	1DSGMSLE 1DSGMSLE 1DSGMSLE	TYHQYY Tyhqyy Tyhqyy	YPHNRPL: YPHNRPL: YPHNRPL:	IEKFSANYPRS IEKFSANYPRS IEKFSANYPRS	PVRELLEMEPE1 PVRELLEMEPE1 PVRELLEMEPE1	(AKFSPAERT) (AKFSPAERT) (AKFSPAERT)	/DGKYRYTYE /DGKYRYTYE /DGKYRYTYE	VVGKGKFKGV VVGKGKFKGV VVGKGKFKGV	GRSYRIAKSAI GRSYRIAKSAI GRSYRIAKSAI	AARRALRSLK AARRALRSLK AARRALRSLK	anqpqypnshi Anqpqypns Anqpqypns	ІННННАА́АТА	VELQLLL
261   PFS	270 1 Exlrgfa													
•••	•••••													
Ak	bildu	ng 31	Am	inosä	ureseque	nz-Alignr	<i>nent</i> der	Sequer	zierung	von Dice	r_pcDN	A3.1(+) m	it der D	icer-



Dicer\_pcDNA3.1(+) Klon K33 (obere Reihe) wurde mit Hilfe des *reverse primers* BGH poly A-Pr sequenziert und in die Aminosäuresequenz übersetzt (Kap. 2.2.2.16.). Mittels *MultiAlin* wurde anschließend ein *Alignment* mit der Dicer-Proteinsequenz (mittlere Reihe) durchgeführt. Die Konsensus-Sequenz ist in der unteren Reihe zu sehen, wobei übereinstimmende Aminosäuren rot gekennzeichnet sind. Am C-Terminus der Dicer-Sequenz von Dicer\_pcDNA3.1(+) schließen sich sechs Histidine an.

Ampicillin-resistente Klone wurden in einer Übernachtkultur amplifiziert und die gereinigte Plasmid-DNA analytisch mit Xbal geschnitten. Erwartet wurden für das Plasmid Dicer\_pcDNA3.1(+) DNA-Fragmente von etwa 2.360 bp und 8.785 bp. Banden in diesem Größenbereich konnten nachgewiesen werden (**Abb. 30b**). Eine Sequenzierung von drei Klonen bestätigte das korrekte Einfügen des Dicer-Gens in pcDNA3.1(+) (Kap. 2.2.2.16.; K15; K20 und K33). Weitere Versuche wurden mit einem dieser Klone, K33, durchgeführt (**Abb. 31**).

#### 3.1.3.2. Überexpression des Dicer-Gens in Säugetierzellinien

Zellen der humanen Zelllinien HeLa und HEK293 (humane embryonale Nierenzellen) wurden mit einem Expressionsvektor, der das Dicer kodierende Gen enthielt (Kap. 3.1.3.1.), transient transfiziert (Kap. 2.2.4.). Die Überexpression des Gens wurde in Ganzzellextrakten mittels eines *Immunoblots* überprüft (**Abb. 32**; Kap. 2.2.3.1. und 2.2.3.2.). Die Gensequenz von Dicer in Dicer\_pcDNA3.1(+) trägt sechs Histidin-Aminosäuren am C-Terminus (**Abb. 31**). Deshalb sollte in HEK293- und HeLa-Extrakten mittels eines Anti-His-*Tag*-Antikörpers das rekombinante Dicer-Protein nachgewiesen werden. Dadurch konnten ausschließlich vollständige Translationsprodukte detektiert werden. Im Molekulargewichtsbereich von humanem Dicer von etwa 220 kDa, d.h. oberhalb der Markerbande von 170 kDa, wurde in mit dem Vektor Dicer\_pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen eine Bande detektiert, jedoch nicht

in mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen (**Abb. 32**). Insgesamt konnte im *Immunoblot* nur eine relativ geringe Menge an rekombinantem Dicer-Protein nach Überexpression des Dicer-Gens nachgewiesen werden. Eine Ursache könnte die geringe Transfektionseffizienz von 15 % sein. Ein gegen GAPDH gerichteter Antikörper sollte den Auftrag gleicher Proteinmengen nachweisen. Dazu wurde die Blot-Membran horzintal unterhalb der 55 kDa-Bande des Größenstandards zerteilt und die Hälfte mit dem kleineren Molekulargewichtsbereich statt mit Anti-His-*Tag*- mit einem Anti-GAPDH-Antikörper inkubiert (Kap. 2.2.3.2.). Der Bereich zwischen den Markerbanden von 35 und 55 kDa, in dem sich die Molekulargewichte der GAPDH-Untereinheiten befinden, ist unterhalb des Dicer-Nachweises in **Abbildung 32** zu sehen. Es konnten vergleichbare Signalstärken in mit dem Vektor Dicer\_pcDNA3.1(+) oder pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen detektiert werden.



Abbildung 32 Immunoblot zum Nachweis der Überexpression des Dicer-Gens

HEK293-Zellen (a) und HeLa-Zellen (b) wurden mit einem leeren (Bahn 3) oder dem Dicer-Gen kodierenden (Bahn 2) Expressionsvektor pcDNA3.1(+) transient transfiziert (Kap. 2.2.4.3.). Ganzzellextrakte hergestellt, denaturiert und elektrophoretisch mittels 7,5 %iger SDS-PAGE getrennt. Dicer wurde in einem *Immunoblot* mittels eines Anti-His-*Tag*-Antikörpers (Kap. 2.2.3.). In Bahn 1 wurde der Größenstandard *PAGE-Ruler™ Prestained Protein Ladder*s aufgetragen. Ein Anti-GAPDH-Antikörper wurde verwendet, um eine vergleichbare Proteinmenge von Kontrollzellen und Dicer überproduzierenden Zellen nachzuweisen (untere Reihe). Die Banden der GAPDH-Untereinheiten befanden sich zwischen 35 und 45 kDa.

#### 3.1.3.3. Zellextraktpräparation

Nachdem immunologisch eine Überexpression des Dicer-Gens und dessen vollständige Translation in rekombinanten Dicer nachgewiesen worden waren, sollte nun die Enzymaktivität in Extrakten dieser Zellen bestimmt werden. Die Überproduktion des Dicer-Proteins sollte durch eine Erhöhung der RNase-Aktivität bestätigt werden. Zytosolische Zellextrakte wurden hergestellt, um die Aktivität der zytosolischen RNase Dicer zu bestimmen (Kap. 2.2.4.3. und Kap. 1.2.). Die Trennung der Kernfraktion vom Zytosol sollte

Membranbestandteile unspezifischer separieren, die bei Bindung v.a. an die fluoreszierenden Spezies zu erheblich hohen Diffusionszeiten beitragen können. Mittels Agarosegelelektrophorese wurde überprüft, ob diese Trennung erfolgreich war (Kap. 2.2.2.11. und 2.2.2.4.). Genomische hochmolekulare DNA sollte ausschließlich im Pellet der Zellextraktpräparation enthalten sein, das auch subzelluläre Strukturen, wie Mitochondrien enthalten sollte, nicht aber im zytosolischen Überstand. In Übereinstimmung mit dieser Erwartung wurde hochmolekulare DNA im Pellet, nicht aber im Überstand gefunden (Abb. 33; Kap. 2.2.2.11.).



#### Abbildung 33 Präparation von zytosolischem Zellextrakt

Gleiche Mengen von zytosolischem Zellextrakt (Bahn 3) und dem Pellet der Reinigungprozedur (Bahn 2) von HEK293-Zellen wurden auf ein 1-% iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt (Kap. 2.2.4.3., 2.2.2.11. und 2.2.2.4). In Bahn 1 wurde der Größenstandard *Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder 1 kb* aufgetragen, dessen größtes DNA-Fragment 10 kb aufweist (siehe Anhang).

Ob Dicer im zytosolischen Zellextrakt gelöst vorlag, konnte im Rahmen weiterführender Versuche mit einem Fusionskonstrukt aus EGFP und Dicer untersucht werden, das in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Patrick Ziegelmüller hergestellt worden war. Die EGFP-Sequenz wurde an den 5'-Terminus des Expressionsvektors Dicer\_ pcDNA3.1(+) unter Verwendung von Nhel und HindIII-Restriktionsschnittstellen kloniert (Daten nicht gezeigt). Eine analytische Agarosegelelektrophorese nach Restriktion des EGFP\_Dicer\_ pcDNA3.1(+) mittels Nhel und HindIII ergab die Fragmentgröße von EGFP von etwa 720 bp und des linearisierten Vektors Dicer\_ pcDNA3.1(+) von etwa 1.120 bp (**Abb. 34**).

HEK293-Zellen wurden mit Dicer\_ pcDNA3.1(+) und EGFP\_Dicer\_ pcDNA3.1(+) transient transfiziert (Kap. 2.2.4.3.). Nach zwei Tagen wurde zytosolischer Zellextrakt gereinigt (Kap. 2.2.4.3.). Der Gesamtproteingehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (Glg. 20). Die Proteinkonzentrationen von Extrakten aus mit Dicer\_ pcDNA3.1(+) und EGFP\_Dicer\_ pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen unterschieden sich nur geringfügig und wurden auf denselben Wert eingestellt. Die Diffusionszeiten der Extrakte wurden mittels FCS gemessen. Während in mit Dicer\_pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen eine geringe Signalintensität gefunden wurde, zeigten EGFP\_Dicer\_ pcDNA3.1(+) transfizierte Zellen eine hohe Signalintensität (**Tab. 13**, Zählrate und molekulare Zählrate).



#### Abbildung 34 Restriktion von EGFP\_Dicer\_pcDNA3.1(+)

Gelelektrophoretische Trennung von EGFP\_Dicer\_pcDNA3.1(+) (Bahn 2) und von EGFP\_Dicer\_pcDNA3.1(+) nach Restriktion mittels Nhel und HindIII (a) oder Xbal (b) in einem 1 %igen Agarosegel (Kap. 2.2.2.11. und 2.2.2.4). In Bahn 1 wurde der Größenstandard *Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder 1 kb* aufgetragen.

In **Abbildung 35a** sind die entsprechenden Autokorrelationsfunktionen dargestellt. Die Abweichungen der *gefitteten* von der experimentell ermittelten Autokorrelaltionsfunktion waren in Messungen von Extrakten von Dicer\_pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen (Kontrolle) erheblich höher als in Extrakten von EGFP\_Dicer\_ pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen (**Abb. 35a**). Die geringe Qualität des *fits* in den Messungen von Kontrollzellextrakten zeigte sich auch im hohen  $X^2$  –Test-Ergebnis von 4,4 x 10<sup>-4</sup> sowie dem Triplettanteil von 92 % (**Tab. 13**).

# Tabelle 13 FCS-Parameter von Zellextrakten nach Transfektion mit EGFP\_Dicer\_ pcDNA3.1(+) Parameter von Zellextrakten nach Transfektion mit EGFP\_Dicer\_

Transfizierter Vektor	Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>T</sub> (µs)	X <sup>2</sup> -Test
Dicer_pcDNA3.1(+)	$13\pm14$	7 ± 0,2	92 ± 4	0,6 ± 0,4	$4,4 \times 10^{-4} \pm 2,7 \times 10^{-3}$
EGFP_Dicer_pcDNA3.1(+)	40 ± 1	96 ± 9	$19\pm5$	3 ± 1	1,6 x 10 <sup>-6</sup> ± 3,8 x 10 <sup>-5</sup>

HEK293-Zellen wurden mit dem Vektor Dicer\_pcDNA3.1(+) oder EGFP\_Dicer\_pcDNA3.1(+) transient transfiziert und es wurden zytosolische Zellextrakte hergestellt (Kap. 2.2.4.). FCS-Messungen von Zellextrakten wurden durchgeführt (Kap. 2.2.5.4.). Zählrate, molekulare Zählrate, Triplettanteil T<sub>T</sub>, Triplettzeit  $\tau_T$  und das Ergebnis des  $X^2$ -Tests von FCS-Messungen von zwei unabhängigen Zellextraktpräparationen wurden durch einen *Fit* an ein Modell für eine Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 1) bestimmt. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet.



# Abbildung 35 Autokorrelationsfunktionen von EGFP und von Zellextrakten nach Transfektion mit EGFP\_Dicer\_pcDNA3.1(+)

a) Die bei 0,2 µs normalisierten Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von Zellextrakt aus mit Dicer\_pcDNA3.1(+) (leere Symbole) bzw. mit EGFP\_Dicer\_pcDNA3.1(+) (schwarze Quadrate) transifizierten HEK293-Zellen (Kap. 2.2.4.; 9 mg/mL). b) Die bei 0,2 µs normalisierten Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von EGFP (0,5 µg/ml). d) Die Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von den Ergebnissen eines *fits* an ein Modell für eine Diffusionsspezies sind unterhalb der jeweiligen Autokorrelationsfunktion abgebildet (Glg. 3 mit n = 1). Arithmetische Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen aus zwei Zellextraktpräparationen (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18: a und c) wurden berechnet.

In EGFP\_Dicer\_ pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen wurden ein Triplettanteil von 19 % und und eine relativ geringe Triplettzeit von 3  $\mu$ s sowie eine hohe Zählrate von 96 kHz und eine hohe molekulare Zählrate von 40 kHz bestimmt (**Tab. 13**). Das Ergebnis des X<sup>2</sup> –Tests bestätigte mit 1,6 x 10<sup>-6</sup> eine relativ hohe Genauigkeit der *gefitteten* Parameter.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Partick Ziegelmüller wurde EGFP in *E. coli*-Zellen überproduziert und gereinigt (Daten nicht gezeigt). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Diffusionskoeffizient von EGFP von 0,83 x  $10^{-10} \pm 0,04$  x  $10^{-m^2}$  s<sup>-1</sup> bestimmt werden (**Abb. 35b**; Glg. 3 und 5). Dieser ähnelt dem Literaturwert von 0,87 x  $10^{-10}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> [175]. Dies weist auf eine korrekte Messung der Diffusion von EGFP hin, die für die Bestimmung der Mobilität von EGFP-Dicer notwendig ist. Für EGFP-Dicer wurde eine Diffusionszeit von 165 ± 104 µs bestimmt. Der Diffusionskoeffizient von EGFP-Dicer von 0,42 x  $10^{-10} \pm 0,26$  x  $10^{-10}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (Glg. 3 und 5) befand sich in derselben Größenordnung wie der Diffusionskoeffizient des ES-Komplexes von 0,58 x  $10^{-10}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>

Aufgrund der hohen Autofluoreszenz der Kontrollzellextrakte, die wahrscheinlich durch den hohen Proteingehalt von 9 mg/mL verursacht wurde (**Tab. 13**) und der relativ hohen Abweichungen der *gefitteten* von der experimentell bestimmten Autokorrelationsfunktion von EGFP-Dicer (**Abb. 35a**) sollten die Zellextrakt-Messungen für eine genaue Bestimmung der Diffusionszeit von EGFP-Dicer wiederholt werden.

Aus den Versuchsergebnissen wurde geschlossen, dass die Überexpression des EGFP-Dicer-Gens zur Bildung einer fluoreszierenden höhermolekularen Spezies führte, die im zytosolischen Zellextrakt in löslicher Form vorlag. Weil der rekombinante Dicer mittels dieses, nur durch die EGFP-Sequenz modifizierten, Vektors Dicer\_pcDNA3.1(+) exprimiert wurde, wurde vermutet, dass auch mittels Dicer\_pcDNA3.1(+) überproduzierter rekombinanter Dicer in Zellextrakten in gelöster Form vorlag.

### 3.1.3.4. Dicer-Aktivität in zytosolischen Zellextrakten von Säugetierzellen nach Überproduktion von Dicer

In FCS-Messungen wurde im Folgenden das Diffusionsverhalten von Atto647N-markierter dsRNA in zytosolischen Zellextrakten von mittels pcDNA3.1(+) und Dicer\_pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen untersucht. Der Gesamtproteingehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (Glg. 20). Die Proteinkonzentrationen von Extrakten aus mit pcDNA3.1(+) und Dicer\_pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen unterschieden sich nur geringfügig und wurden auf denselben Wert eingestellt. Beispielhaft sind im Folgenden die Ergebnisse der Messungen mit HEK293-Extrakten dargestellt. Beobachtet wurde eine

Abnahme der Diffusionszeiten der fluoreszenzmarkierten dsRNA nach Zugabe von Zellextrakten (Abb. 36a).



#### Abbildung 36 Diffusionszeit des Dicer-Substrates in HEK293-Zellextrakten

Zu zytosolischen Extrakten von HEK293-Zellen (3,5 mg/mL Gesamtproteingehalt), die mit einem Dicer-Gen kodierenden (Dicer\_pcDNA3.1(+) gefüllte Symbole) oder leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1(+), offene Symbole) transfiziert worden waren, wurden 25 nM fluoreszenzmarkierter dsRNA (Substrat) gegeben (Kap. 2.2.4.3. und 2.2.2.10.). Zum *assay* wurden 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Mittels FCS wurden die Diffusionszeiten gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Die Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  wurden im *Fitting*-Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 1). b) Hitze-denaturierte Zellextrakte (gefüllte Symbole; 5 min 95 °C) oder Zellextraktionspuffer (offene Symbole) wurden zu fluoreszenzmarkierter dsRNA gegeben (Substrat) und die Diffusionszeit bestimmt (Glg.3 mit n = 1).

Kein signifikanter Unterschied war nach Dicer-Überproduktion zu erkennen. Die Zugabe von Zellextraktionspuffer oder von denaturiertem Zellextrakt bewirkte keine Veränderung der Diffusionszeit (**Abb. 36b**). Die Abnahme der Diffusionszeiten wurde demzufolge durch die native Struktur von Proteinen ermöglicht, d.h. sie ist vermutlich enzymatischen Ursprungs. Durch diese Messergebnisse und durch Standardfluorophormessungen (Cy5 im Zellextraktionspuffer:  $\tau_{Diff} = 54 \pm 2 \ \mu$ s; Cy5 im Zellextrakt:  $\tau_{Diff} = 56 \pm 1 \ \mu$ s; X<sup>2</sup> –Test: 1,4 x 10<sup>-5</sup>) konnte zudem eine Änderung der Diffusionszeiten durch eine erhöhte Viskosität ausgeschlossen werden.

Aufgrund eines erhöhten Anteils hochmolekularer Komplexe in zytosolischen Zellextrakten wurden Substrat- und Produktanteil in einem *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies charakterisiert (**Abb. 37a**). Die Diffusionszeit der dritten nicht fixierten Diffusionsspezies wies mit 353  $\pm$  39 µs (Kontrollzellextrakte; D<sub>3</sub> = 0,43 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,03 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>; Glg. 5) und 365  $\pm$  70 µs (Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen; D<sub>3</sub> = 0,43 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,07 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) relativ hohe Werte auf. Es konnte jedoch trotz des hohen Anteils an höhermolekularen Komplexen sowohl eine Zunahme des Produktanteils als auch eine

Abnahme des Substratanteils festgestellt werden (**Abb. 37b**). Nach Überexpression des Dicer-Gens wurde eine um 74 % erhöhte Produktbildung festgestellt (**Abb. 37b** und **c**). Der Substratverbrauch konnte simultan verfolgt werden und wies in Dicer überproduzierenden Zellen einen steileren Abfall auf (**Abb. 37b** und **d**).



Abbildung 37 Produktbildung und Substratverbrauch in HEK293-Zellextrakten

Zu zytosolischen Extrakten von HEK293-Zellen, die mit einem Dicer-Gen kodierenden (Dicer\_pcDNA3.1(+) gefüllte Symbole; durchgezogene Linie) oder leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1(+), offene Symbole; gestrichelte Linie) transfiziert worden waren, wurden 25 nM fluoreszenzmarkierter dsRNA gegeben (Kap. 2.2.4.3. und 2.2.2.10.). Zum *assay* wurden 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Mittels FCS wurden die Diffusionszeiten gemessen (Versuch aus **Abb. 36a**; Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Ein *Fitting*-Modell für drei Diffusionszeiten der dritten Produkt- und Substratdiffusionszeit wurde verwendet (Glg. 3 mit n = 3). a) Die Diffusionszeiten der dritten Komponente  $\tau_{Diff, 3}$  wurden gegen die Zeit aufgetragen. b) Produktanteil  $f_{1(Produkt)}$  (rote Quadrate) und Substratanteil  $f_{2(Substrat)}$  (schwarze Dreiecke) wurden in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. c) Der Produktanteil  $f_{1(Produkt)}$  wurde linear gefittet. Durch lineare Regressionsanalyse wurden Enzymaktivitäten errechnet. Aus dem Erhöhen des Produktanteils ergaben sich Enzymaktivitäten von  $3,8 \times 10^{-9} \pm 2,9 \times 10^{-10}$  U für Kontrollzellen und  $6,6 \times 10^{-9} \pm 3,5 \times 10^{-10}$  U für Dicer überproduzierende Zellen ( $R^2 = 0,7$ ). d) Der Substratanteil  $f_{2(Substrat)}$  wurde linear *gefittet* ( $R^2 = 0,3$ ). Die arithmetischen Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden von Ergebnissen aus unabhängigen Experimenten von mindestens vier Zellextraktpräparationen berechnet.

Der Substratanteil zeigte eine breitere Streuung als der Produktanteil. Deshalb wurde keine Enzymaktivität aus dem Substratabfall berechnet. Der Produktanteil näherte sich bei 80 % einem Gleichgewichtszustand an (**Abb. 37b**). Der Substratanteil lag zu Beginn der Messung bei etwa 80 % und fiel während der Beobachtungszeit auf 10 % ab. Ursache für diesen "Fehlbetrag" könnte ein stabiler Anteil von Wechselwirkungen mit zellulären Bestandteilen sein, der zur Bildung von hochmolekularen fluoreszenten Komplexen beitrug. Diese wurden während der gesamten Beobachtungszeit registriert (**Abb. 37a**).

Transfizierter Vektor	dsRNA	Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>τ</sub> (μs)	X <sup>2</sup> -Test
-	-	$2,6\pm0,4$	0,76 ± 0,02	53 ± 21	7 ± 8	5,8 x 10 <sup>-3</sup> ± 8,5 x 10 <sup>-3</sup>
pcDNA3.1(+)	+	$59\pm2$	$283 \pm 37$	17 ± 5	$26\pm9$	1,2 x 10 <sup>-5</sup> ± 1,1 x 10 <sup>-5</sup>
Dicer_pcDNA3.1(+)	+	$58\pm2$	$338\pm46$	18 ± 5	$26\pm8$	8,7 x 10 <sup>-6</sup> ± 1,0 x 10 <sup>-5</sup>

#### Tabelle 14 FCS-Parameter in HEK293-Zellextrakten

HEK293-Zellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1(+) oder Dicer\_pcDNA3.1(+) transient transfiziert und es wurden Zellextrakte hergestellt (Kap. 2.2.4.3.). FCS-Messungen wurden von Zellextrakten nach Zugabe von 25 mM MgCl<sub>2</sub> und von 25 nM Atto647N-markierter dsRNA (+; Versuch aus **Abb. 36a** und **37**) oder ohne Zugabe von dsRNA (-) durchgeführt (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Zählrate, molekulare Zählrate, Triplettanteil T<sub>T</sub>, Triplettzeit  $\tau_T$  und das Ergebnis des  $X^2$  –Tests von FCS-Messungen von mindestens vier unabhängigen Zellextrakt-präparationen wurden durch einen *Fit* an ein Modell für eine Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 1) bestimmt. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet. Die Standardabweichungen der einzelnen Experimente wurden gemittelt, um die Entwicklung der Parameter während eines Experimentes zu dokumentieren.

In **Tabelle 14** sind die Paramter der FCS-Messungen aufgeführt. Der Tiplettanteil T<sub>T</sub> verdoppelte sich sich in den Zellextrakten im Vergleich zu den *in vitro*-Messungen (**Tab. 11**) auf 18 %. Die Triplettzeit  $\tau_T$  erhöhte sich um 20 µs auf 27 µs. Obwohl damit die Triplettzeit den Grenzbereich von 5 – 10 µs überschritt, war das Ergebnis des  $\chi^2$ -Testes mit 10<sup>-5</sup> – 10<sup>-6</sup> vergleichbar hoch wie in den Ergebnissen der *in vitro*-Messungen (Kap. 2.2.5.3. und Kap. 3.1.2.6. **Tab. 11**). Die Signalintensität war mit einer Zählrate von etwa 280 - 340 kHz und das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis mit einer molekularen Zählrate von etwa 60 kHz hoch. Nicht transfizierte Zellextrakte wiesen eine mehr als hundertfach geringere Zählrate und eine mehr als zehnfach geringere molekulare Zählrate ohne Atto647N-markierte dsRNA auf. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis war demzufolge in den Messungen sehr gut.

Zellinie	Transfizierter Vektor	v (U)	Δv (%)
HEK293	pcDNA3.1(+)	$3,8 \times 10^{-9} \pm 2,9 \times 10^{-10}$	
HEK293	Dicer_pcDNA3.1(+)	6,6 x $10^{-9} \pm 3,5$ x $10^{-10}$	74
HeLa	pcDNA3.1(+)	9,0 x $10^{-9} \pm 6,2 \times 10^{-10}$	
HeLa	Dicer_pcDNA3.1(+)	$6,5 \times 10^{-9} \pm 6,5 \times 10^{-10}$	66

#### Tabelle 15 Dicer-Aktivität in Extrakten von HEK293- und HeLa-Zellen

Zellen von Säugetierzellinien wurden mit einem Dicer-Gen kodierenden Expressionsvektor (Dicer\_pcDNA3.1(+)) oder dem leeren Vektor (pcDNA3.1(+)) transfiziert und es wurde zytosolischer Zellextrakt aufgereinigt (Kap. 2.2.4.3..). dsRNA und 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> wurden zu zytosolischen Zellextrakten zugegeben (Kap. 2.2.2.10.). Mittels FCS wurde die Diffusionszeit gemessen (Kap. 2.2.5.). Die Daten wurden wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Durch ein *Fitting*-Modell, das drei Diffusionsspezies bei fixierter Produkt- und Substratdiffusionszeit beschreibt, wurden der Produktanteil bestimmt und die Enzymaktivitäten berechnet (Glg. 3 mit n = 3). Dargestellt sind die Enzymaktivitäten v der Dicer überproduzierenden Zellen und der Kontrollzellen sowie die Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen  $\Delta v$ . Daten aus drei bis sechs unabhängigen Zellextraktpräparationen wurden ausgewertet und arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) berechnet.

In zytosolischen Extrakten von HeLa-Zellen wurde in hoher Übereinstimmung mit den Ergebnissen der HEK293-Zellextrakte eine um 66 % erhöhte Enzymaktivität nach Dicer-Überproduktion gefunden (**Tab. 15**). Der Vergleich des Effektes der Überexpression des Dicer-Gens im *Immunoblot* und in den Enzymaktivitäten ergab weiterhin, dass die Erhöhung der Proteinmenge um ein Vielfaches höher war als die Erhöhung der Enzymaktivität von Dicer (**Abb. 32** und **Tab. 15**). Dies könnte ein Hinweis auf die Notwendigkeit von stöchiometrischen Verhältnissen von Kofaktoren für die Dicer-Aktivität in Zellextrakten sein.

#### 3.1.3.5. Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration

Weil HEK293-Zellen eine sehr geringe Autofluoreszenz aufweisen, wurden alle weiteren Analysen der Enzymaktivität in Zellextrakten und intakten lebenden Zellen mit dieser Zelllinie durchgeführt (mündliche Mitteilung von Herrn Dr. Tobias Kohl am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen) [77]. Zunächst wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration untersucht. Nachdem festgestellt worden war, dass das Verhältnis von unmarkierter zu markierter RNA keinen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübte (**Abb. 38a**), wurden zu 25 nM markiertem Substrat verschiedene Mengen von unmarkiertem Substrat gegeben, um Konzentrationen von bis zu 1.000 nM zu erreichen (Kap. 2.2.2.10.) [75].



#### Abbildung 38 Kontrollmessungen in Zellextrakten zur Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration

HEK293-Zellen wurden mit dem Vektor Dicer\_pcDNA3.1(+) transient transfiziert (Kap. 2.2.4.). Zytosolischer Zellextrakt von Dicer überproduzierenden und nicht transfizierten HEK293-Zellen wurde hergestellt (Kap. 2.2.4.3.; 0,5 mg/mL Gesamtproteingehalt). Es wurde MgCl<sub>2</sub> mit einer Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben. Mittels FCS wurde nach Zugabe von Atto647N-markierter dsRNA die Diffusionszeit gemessen (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten wurden, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Die Enzymaktivitäten v wurden mittels eines *Fitting*-Modells für zwei Diffusionsspezies nach Fixieren der Produktdiffusionszeit (Glg. 3 mit n = 2) bestimmt. a) Die Enzymaktivitäten wurden bei verschiedenen Verhältnissen von markiertem und unmarkiertem Substrat (100 nM) gemessen. b) Die Enzymaktivitäten wurden bei verschiedenem Proteingehalt von Extrakten aus Dicer überproduzierenden Zellen gemessen (225 nM dsRNA mit 25 nM markierter RNA). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

Es wurde des Weiteren überprüft, ob die Enzymaktivität linear zu der eingesetzten Zellextraktmenge zunimmt. Mit Hilfe dieser Kontrollmessung kann festgestellt werden, ob ein Quasi-Gleichgewicht eingestellt ist, das in der Regel vereinfacht *steady state* genannt wird. Während des *steady state* nimmt die Produktkonzentration linear zu, während die ES-Komplex-Konzentration zeitlich konstant ist. Voraussetzung dafür ist eine im Vergleich zur Substratkonzentration um mehrere Größenordnungen geringere Enzymkonzentration. Aufgrund der linearen Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration des Zellextraktes wurde auf einen geringen Anteil des Enzyms und das Einstellen des *steady state* geschlossen (**Abb. 38b**).

Ein sehr geringes Ausmaß an unspezifischer Bindung im FCS-*Assay* wurde nach Zugabe von dsRNA festgestellt (**Abb. 39a**). Dieser Rückschluss ergab sich daraus, dass sich die Diffusionszeiten im Größenbereich zwischen Substrat- und Produktdiffusionszeiten befanden. Ursachen sind vermutlich die im Vergleich zu dem in Kapitel 3.1.3.4. dargestellten Versuch höhere Anzahl von Zellen, die für die Zellextraktpräparation verwendet wurde und die geringfügig veränderte Methode der Reinigung, die eine um 3 mg/mL geringere

Gesamtproteinkonzentration des Zellextraktes als zuvor ergaben (siehe Kap. 2.2.4.3.). Hochmolekulare Komplexe wurden demzufolge in Abhängigkeit von der Gesamtproteinkonzentration ausgebildet. Dies stellt einen Nachweis der unspezifischen Wechselwirkung des Atto647N-markierten Substrates mit zellulären Bestandteilen dar.

Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>τ</sub> (μs)
92 ± 4	$324 \pm 39$	8 ± 2	5 ± 3

HEK293-Zellen wurden mit dem Vektor Dicer\_pcDNA3.1(+) transient transfiziert (Kap. 2.2.4.). Es wurden von transfizierten und nichttransfizierten Zellen Extrakte hergestellt (Kap. 2.2.4.3.). FCS-Messungen von Zellextrakten nach Zugabe von 400 nM dsRNA (25 nM Atto647N-markierte dsRNA; Versuch aus **Abb. 40**) und von 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> wurden durchgeführt (Kap. 2.2.5.4. und 2.2.2.10.). Zählrate, molekulare Zählrate, Triplettanteil T<sub>T</sub>, Triplettzeit  $\tau_T$  von FCS-Messungen von drei unabhängigen Zellextraktpräparationen wurden durch einen *Fit* an ein Modell für eine Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 1) bestimmt. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet. Die Standardabweichungen der Zählraten der einzelnen Messungen wurden gemittelt, um die Entwicklung des Parameters während der Messung zu dokumentieren.

Die FCS-Parameter der Messungen sind beispielhaft für eine Substratkonzentration von 400 nM und Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen in **Tabelle 16** dargestellt. Aufgrund des geringen Anteils des ES-Komplexes im Vergleich zum Substrat (**Abb. 38b**) und geringer höhermolekularer Wechselwirkungen (**Abb. 39a**) wurden der Substrat- und Produktanteil durch ein *Fitting*-Modell für zwei Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 2). Die Zählrate der FCS-Messungen bei einer Substratkonzentration von 400 nM ist beispielhaft dargestellt (**Abb. 39b**). Sie war nahezu konstant während des Experiments. Artefakte durch Photobleichen konnten somit ausgeschlossen werden.

Triplettanteil und Triplettzeit waren im Vergleich zu den Zellextraktmessungen aus Kapitel 3.1.3.4. stark vermindert und vergleichbar mit den Parametern aus *in vitro*-Messungen (**Tab. 16**; siehe auch **Tab. 11** und **14**). Die Zellextrakte unterschieden sich v.a. im Proteingesamtgehalt von 3,5 mg/mL (Kap. 3.1.3.4.) und 0,5 mg/mL (Kap. 3.1.3.5.). Dies bewirkte eine geringere Ausprägung von unspezifischen Wechselwirkungen (**Abb. 39a**). Auch die Tendenz zur Besetzung des Triplettzustands könnte sich hierdurch verändert haben (Vergleich zu Kap. 3.1.2.6.). Die Signalintensität und das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis der Messung waren sehr hoch und die geringe Tendenz zur Spinumkehr ermöglichte eine genaue Bestimmung von Diffusionszeiten (siehe Kap. 2.2.5.1. und 2.2.5.3.).



Abbildung 39 Diffusionszeiten und Zählrate in Zellextrakten

Zytosolischer Zellextrakt von Dicer überproduzierenden HEK293-Zellen wurde hergestellt (Kap. 2.2.4.3.; 0,5 mg/mL Gesamtproteingehalt). Es wurde MgCl<sub>2</sub> mit einer Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben. Mittels FCS wurde nach Zugabe von dsRNA (25 nM Atto647N-markiert) die Diffusionszeit gemessen (Kap. 2.2.5. und 2.2.2.10.). Die Daten wurden, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. a) Die Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  wurden nach Zugabe von 460 nM dsRNA durch ein *Fitting*-Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 1). b) Zählrate nach Zugabe von 400 nM dsRNA. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

Die Enzymaktivität sank bei Substratkonzentrationen ab 1.000 nM in Extrakten von Dicer überproduzierenden Zellen und ab 400 nM in Kontrollzellextrakten deutlich ab (**Abb. 40a**). Es wurde auf Substrathemmung geschlossen, die v.a. bei unphysiologischen Substratkonzentrationen auftreten kann [176]. Die durchschnittliche Erhöhung der Aktivität bei allen Substratkonzentrationen nach Dicer Überproduktion ergab einen Mittelwert von 68 % (Glg. 17). Bei Vergleich der maximalen Enzymaktivität von Extrakten aus Kontrollzellen und Dicer überproduzierenden Zellen wurde eine Erhöhung der Aktivität um 70 % nach Dicer-Überproduktion gemessen. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.3.4. überein, die bei geringerer Substratkonzentration erhalten wurden. Der Effekt der Dicer-Überproduktion auf die Enzymaktivität war also weitestgehend unabhängig von der Substratkonzentration meßbar.

Durch die Auftragung der Daten nach Scatchard und Hanes sollte zunächst die Frage untersucht werden, ob es sich um eine Michaelis-Menten-Kinetik oder um ein kooperatives Phänomen handelt. Bei einer Michaelis-Menten-Kinetik wären in beiden Auftragungen lineare Abhängigkeiten zu erwarten gewesen. Es konnte keine Michaelis-Menten-Kinetik beobachtet werden (**Abb. 40b** und **c**) [177]. Eine positive Kooperativität verursacht bei der Scatchard-Datenauftragung eine Kurve, deren Scheitelpunkt nach oben zeigt. Bei einer negativen Kooperativität zeigt der Scheitelpunkt nach unten. In **Abbildung 40b** ist ein ausgeprägter positiv kooperativer Effekt zu sehen. Auch im Hanes-Diagramm wurde ein

102

Hinweis auf positive Kooperativität gefunden, da ein nach oben abgeknickter Linienverlauf zu sehen war (**Abb. 40c**). Lineare und nichtlineare Regressionsanalysen durch die Hill-Gleichung bestätigten diese Interpretation der Daten. Nichtlineare Regressionsanalyse ergab einen Hill-Koeffizienten von  $1,8 \pm 0,1$  für Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen und von  $1,8 \pm 0,5$  für Extrakte aus nicht transfizierten (Kontroll-) Zellen (**Abb. 40d** und **e**; Glg. 21a) [177]. Lineare Regressionsanalyse ergab einen Hill-Koeffizienten von  $1,8 \pm 0,2$  für Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen und von  $1,6 \pm 0,1$  für Extrakte aus nicht transfizierten (Kontroll-) Zellen (Kontroll-) Zellen (**Abb. 40d** und **e**; Glg. 21b).

Um die Substratkonzentration bei halbmaximaler Enzymaktivität zu benennen, wurde aufgrund des kooperativen Effektes im Folgenden nicht mehr der Ausdruck der Michaelis-Menten-Konstante K<sub>m</sub> verwendet sondern [S]<sub>1/2</sub> [178]. Die nichtlineare Regressionsanalyse durch die Hill-Gleichung ergab einen [S]<sub>1/2</sub>-Wert von 76 ± 5 nM für Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen und von 68 ± 13 nM für Extrakte aus nicht transfizierten (Kontroll-) Zellen (**Abb. 40d** und **e**; Glg. 21a).

Die Resultate der Kontrollzellextrakte wiesen meist eine höhere Standardabweichung als die Resultate der Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen auf (**Abb. 40**; siehe auch **Tab. 17**). Sie ähnelten in hohem Maße jedoch den Daten der Dicer überproduzierenden Zellen. Das Ausmaß unspezifischen Substratabbaus durch andere RNasen scheint demnach relativ gering zu sein. Die Ergebnisse aus Kontrollzellextrakten könnten somit endogenen Dicer charakterisieren.

Die Dissoziationskonstante des ES-Komplexes (Glg. 22) und der  $[S]_{1/2}$ -Wert (Glg. 23) werden z.T. durch dieselben Parameter bestimmt [149]. Neben den Geschwindigkeitskonstanten zur Komplexbildung und zum Komplexzerfall, wirkt die Geschwindigkeitskonstante der Katalyse  $k_2$  auf das Gleichgewicht, das den  $[S]_{1/2}$ -Wert bestimmt, ein (siehe **Abb. 14a**) [149].

Die ermittelten [S]<sub>1/2</sub>-Werte ähneln den veröffentlichten K<sub>d</sub>-Werten von 50 nM einer 60 Basenpaare enthaltenden dsRNA [49] und von 60 nM einer 100 Basenpaare enthaltenden dsRNA und reinem humanem Dicer [18]. Sie können jedoch nur unter Vorbehalt verglichen werden, da unterschiedliche Reinheitsgrade des Enzyms vorlagen. Für reinen humanen Dicer wurde unter Einsatz einer 37 Basenpaare enthaltenden dsRNA ein K<sub>m</sub>-Wert von 19 nM gefunden, der obwohl er etwa viermal kleiner als der [S]<sub>1/2</sub>-Wert in zytosolischen Zellextrakten ist, in derselben Größenordnung liegt [52]. Zytosolische Kofaktoren scheinen demnach keinen erheblichen Einfluß auf diesen Parameter auszuüben. Der für *G. intestinalis* Dicer und eine 37 Basenpaare enthaltende dsRNA bestimmte K<sub>m</sub>-Wert von 2,8 µM unterscheidet sich signifikant von diesen Werten [48]. Dieser Unterschied könnte mit dem Fehlen der dsRNA bindenden Domäne, der ATPase/Helikase-Domäne und der DUF283-Domäne in *G. intestinalis* Dicer erklärt werden. Zudem wurde *G. intestinalis* Dicer als gereinigtes Enzym untersucht.





Zu verschiedenen Mengen von Atto647N-markierter dsRNA (Substrat) wurde Zellextrakt von Dicer überproduzierenden (gefüllte Quadrate) und nicht transfizierten HEK293-Zellen (leere Quadrate) gegeben (Kap. 2.2.4.3. und 2.2.2.10.). Es wurden MgCl<sub>2</sub> mit einer Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben. Mittels FCS wurden die Diffusionszeiten gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Die Enzymaktivität wurde aus der Produktkonzentrationsänderung, die mit Hilfe eines *Fitting*-Modells für zwei Diffusionsspezies bei fixierter Produkt-diffusionszeit bestimmt wurde, berechnet (Glg. 3 mit n = 2). Zwei bzw. drei unabhängige Zellextraktpräparationen wurden durchgeführt und die Messungen 8- bis 22-mal wiederholt. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden berechnet. a) Enzymaktivitäten v bei verschiedenen Substrat-konzentrationen [S]. b) - d) Vor Beginn der Substrathemmung: Auftragung der Enzymaktivität von der Substratkonzentration mittels der Hill-Gleichung (Glg. 21a; h = 1,8 ± 0,1 und [S]<sub>1/2</sub> = 76 ± 5 nM; Kontrolle: h = 1,8 ± 0,5 und [S]<sub>1/2</sub> = 68 ± 13 nM; R<sup>2</sup> = 0,99;  $\chi^2$  = 7 x 10<sup>-6</sup>). e) Lineare Auftragung nach Hill (Glg. 21b; h = 1,8 ± 0,2; Kontrolle: h = 1,6 ± 0,1). f) Die Produktbildung bei 460 nM Substrat wurde nichtlinear mittels einer sigmoiden Boltzmann-Gleichung *gefittet* (Glg. 24).

Auch *E. coli* RNase III weist eine weniger komplexe Domänenstruktur als humaner Dicer auf (Kap. 1.2.). Für reines Enzym und eine 60 Basenpaare enthaltenden dsRNA wurden  $K_m$ -Werte von 42 nM [39] und 325 nM [38] erhalten. Diese Werte befinden sich in derselben Größenordnung wie die  $K_m$ - und  $[S]_{1/2}$ -Werte von humanem Dicer.

Die Michaelis-Menten-Kinetik von E. coli RNase III und G. intestinalis Dicer, v.a. aber von reinem humanen Dicer, steht im Gegensatz zu der positiven Kooperativität von humanem Dicer in Zellextrakten. Dieser Unterschied könnte sich aus dem komplexeren Aufbau von humanem Dicer im Vergleich zu G. intestinalis Dicer und E. coli RNase III erklären. Eine Ursache für das unterschiedliche Verhalten von sowohl reinem humanen Dicer als auch G. intestinalis Dicer und E. coli RNase III im Vergleich zu humanem Dicer in Zellextrakten könnte die Gegenwart zytosolischer Komponenten sein, die die Aktivität und Substratbindung des Enzyms beeinflussen könnten (Kap. 1.2.). Bei E. coli Phosphofruktokinase wurde der Grad der Kooperativität durch die Konzentration eines Kofaktors beeinflusst [179]. Ein solches Phänomen könnte sowohl die Michaelis-Menten-Kinetik von reinem humanen Dicer und als auch die positive Kooperativität von humanem Dicer in Zellextrakten erklären. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene sigmoidale Produktbildung in Zellextrakten (Abb. 40f) wird als ein Hinweis auf Kooperativität gewertet [180]. Eine solche ausgeprägt sigmoidale Produktbildung wurde bei reinem rekombinantem Dicer nicht gefunden (Kap. 3.1.2.1.; Abb. 16b). Dies schließt zum einen ein methodisches Artefakt als Ursache der sigmoidalen Produktbildungskurve in Zellextrakten aus. Zum anderen stehen die kinetischen Ergebnisse dieser Arbeit nicht im Gegensatz zu den publizierten Daten [52]. sondern ergänzen diese.

Eine kooperative Regulation der Enzymaktivität könnte über allosterische Effektoren erfolgen. Es sind Interaktionspartner mit modulatorischer Wirkung auf die Dicer-Aktivität bekannt, wie Ago2, TRBP und PACT [52, 59-63]. Dicer ist an der Formierung von RISC beteiligt, was auf über die RNA-Spaltung hinausgehende Funktionen deutet, die mit einer komplexen Regulation einhergehen könnten [53, 54, 56-58]. Eine weitere Form des kooperativen Verhaltens könnte durch konformationelle Veränderungen des Enzyms entstehen, wobei kinetische Konstanten verändert werden würden [180]. Sigmoidale Produktbildungskurven, wie sie bei humanem Dicer in Zellextrakten auftraten, weisen auf diese Form der Regulation hin (**Abb. 40f**). Eine Kombinantion dieser Allosterie-Typen wäre ebenfalls möglich [177]. Für eine genauere Analyse der Regulationsmechanismen müssten einzelne Kofaktoren auf ihre Wirkung auf die kinetischen Konstanten von reinem Enzym getestet werden.

#### 3.1.3.6. Detektion des ES-Komplexes

Das im oben beschriebenen Experiment bestimmte geringe Ausmaß an unspezifischer Aggregation erlaubte es, in einem *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies die ES-Komplex-Konzentration zu ermitteln (Kap. 3.1.3.5.; **Abb. 41a**).





Zellextrakt von Dicer überproduzierenden HEK293-Zellen wurde zu 460 nM Atto647N-markierter dsRNA gegeben (Versuch aus Kap. 3.1.3.5.; **Abb. 40**). Mittels FCS wurden die Diffusionszeit gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Ein *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und ES-Komplex-Diffusionszeit wurde verwendet (Glg. 3 mit n = 3). Der ES-Komplex wurde während des linearen Produktzuwachses analysiert. a) Die Diffusionszeiten der dritten Komponente  $\tau_{\text{Diff, 3(Substrat)}}$  ergaben für das Substrat typische Diffusionszeiten. b) Histogramm von ES-Komplex-Konzentrationen.

Aufgrund der asymmetrischen Verteilung der ES-Komplex-Konzentrationen wurde der Median als robustes Maß für die mittlere ES-Komplex-Konzentration verwendet (**Abb. 41b**; Glg. 25; Kap. 2.2.5.5.). ES-Komplex-Konzentrationswerte zwischen 2,5 x 10<sup>-13</sup> M (250 fM) und 2,0 x 10<sup>-11</sup> M (20 pM) wurden ermittelt (**Abb. 42**). Das auf FCS basierte Detektieren von Molekülen im pico- und femtomolaren Konzentrationsbereich wurde theoretisch für möglich gehalten [181].

In einer früheren veröffentlichten Studie wurden die Auflösung und die Sensitivität von auf Diffusion basierten Mehrkomponentenanalysen untersucht [140]. Die Studie ergab, dass eine genaue Quantifizierung des prozentualen Anteils einer Komponente unter 10 % nicht möglich ist. Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit der Detektionssensitivität von der molekularen Zählrate experimentell nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Anteil des ES-Komplexes im Vergleich zur Substratkonzentration von etwa 0,01 % detektiert, was weit unterhalb der veröffentlichten Detektionsgrenze liegt. Die in der vorliegenden Arbeit sechsfach erhöhte molekulare Zählrate bei ähnlichen sonstigen Messbedingungen (30 bis 60 s Messzeiten und 8 bis 22 Wiederholungen, etwa 100 - 300 kHz Fluoreszenzintensität) im Vergleich zu der veröffentlichten Studie könnte jedoch eine so hohe Detektionssensitivität ermöglicht haben [140]. Das in der veröffentlichten Studie verwendete andere Messsystem könnte zusätzlich zu Unterschieden in der Detektionsensitivität beigetragen haben. Für Messungen mit dem ConfoCor2 wird jedoch auf diese Arbeit in der Literatur verwiesen [131]. Zu einer verbesserten Signalintensität könnten die erhöhte Photostabilität von Fluorophoren, wie beispielsweise Atto647N, ein verbesserter optischer Aufbau des konfokalen Mikroskops, die Weiterentwicklung der Lasertechnologie oder auch eine verbesserte Signalverarbeitung beigetragen haben [131]. Die Sensitivität in der Unterscheidung unterschiedlicher Diffusionsspezies könnte des Weiteren durch die Einführung von Grenzwerten bei der Datenauswertung (siehe Kap. 2.2.5.5.) und das Fixieren der bekannten Diffusionszeiten erhöht worden sein.

Um ein Artefakt auszuschließen, wurden die ES-Komplex-Konzentrationen in ihrem biologischen Zusammenhang analysiert. Zunächst wurde der Effekt der Überexpression des Dicer-Gens untersucht: Dicer überproduzierende Zellextrakte wiesen im Vergleich zu Kontrollzellextrakten eine etwa dreifach höhere maximale ES-Komplex-Konzentration auf (**Abb. 42**). Eine etwa vergleichbare Größenordnung war in der Erhöhung der Enzymaktivität durch Überexpression des Dicer-Gens zu beobachten (**Abb. 40d** und **42**). Auch die Konzentrationen bei geringeren Substratkonzentrationen zeigten eine Erhöhung nach Überproduktion von Dicer. Da im *Immunoblot* erheblich größere Mengen von Dicer nach Überproduktion nachgewiesen werden konnten, deutet die geringe Menge an katalytisch aktivem Dicer auf benötigte stöchiometrische Mengen zytosolischer Kofaktoren hin (**Abb. 32**).

Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der ES-Komplex-Konzentrationen von der Substratkonzentration untersucht (**Abb. 42**; siehe Kap. 2.2.5.7.). Zunächst wurden aus maximaler ES-Komplex-Konzentration und maximaler Enzymaktivität (bei gleicher Substratkonzentration) die katalytische Konstante  $k_{cat}$  berechnet (Glg. 26). Weil sich die daraus berechnete Spezifitätskonstante nahe am diffusionslimitierten Bereich befand (siehe im Detail Kap. 3.1.3.7.), wurde auf eine Übereinstimmung von  $k_{cat}$  und  $k_2$  geschlossen [149]. Deshalb konnte unter Verwendung der linearen Abhängigkeit der ES-Komplex-Konzentration von der Enzymaktivität, die durch  $k_2$  definiert wird (Glg. 27a), die ES-Komplex-Konzentration mittels  $k_{cat}$  und der Enzymaktivität vorhergesagt werden (Glg. 27b; **Abb. 42**).

Aufgrund der Übereinstimmung von  $k_2$  und  $k_{cat}$  konnte zudem die Abhängigkeit der ES-Komplex-Konzentration von der Substratkonzentration durch die Hill-Gleichung beschrieben werden (Glg. 28). Es ergaben sich nach Analyse der theoretisch vorhergesagten ES-Komplex-Konzentration identische [S]<sub>1/2</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten wie nach der Analyse der Enzymaktivität, entsprechend der Erwartung bezüglich den Gleichungen 27a, 27b und 28 (siehe *Fit*-Kurve in **Abb. 42** und **40d**).

107



Abbildung 42 Substratkonzentrationsabhängigkeit der ES-Komplex-Konzentrationen

Zellextrakt von Dicer überproduzierenden (gefüllte Kreise) oder nicht transfizierten HEK293-Zellen (leere Kreise) wurde zu verschiedenen Konzentrationen von Atto647N-markierter dsRNA gegeben (Versuch aus Kap. 3.1.3.5.; **Abb. 40**). Mittels FCS wurden die Diffusionszeiten gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Ein *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produkt- und ES-Komplex-Diffusionszeit wurde verwendet (Glg. 3 mit n = 3). Der Median der ES-Komplex-Konzentration (während des linearen Produktzuwachses; Glg. 25) wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufgetragen. Es wurden bei 150 nM Substratkonzentration in Kontrollzellextrakten ein arithmetischer Mittelwert (Glg. 17) und die Standardabweichung (Glg. 18) in x- und y-Richtung berechnet. Theoretische Konzentrationen (kleine rote Punkte; gepunktete rote Linien; Glg. 27b) wurden mit Hilfe der Enzymaktivitäten und des bei maximaler Enzymaktivität und ES-Komplex-Konzentration berechneten  $k_{cat}$  bestimmt (Glg. 26; siehe Kap. 3.1.3.5. und 3.1.3.7.). Nichtlineares *Fitten* der experimentell bestimmten ES-Komplex-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mittels der Hill-Gleichung ergab:  $h = 3, 4 \pm 0, 7$  und [S]<sub>1/2</sub> = 43 ± 5 nM (Glg. 28; Kontrolle:  $h = 5, 7 \pm 3, 1$  und [S]<sub>1/2</sub> = 44 ± 3 nM; R<sup>2</sup> = 0,99).

Auch die Abhängigkeit der experimentell ermittelten ES-Komplex-Konzentration konnte durch die Hill-Gleichung mit einem R<sup>2</sup>-Wert von 0,99 beschrieben werden. Das Ergebnis des *fits* wies mit 43  $\pm$  5 und 44  $\pm$  3 nM nahezu identische [S]<sub>1/2</sub>-Werte in Kontrollzellextrakten und Extrakten aus Dicer überproduzierenden Zellen auf (**Abb. 42**; Glg. 28). Diese befanden sich in der Größenordnung der mittels Enzymaktivität oder theoretischer ES-Komplex-konzentration bestimmten Werte von 68 und 76 nM (**Abb. 40**; siehe auch **Tab. 17**). Mit den Hill-Koeffizienten von 3,4  $\pm$  0,7 und 5,7  $\pm$  3,1 wurde jedoch eine ausgeprägtere positive Kooperativität im Vergleich zu der Analyse der Enzymaktivitäten v ermittelt (**Abb. 42** und **40**; Glg. 28). Somit verhielten sich experimentell bestimmte ES-Komplex-Konzentrationen entsprechend einer theoretischen Vorhergesage.

	Parameter	Extrakte aus nicht transfizierten HEK293-Zellen	Extrakte aus Dicer überproduzierenden HEK293-Zellen
y (11)	[S] <sub>1/2</sub> (nM)	68 ± 13	$76\pm5$
V (O)	h	$1,8\pm0,5$	$1,8 \pm 0,1$
[ES] (pM)	[S] <sub>1/2</sub> (nM)	$43\pm5$	44 ± 3
	h	$\textbf{5,7} \pm \textbf{3,1}$	$\textbf{3,4} \pm \textbf{0,7}$

#### Tabelle 17 [S]<sub>1/2</sub>-Wert und Hill-Koeffizient von humanem Dicer in HEK293-Extrakten

Zu zytosolischen HEK293-Zellextrakten wurde eine 22 und 26 Nukleotide enthaltende Atto647N-markierte dsRNA verschiedener Konzentration gegeben (Kap. 2.2.4.3. und 2.2.2.10.) und mittels FCS die Diffusionszeit gemessen (Kap. 2.2.5.). Die Enzymaktivität v und die ES-Komplex-Konzentration [ES] wurden aus den Daten bestimmt (Kap. 2.2.5.3. und 2.2.5.5.). Zur Durchführung und Auswertung des Versuchs siehe auch Kapitel 3.1.3.5. Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Enzymaktivität [S]<sub>1/2</sub> und der Hill-Koeffizient h von humanem Dicer wurden nach Auswertung der Abhängigkeit der Enzymaktivität v (Versuch **Abb. 40**; Glg. 21a) und der ES-Komplexkonzentration [ES] (Versuch **Abb. 42**; Glg. 28) von der Substratkonzentration mittels der Hill-Gleichung bestimmt. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die ES-Komplex-Konzentrationen bewegten sich während des linearen Produktzuwachses bei maximaler Substratkonzentration in Extrakten aus nicht transfizierten Zellen zwischen 3 und 8 pM ([ES] =  $5,7 \pm 2,7$  pM; Glg. 17 und 18) und in Extrakten aus Dicer überproduzierenden Zellen zwischen 10 und 30 pM ([ES] =  $18 \pm 8$  pM; Glg. 17 und 18; Abb. 43a). Diese arithmetischen Mittelwerte stimmen mit den Ergebnissen der nichtlinearen Regressionsanalyse von 5,6 und 20,0 pM gut überein (Abb. 42). Einschränkend ist eine höhere Schwankungsbreite in der Konzentrationsbestimmung im Vergleich zu Substrat und Produkt zu bemerken. Diese kann mit der geringen Anzahl der Photonen pro Messpunkt (etwa 1/10.000 im Vergleich zu Substrat und Produkt) begründet werden. Zusätzlich ergibt sich aus diesen Messungen, in Übereinstimmung mit der enzymkinetischen Theorie, eine zeitliche Konstanz während des steady state (Abb. 43a; siehe Kap. 3.1.3.5.). Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung der experimentell ermittelten ES-Komplex-Konzentrationen mit der enzymkinetischen Theorie und der Erhöhung der Konzentration durch die Überproduktion von Dicer, wurde das Messen eines Artefakts ausgeschlossen. Substrat, Produkt und ES-Komplex konnten damit simultan über Konzentrationsunterschiede von vier Größenordungen verfolgt werden (Abb. 43b).



Abbildung 43 Zeitabhängigkeit der ES-Komplex-Konzentrationen

Zellextrakt von Dicer überproduzierenden wurde zu 460 nM Atto647N-markierter dsRNA gegeben (Versuch aus Kap. 3.1.3.5.; **Abb. 40**). Mittels FCS wurden die Diffusionszeiten gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Ein *Fitting*-Modell für drei Diffusionsspezies mit fixierter Produktund ES-Komplex-Diffusionszeit wurde verwendet (Glg. 3 mit n = 3). b) Mediane ES-Komplex-Konzentration während des linearen Produktzuwachses (Glg. 25). a) Die Kinetiken von Produkt (P) (Quadrate)-, Substrat (S) (Dreiecke)- und ES-Komplex (ES) (Kreise)–Konzentrationen wurden linear *gefittet*.

Mittels eines *pre-steady state assays* konnten in einer veröffentlichten Studie Konzentrationen von sowohl Substrat, Produkt als auch ES-Komplex verfolgt werden [182]. Für einen *multiple turnover assay* konnte kein entsprechendes Beispiel in der Literatur gefunden werden. Ursache hierfür könnte der hohe Konzentrationsunterschied von Substrat und Enzym sein, der das Einstellen des *steady state* voraussetzt [149].

#### 3.1.3.7. Katalytische Konstante und Spezifitätskonstante

Die katalytische Konstante  $k_{cat}$  konnte auf 160 ± 17 s<sup>-1</sup> (9,4 x 10<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) für Extrakte aus nicht transfizierten Zellen und auf 74 ± 13 s<sup>-1</sup> (4,4 x 10<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) für Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen bestimmt werden (Glg. 26). In **Tabelle 18** sind die enzymkinetischen Parameter aufgeführt. Aus der Differenz der maximalen Aktivitäten und ES-Komplex-Konzentrationen von Dicer überproduzierenden Extrakten und Kontrollzellextrakten (**Abb. 40d** und **42**) wurde ein  $k_{cat}$  von 42 s<sup>-1</sup> berechnet, der ausschließlich der katalytischen Aktivität von überproduziertem Dicer zugeordnet werden konnte.

Die *E. coli* RNase III-Werte unterschieden sich mit katalytischen Konstanten von 1,2 min<sup>-1</sup> und 3,8 min<sup>-1</sup> (*E. coli* RNase III) erheblich von den genannten Ergebnissen für humanen Dicer [38, 39]. Dies könnte mit dem weniger komplexen Aufbau des Enzyms im Vergleich zu

humanem Dicer begründet werden (siehe Kap. 1.2. und **Abb. 2**). Ein weiterer Grund könnte die höhere Reinheit der Enzyme in den zitierten Studien sein.

Zelle	ktrakten			
Parameter	Extrakte aus nicht transfizierten HEK293-Zellen	Extrakte aus Dicer überproduzierende HEK293-Zellen		
V <sub>max</sub> (pM s <sup>-1</sup> )	8,8 x $10^2 \pm 9,3 x 10^1$	$1,5 \times 10^3 \pm 2,5 \times 10^2$		
[ES] <sub>max</sub> (pM)	$5,6\pm0,4$	$20,0\pm0,6$		
$k_{cat}(s^{-1})$	$1,6 \times 10^2 \pm 1,7 \times 10^1$	7,4 x $10^1 \pm 1,3 x 10^1$		
k <sub>sp</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$2,3 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^8$	$9,7 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$		
	überproo	duzierter Dicer		
$k_{cat}(s^{-1})$	4	.2 x 10 <sup>1</sup>		

Tabelle 18	$k_{cat}$ und die Spezifitätskonstante $k_{sp}$ von humanem Dicer in HEK293-
	<b>_ </b>

 $k_{sp} (M^{-1} s^{-1})$  5,5 x 10<sup>8</sup>

Zu zytosolischen HEK293-Zellextrakten wurde eine 22 und 26 Nukleotide enthaltende Atto647N-markierte dsRNA verschiedener Konzentration gegeben (Kap. 2.2.4.3. und 2.2.2.10.) und mittels FCS die Diffusionszeit gemessen (Kap. 2.2.5.). Die Enzymaktivität v und die ES-Komplex-Konzentration [ES] wurden aus den Daten bestimmt (Kap. 2.2.5.3. und 2.2.5.5.). Zur Durchführung und Auswertung des Versuchs siehe auch Kapitel 3.1.3.5. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität v (Abb. 40d; Glg. 21a) und der ES-Komplex-Konzentration [ES] (Abb. 42; Glg. 28) von der Substratkonzentration mittels der Hill-Gleichung ergab die maximale Aktivität Vmax und die maximale ES-Komplex-Konzentration [ES]max. (Abb. 40d und 42) Es wurde die katalytische Konstante kcat von humanem Dicer aus nicht gerundeten Vmax- und [ES]max-Werten berechnet (Glg. 26). Die Spezifitätskonstante ksp wurde aus nicht gerundeten  $k_{cat}$ -Werten und den [S]<sub>1/2</sub>-Werten bestimmt (Glg. 29; Tab. 17). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Vmax bzw. [ES]max von Extrakten aus Dicer überproduzierenden Zellen wurde von Vmax bzw. [ES]<sub>max</sub> von Extrakten aus nicht transfizierten Zellen subtrahiert, um V<sub>max</sub> bzw. [ES]<sub>max</sub> von überproduziertem Dicer zu erhalten. Die resultierenden  $V_{max}$ - und  $[ES]_{max}$ -Werte wurden zur Berechnung des  $k_{cat}$  von eingesetzt (Glg. 26). Aus diesem k<sub>cat</sub> -Wert und dem [S]<sub>1/2</sub>-Wert von Dicer überproduziertem Dicer überproduzierenden Zellen wurde ksp von überproduziertem Dicer errechnet (Glg. 29).

Mit dem  $k_{cat}$  von reinem *G. intestinalis* Dicer von 22 s<sup>-1</sup> and 24 s<sup>-1</sup> stimmen die Ergebnisse gut überein (74 bzw. 160 s<sup>-1</sup>) [48]. Für reinen humanen Dicer wurde ein  $k_{cat}$  von 7.0 x 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup> ermittelt [52]. Dieser Wert ist vier bis fünf Größenordnungen kleiner als der in dieser Arbeit ermittelte  $k_{cat}$ . Eine Ursache könnte die unterschiedliche Präsenz von Kofaktoren sein. Eine Erhöhung des  $k_{cat}$  von reinem Dicer um das 65-fache durch die DExD/H-box-Domäne (ATPase/Helikase) wurde in Deletionsstudien ermittelt [52]. Die Regulation der Dicer-Aktivität durch diese interne Domäne könnte z.B. erlauben, die RNA-spaltende Funktion mit der Bildung des RISC-Komplexes zu koordinieren (siehe Kap. 1.2). Eine konformationelle Veränderung des Enzyms könnte hierbei beteiligt sein. Die Interaktion von reinem Dicer mit TRBP bewirkte eine geringfügige Erhöhung der Katalyse [52]. Der erheblich höhere  $k_{cat}$  in Zellextrakten könnte entsprechend durch eine Wechselwirkung des Enzyms mit Kofaktoren bewirkt worden sein, die die hemmende Wirkung der DExD/H-box-Domäne verringern.

Die Spezifität von humanem Dicer wurde auf 2,3 x  $10^9 \pm 2,4$  x  $10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> für Extrakte aus nicht transfizierten Zellen bzw. auf 9,7 x  $10^8 \pm 1,6$  x  $10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> für Extrakte aus Dicer überproduzierenden Zellen bestimmt (Glg. 29; Tab. 18). Entsprechend der Analyse der Hill-Koeffizienten, [S]<sub>1/2</sub>-Werte und katalytischen Konstanten zeigt sich auch in der Spezifitätskonstante eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Daten aus Kontrollzellen und Dicer überproduzierenden Zellen (Tab. 17 und 18). Eine weitere Schlussfolgerung könnte ein geringes Ausmaß unspezifischen Substratabbaus sein. Die kinetischen Daten von überproduziertem Dicer sollen Artefakte durch unspezifisches Prozessieren des Substrates vollständig ausschließen. Hierfür wurden Enzymaktivitäten bzw. ES-Komplex-Konzentrationen von Kontrollzellen von Dicer überproduzierenden Zellen subtrahiert. Resultierende Werte wurden für die Berechnung des k<sub>cat</sub> von überproduziertem Dicer verwendet (Glg. 26; **Tab. 18**). Es ergab sich unter Verwendung des [S]<sub>1/2</sub>-Wertes von Dicer überproduzierenden Zellen eine Spezifitätskonstante von 5,5 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (55 nM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Dieser Wert ist etwa halb so hoch wie die Werte der Zellextrakte. Überproduzierter und endogener Dicer weisen demnach ein vergleichbares enzymkinetisches Verhalten auf. Die Größenordnung der Spezifitätskonstante von humanem Dicer liegt damit in Zellextrakten zwischen 10<sup>8</sup> und 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

Bei freier Diffusion von zwei etwa gleich großen globulären Molekülen beträgt die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens etwa 10<sup>9</sup> - 10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> [183]. Sie begrenzt auch die Spezifitätskonstante von Enzymen in Lösung, die auf das Substrat durch Diffusion treffen. Verschiedene Enzyme mit einer Spezifität von etwa 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> wurden bislang identifiziert. Ein Beispiel hierfür ist die Katalase [184]. Einschränkend muss bemerkt werden, dass bei unterschiedlicher Größe von Enzym und Substrat, wie es im Dicer-Assay der Fall ist, die Spezifitätskonstante im diffusionskontrollierten Bereich noch höhere Werte erreichen kann [183]. Die Spezifität von humanem Dicer nähert sich in der Gegenwart von zytosolischen Komponenten dem diffusionslimitierten Wert an. Die Dicer-Aktivität ist in Zellextrakten erheblich erhöht im Vergleich zu dem gereinigten Zustand [44, 52]. In einer Studie mit reinem humanem Dicer wurde eine Spezifitätskonstante von 3.72 x 10<sup>-6</sup> nM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (3.72 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) bestimmt, die fünf Größenordnungen geringer ist, als die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Spezifitätskonstante [52]. Dies weist deutlich auf eine Regulation der RNA-Spaltung durch zytosolische Kofaktoren hin. Dies könnte u.U. auch für E. coli RNase III und G. intestinalis Dicer zutreffen, deren Spezifitäten in reinem Zustand mehrere Größenordnungen geringer sind als die Spezifität von humanem Dicer in Zellextrakten.

### 3.1.4. In vivo-Anwendung des Dicer-Assays

Das Untersuchen der katalytischen Merkmale von Dicer in zytosolischen Zellextrakten stellt eine Annäherung an das Verhalten in seiner natürlichen Umgebung, der lebenden Zelle, dar. Ein zusätzlicher Grad an Komplexität *in vivo* wird durch die räumliche Verteilung der Komponenten verursacht, die wiederum zeitlich veränderbar ist. Die Dicer-Aktivität könnte abhängig von der Lokalisation des Enzyms und von Kofaktoren reguliert sein. In Verbindung mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop (kLRM) ist es möglich, mittels FCS die Enzymaktivität *in vivo* räumlich aufgelöst und in Echtzeit wiederzugeben (LSM 510 Meta -ConfoCor2-System; Kap. 2.2.6.) [77, 131]. Die Anwendbarkeit des auf Mobiliät basierten Dicer-Enzym-Assays wurde deshalb in lebenden und intakten HEK293-Zellen getestet. In das Zytosol von mit dem Dicer-Gen transfizierten HEK293-Zellen wurde Atto647N-markierte dsRNA (Substrat) mikroinjiziert und die Fluoreszenzfärbung der Zellen im kLRM dokumentiert (**Abb. 44a**, Kap. 2.2.6. und 2.2.4.). Das Fluoreszenzsignal konnte in mikroinjizierten Zellen über einen Zeitraum von etwa einer Stunde mikroskopisch detektiert werden, während in nicht transfizierten Zellen kein Signal zu sehen war (**Abb. 44b** und **c**).

Atto647N-markierte dsRNA	Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>⊤</sub> (µs)	$\chi^2$ –Test
-	$0,4\pm0,5$	$36\pm28$	80 ± 34	3 ± 21	2,1 x 10 <sup>-4</sup> $\pm$ 3,4 x 10 <sup>-4</sup>
+	31 ± 8	$444 \pm 134$	$22\pm3$	$21\pm4$	5,8 x 10 <sup>-4</sup> ± 2,6 x 10 <sup>-4</sup>

 Tabelle 19
 FCS-Parameter in vivo

HEK293-Zellen wurden mit dem Vektor Dicer\_pcDNA3.1(+) transient transfiziert (Kap. 2.2.4.). FCS-Messungen wurden in lebenden intakten Zellen nach Mikroinjektion von Zugabe von 2  $\mu$ M Atto647N-markierter dsRNA durchgeführt (Kap. 2.2.5.4. und 2.2.2.10.; Versuch aus **Abb. 45**). Zählrate, molekulare Zählrate, Triplettanteil T<sub>T</sub>, Triplettzeit T<sub>T</sub> von FCS-Messungen von drei unabhängigen Zellextraktpräparationen wurden durch einen *Fit* an ein Modell für eine Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 1) bestimmt. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

In drei unabhängigen Experimenten wurden nach Mikroinjektion von RNA an unterschiedlichen Stellen im Zytosol in verschiedenen Zellen über einen Zeitraum von einer Stunde FCS-Messungen vorgenommen (**Abb. 44b** und **45**). Dies sollte eine statistische Aussage über die Aktivität von Dicer im Zytosol ermöglichen, wie sie in einer früheren publizierten auf FCCS basierten Studie angestrebt wurde [77]. Der lange Beobachtungszeitraum ergab sich aus der relativ hohen Substratkonzentration von etwa 100 nM (Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen N =  $28 \pm 12$ ).



b)



#### Abbildung 44 kLRM-Aufnahmen von HEK293-Zellen vor und nach Mikroinjektion des Dicer-Substrates

Lichtmikroskopische kLRM-Aufnahmen und Aufnahmen nach Anregung mit dem HeNe-Laser bei 633 nm sind überlagert dargestellt (Kap. 2.2.6. und 2.2.4.). a) und b) Fluoreszenzmarkierte dsRNA (2 µM) wurde in das Zytosol von HEK293-Zellen mikroinjiziert. Die FCS-Messpunkte sind durch Kreuze markiert. a) Ein Profil der Intensitätsverteilung entlang der im Photo eingezeichneten roten Linie. Die Signalintensität in der Zelle ist 50- bis 100-fach erhöht im Vergleich zur Umgebung. b) Zeitserie nach Mikroinjektion der dsRNA. c) Mikroskopische Aufnahme von nicht transfizierten Zellen und Markierung der Position der FCS-Messungen.

Entsprechend dem *in vitro*-Experiment wurde davon ausgegangen, dass sich der Produktanteil mit zunehmender Zeit erhöhen würde, falls eine Dicer-Aktivität vorhanden ist. In der Durchführung und Auswertung der FCS-Messungen wurde sich an der Arbeit aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Masataka Kinjo sowie an einem Review von Frau Prof. Dr. Petra Schwille orientiert [185, 186]. Alle Parameter der FCS-Messung sind in **Tabelle 19** aufgeführt. Die Zählrate von 444 kHz und die molekulare Zählrate von 31 kHz ermöglichten ein ausreichendes FCS-Signal. Zellen, die keine mikroinjizierte RNA enthielten, wurden als Negativkontrolle vermessen. Sie ergaben eine molekulare Zählrate von 0,4 kHz und eine Zählrate von 36 kHz (**Tab. 19**; **Abb. 44c**). Die Autofluoreszenz konnte somit vernachlässigt werden [131]. Die Tendenz zur Spinumkehr war in Zellen ohne mikroinjizierte RNA bei fast 100 %. Diese *gefitteten* Parameter, wie auch Diffusionszeit und Anzahl der Partikel, ergaben aufgrund der geringen Signalintensität keine sinnvollen Werte.



Abbildung 45 FCS-Messungen in vivo nach Mikroinjektion des Dicer-Substrates

FCS-Daten, aufgenommen in zwei Zellen an 4 bis 7 unterschiedlichen Stellen alle 20 Minuten (5 x 2s). Mittels FCS wurden die Diffusionszeiten gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kap. 2.2.5.3. und 2.2.3.5. beschrieben, ausgewertet. Die Zählrate (a) und die Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff}}$  (b) wurden nach *Fitten* der Daten an ein Modell für eine Diffusionsspezies gegen die Zeit aufgetragen (Glg. 3 mit n = 1). c) Der Produktanteil f<sub>1(Produkt)</sub> wurde nach *Fitten* der Daten an ein Modell für zwei Diffusionsspezies bei fixierter Fluorophor-Diffusionszeit (Glg. 3 mit n = 2) gegen die Zeit aufgetragen. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

In Zellen mit mikroinjizierter dsRNA waren der Triplettanteil T<sub>T</sub> mit 22 % und die Triplettzeit  $\tau_T$  mit 21 µs um etwa 10 % bzw. 10 µs höher als in *in vitro*-Messungen (**Tab. 19** und **Tab. 11** in Kap. 3.1.2.6.). Die Triplettzeit überschritt den Grenzwert von 10 µs geringfügig (Theorie: Kap. 2.2.5.1. und 2.2.5.3.). Die zelluläre Umgebung verursachte eine Erhöhung der Triplett-Parameter T und  $\tau_T$ , die bereits in Zellextraktmessungen zu beobachten gewesen war (**Tab. 14** in Kap. 3.1.3.4.). In den *in vivo*-Messungen wurde ein relativ hoher Anteil an Einzelmessungen aufgrund eines zu hohen Triplettanteils oder einer zu hoher Triplettzeit nicht ausgewertet. Deshalb scheint die Umgebung in intakten lebenden Zellen diese Tendenz zur Spinumkehr noch zu verstärken und die Triplettzeit zu erhöhen. Die mindere Qualität der FCS-Messungen zeigt sich an dem im Vergleich zu Zellextraktmessungen um ein bis zwei Größenordnungen höheren  $\chi^2$ -Test-Ergebnis von 5,8 x 10<sup>-4</sup> (**Tab. 11**, **14** und **19**). Die Zählrate blieb nach Mikroinjektion relativ stabil (**Abb. 45a**). Sie sank erst nach 50 Minuten stärker ab, was durch Photobleichen verursacht worden sein könnte [186]. Aufgrund der erhöhten Viskosität im Zytosol wurde eine 3,5-fach höhere Diffusionszeit für Substrat, Produkt und ES-Komplex angenommen [185].

Die Diffusionszeiten nach dem *Fitten* der Daten an ein Modell für eine Diffusionsspezies waren mit  $3.700 \pm 1.300 \mu s$  erheblich höher als die erwarteten Komponenten-Diffusionszeiten von 266 µs, 580 µs und 945 µs (**Abb. 45b**). Es konnte zudem eine Zunahme der Diffusionszeit während des Beobachtungszeitraumes identifiziert werden, die auf eine Wechselwirkung mit zellulären Bestandteilen zurückgeführt werden kann.

Das Absinken der Diffusionszeit nach 50 Minuten wurde vermutlich ebenfalls durch Photobleichen verursacht. Mittels des *Fitting*-Modells für zwei Diffusionsspezies wurde ein konstanter Produktanteil von  $19 \pm 4$  % identifiziert (**Abb. 45c**). Eine Aktivität von Dicer konnte in HEK293-Zellen demzufolge nicht detektiert werden.

Die FCS-Messungen waren durch Photobleichen und eine erhöhte Tendenz des Fluorophors zur Spinumkehr beeinträchtigt. Diese sind wahrscheinlich durch unspezifische Wechselwirkung mit zellulären Komponenten verursacht worden, was auch durch die sehr hohen Diffusionszeiten belegt wird. Der auf Mobilität basierte Dicer-*Assay* lässt sich aufgrund unspezifischer Bindung des Substrates an zelluläre Komponenten *in vivo* nicht anwenden.

## 3.1.5. Zusammenfassende Darstellung der Analyse der Dicer-katalysierten RNA-Spaltung

Das RNase III-Enzym Dicer ist an der auf RNA basierten sequenzabhängigen posttranskriptionellen und translationalen Regulation der Genexpression beteiligt. Das Enzym weist in gereinigter Form eine sehr geringe Aktivität auf. In der vorliegenden Arbeit wurde humaner Dicer deshalb in Gegenwart zytosolischer Komponenten, d.h. in zytosolischen Zellextrakten, enzymkinetisch charakterisiert. Ein auf Diffusion basierter Enzym-*Assay* wurde mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) entwickelt. Erstmals wurde mittels FCS die Diffusionszeitenänderung eines fluoreszenzmarkierten Substrates nach enzymatischer Restriktion gemessen und durch Analyse mit Hilfe eines *Fitting*-Modells für unterschiedliche Diffusionsspezies die Enzymaktivität bestimmt.

#### 3.1.5.1. Diffusionszeiten von Substrat und Produkt

Zu diesem Ziel wurden zunächst die Diffusionszeiten von Substrat und Produkt mit Hilfe von rekombinantem gereinigten Dicer ermittelt. Das Substrat, eine aus 22 und 26 Nukleotiden bestehende Atto647-markierte dsRNA, wies eine Diffusionszeit von 167  $\mu$ s (D = 0,95 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,02 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) auf. Ein zwei Nukleotide enthaltender Überhang am 3'-Terminus des antisense-Stranges sollte die Spaltung in ein nichtfluoreszentes etwa 21 bp dsRNA-Fragment und ein fluoreszentes etwa 5 Nukleotide enthaltendes ssRNA-Fragment ermöglichen. Nach Zugabe von rekombinantem Dicer zu dsRNA sank die Diffusionszeit, bis Sättigungsbereich erreicht wurde. Die im Gleichgewichtszustand bestimmte ein Produktdiffusionszeit betrug 76  $\mu$ s (D = 2,05 x 10<sup>-10</sup> ± 0,13 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>). Die etwa halb so große Diffusionszeit des Produktes im Vergleich zum Substrat ermöglichte die Unterscheidung beider Komponenten in einem Multikomponentenmodell. Das chemisch synthetisierte putative Produkt, eine 5 Nukleotide enthaltende Atto647N-markierte ssRNA, wies eine zum enzymatisch hergestellten Produkt identische Diffusionszeit von 76 µs  $(D = 2,05 \times 10^{-10} \pm 0,11 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$  auf. Mittels einer denaturierenden gelelektrophoretischen Trennung des Dicer-Produktes konnte die Spaltung des Substrates durch rekombinanten Dicer in ein signifikant kleineres Hauptprodukt nachgewiesen werden. Cy5markiertes Substrat ergab vergleichbare Mobilitäten im Dicer-Assay.

#### 3.1.5.2. Diffusionszeit des ES-Komplexes

Es wurde des Weiteren überprüft, ob der Enzym-Substrat-Komplex (ES-Komplex) aufgrund des hohen Molekulargewichtes von Dicer im Vergleich zu Substrat und Produkt durch seine Mobilität identifiziert werden könnte. Einen ersten Hinweis auf die Bildung Enzym-RNA-Komplexes ergab der Ersatz von MgCl<sub>2</sub> durch CaCl<sub>2</sub>. Es bildete sich ein stabiler höhermolekularer Komplex, wie es für RNase III bereits in der Literatur beschrieben wurde. Ein zweiter Hinweis auf die Bildung eines höhermolekularen Komplexes von etwa 270 µs wurde aus der Analyse kinetischer Daten bei höherer Substratkonzentration mittels eines *Fitting*-Modells für drei Diffusionsspezies erhalten. Diese Diffusionszeit lag im Bereich des theoretisch vorhergesagten Wertes für einen Dicer-Substrat-Komplex. Unspezifische Wechselwirkungen konnten aufgrund der Verwendung von reinem Enzym als Ursache für die Bildung eines höhermolekularen Komplexe.

Die Bildung eines ES-Komplexes konnte sowohl für Atto647N-markierte dsRNA als auch für Cy5-markierte dsRNA nachgewiesen werden. Eine Diffusionszeit von 271  $\mu$ s (D = 0,58 x  $10^{-10} \pm 0,07 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) wurde bestimmt. Sie war 1,6- bzw. 3,6-fach höher als die Diffusionszeiten von Substrat bzw. Produkt. Eine Differenzierung aller drei Komponenten mittels Multikomponentenmodell-Analyse war somit möglich.

#### 3.1.5.3. Spezifität des Dicer-Assays

Die Spezifität des auf Mobilität basierten *assays* für humanen Dicer konnte durch verschiedene Experimente überprüft werden. Rekombinanter Dicer verursachte eine Verringerung der Diffusionszeit von doppelsträngiger, jedoch nicht von einzelsträngiger RNA. Eine Doppelstrangspezifität von Dicer wurde in veröffentlichten Studien beschrieben. Nach Restriktion des Substrates durch das orthologe Enzym mit der ähnlichsten Substratspezifität, RNase III, wurden erheblich höhere Produktdiffusionszeiten erhalten. Die Enzymaktivität konnte durch Ersatz von MgCl<sub>2</sub> durch CaCl<sub>2</sub>, in Übereinstimmung mit Ergebnissen in veröffentlichten Studien, gehemmt werden. Ein vierter Hinweis auf die Dicer-Spezifität des *assays* wurde nach Überexpression des Dicer-Gens in einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) und in HeLa-Zellen erhalten. Die Enzymaktivität war in zytosolischen Extrakten von mit Dicer\_pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen um 70 Prozent erhöht im Vergleich zu Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert worden waren.

### 3.1.5.4. Kinetische Charakterisierung von humanem Dicer in Zellextrakten

Die Abhängigkeit der Dicer-Aktivität von der Substratkonzentration wurde in zytosolischen HEK293-Zellextrakten untersucht. Eine halbmaximale Enzymaktivität wurde bei einer Substratkonzentration von 68 nM bzw. 76 nM gemessen. Mit einem Hill-Koeffizienten von 1,8 wurde eine positive Kooperativität festgestellt, die einen Hinweis auf die Regulierung der Aktivität von Dicer gibt. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration ähnelte sich in Extrakten von nicht transfizierten Zellen ([S]<sub>1/2</sub> = 68 ± 13 nM; h = 1,8 ± 0,5) und Dicer überproduzierenden Zellen ([S]<sub>1/2</sub> = 76 ± 5 nM; h = 1,8 ± 0,1).

Die während des steady state pico- bis femtomolare ES-Komplex-Konzentration erhöhte sich durch Überexpression des Dicer-Gens bei den unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Sie wies, in Übereinstimmung mit theoretischen Vorhersagen, eine vergleichbare Abhängigkeit von der Substratkonzentration wie die Enzymaktivität auf (Kontrollzellen: [S]<sub>1/2</sub> =  $43 \pm 5$  nM; h =  $5,3 \pm 3,1$ ; Dicer überproduzierende Zellen:  $[S]_{1/2} = 44 \pm 4$  nM; h =  $3,4 \pm 1,0$ ). Während des linearen Produktzuwachses war die ES-Komplex-Konzentration in Extrakten Dicer überproduzierenden Zellen nahezu konstant. Die Analyse des ES-Komplexes im Rahmen der enzymkinetischen Theorie weist auf ein genaues Erfassen der ES-Komplex-Konzentration hin. Die inetische Daten aus Extrakten von nicht transfizierten ( $k_{cat} = 1,6 \times 10^2$  $\pm$  1,7 x 10<sup>1</sup> s<sup>-1</sup>; k<sub>sp</sub> = 2,3 x 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-</sup>) und Dicer überproduzierenden Zellen (k<sub>cat</sub> = 7,4 x 10<sup>1</sup>  $\pm$ 1,3 x  $10^1$  s<sup>-1</sup>; k<sub>sp</sub> = 9,7 x  $10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) stimmten umfassend überein. Endogener und rekombinant überproduzierter Dicer könnten daher in Zellextrakten vergleichbare kinetische Parameter aufweisen. Es wurde für überproduzierten Dicer eine katalytische Konstante von 4,2 x 10<sup>1</sup> s<sup>-1</sup> und eine Spezifitätskonstante von 5,5 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> errechnet. Die Spezifitätskonstante befindet sich im diffusionskontrollierten Bereich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit humaner Dicer enzymkinetisch in Zellextrakten, d.h. unter Annäherung an native Bedingungen, charakterisiert werden.

### 3.1.5.5. Was konnte mittels des Enzym-Assays, der auf Diffusion und Multikomponentenmodell-Analyse basiert, erreicht werden?

Erstmalig wurde ein auf Diffusion und Multikomponententenmodell-Analyse beruhender Ansatz für die Bestimmung von Enzymaktivitäten angewendet. Mittels dieses assays gelang es erstmals, Substrat, Produkt und ES-Komplex in einem Enzym-Assay während des *multiple turnovers* (und des *steady state*) simultan zu verfolgen. Neben der Etablierung eines neuen methodischen Ansatzes zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter mittels FCS wurden durch diesen biologisch relevante Informationen gewonnen.

Die gleichzeitige Detektion von Substrat, Produkt und ES-Komplex in Echtzeit erlaubte die kinetische Charakterisierung von überproduziertem sowie endogenem Enzym unbekannter Konzentration in Zellextrakten, in Annäherung an die native Umgebung. Ein vergleichbares Experiment wäre mittels Gelelektrophorese nicht möglich. Auch die Messung von Enzymaktivität mittels FCS in lebenden intakten Zellen könnte durchgeführt werden. Die unspezifische Wechselwirkung des Atto647N-markierten Substrates mit zellulären Komponenten verhindert jedoch nach den Ergebnissen dieser Arbeit eine Messung der Produktbildung durch Diffusionszeitenanalyse. Hierfür wäre eine Weiterentwicklung des assays notwendig, auf die im Ausblick eingegangen wird.

Die Analyse des theoretisch gut beschriebenen enzymkinetischen Systems erlaubte, die bis dahin gültigen Limitierungen der auf Diffusionszeiten basierten Multikomponenten-Analyse zu hinterfragen. *State-of-the-art* konfokale Mikroskopie und neu entwickelte photostabilere Fluorophore erlaubten eine 1.000-fach sensitivere Unterscheidung zwischen Diffusionsspezies als in einer veröffentlichten systematischen Studie. Aus moderner Messtechnik entstandenes Potential der auf Diffusion basierten Multikomponentenanalyse konnte damit im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt werden.

# 3.1.6. Ausblick zur Analyse der durch Dicer katalysierten RNA-Spaltung

Der auf Mobilität und Multikomponentenmodell-Analyse beruhende Ansatz zur kinetischen Charakterisierung von Enzymaktivität ist allgemein übertragbar auf *multiple turnover-assays*, in denen sich Produkt und Substrat mindestens 1,6-fach in ihrem Molekulargewicht voneinander unterscheiden. Weist auch das Enzym eine von Produkt und Substrat signifikant unterschiedliche Mobilität auf, kann die ES-Komplex-Konzentration bestimmt werden, die es unter anderem ermöglicht, bei unbekannter Enzymkonzentration k<sub>cat</sub> und damit die Spezifitätskonstante zu bestimmen. *Pre-steady-state-*Kinetiken, in denen die Enzymkonzentration erheblich höher als in *multiple turnover-assays* ist, wären ein weiterer Anwendungsbereich.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Spaltung von dsRNA in siRNA unterliegt u.U. anderen Regulationsmechanismen als die Spaltung von pre-miRNA in miRNA (siehe

Kap. 1.1.). Es wäre deshalb interessant, die Dicer-Aktivität bezüglich der Spaltung von premiRNA zu charakterisieren.

Eine mit der hohen Sensitivität des *assays* verbundene hohe Störanfälligkeit durch Wechselwirkung mit zellulären Bestandteilen wurde in Zellextrakten mit hohem Proteingehalt und *in vivo* beobachtet. In Zellextrakten konnten durch Verwendung einer zusätzlichen Diffusionsspezies in der Multikomponentenanalyse Produkt- und Substratkonzentration bestimmt werden. Eine Diffusionszeitenanalyse der *in vivo* ermittelten Daten ergab keine zeitabhängige Produktformierung. Die Anwendung des auf Mobilität basierten Enzym-*Assays* scheint aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zwar für Zellextrakte, jedoch nicht für lebende Zellen geeignet zu sein.

Eine Alternative für Messungen *in vivo* böte die für Aggregation weniger sensitive Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS), die schon für Enzymaktivitätsmessungen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt wurde [65, 66, 75, 77, 143]. Das Verständnis der RNA-Interferenz könnte durch eine Messung der Dicer-Aktivität *in vivo* erheblich verbessert werden. Mit der Entwicklung eines solchen FCCS-basierten Dicer-*Assays* wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit begonnen.

Mit dem komplexeren optischen Aufbau von FCCS ist ein erhöhtes Risiko verbunden, Artefakte zu messen (Kap. 2.2.5.3. und 2.2.5.4.). Die Sensitivität von FCCS könnte deshalb im Vergleich zur Autokorrelationsanalyse etwas geringer sein. Eine Detektion von Konzentrationsunterschieden von zwei Größenordnungen wurde für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete System bestimmt [131]. Ob eine Detektion des ES-Komplexes während des *multiple turnovers* (*steady state*) durch Kreuzkorrelation des Fluoreszenzsignals von verschieden markiertem Substrat und Enzym möglich ist, müsste untersucht werden. Ein auf Autokorrelation und ein auf Kreuzkorrelation basierter Enzym-*Assay* könnten komplementäre Informationen bereitstellen.

Erkenntnisse, die in nativer Umgebung erhalten werden, könnten anschließend in weniger komplexerer Umgebung analysiert werden. Durch das Charakterisieren des Einflusses isolierter Faktoren auf die Aktivität von gereinigtem Enzym wäre eine genauere Analyse des kooperativen kinetischen Verhaltens von humanem Dicer möglich.

## 3.2. Charakterisierung des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers

In einem zweiten Projekt sollte die Anwendbarkeit der Fluoreszenzmarkierung von RNA mittels des Sulforhodamin B-bindenden RNA-Aptamers (Kap. 1.4.) und des photostabilen Sulforhodamin B in FCS-Messungen (Kap. 1.3.) untersucht werden. Der RNA-Fluorophor-Komplex sollte strukturbiochemisch charakterisiert werden

Das Sulforhodamin B bindende RNA-Aptamer SRB-2 wurde zu einem 54 Nukleotide enthaltenden RNA-Aptamer, das in dieser Arbeit SRB2m2 genannt wurde, minimiert [89]. Nach Analyse des Selektionspools wurden drei Mutationen identifiziert, die die Affinität zu Sulforhodamin B erhöhten. Das so modifizierte RNA-Aptamer SRB2m wurde in dieser Arbeit im Komplex mit Sulforhodamin B charakterisiert, um die Größe des *Tags* in einem Fusionskonstrukt zu reduzieren und zusätzlich eine Kristallisation der RNA zu erleichtern.

Eine 107-fache Erhöhung der Quantenausbeute des Fluorophors Patent Blau V (PBV) durch Bindung an das nicht minimierte RNA-Aptamer SRB-2 wurde fluoreszenzspektroskopisch in einer veröffentlichten Studie nachgewiesen [91]. Eine Affinität von PBV zu den minimierten RNA-Aptameren SRB2m und SRB2m2 wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels FCS untersucht und die PBV-SRB2m(2)-Komplexe charakterisiert.

# 3.2.1. Detektion des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes durch Diffusionszeitenanalyse

In einer Titration sollte die Dissoziationskonstante des Sulforhodamin B–SRB2m- Komplexes mittels FCS bestimmt werden. Zunächst wurde durch *in vitro*-Transkription SRB2m-RNA hergestellt (**Abb. 46a**, **c**, **e** und **g**; Sequenzen: Kap. 2.1.9.; RNA-Herstellung: Kap. 2.2.2.1. - 2.2.2.8.). Zu Beginn jedes Versuchtags wurde die RNA de- und renaturiert, um die Tertiärstruktur des Aptamers reproduzierbar herzustellen (Kap. 2.2.2.9.).

In Titrationsexperimenten wurden zu 10 nM Sulforhodamin B schrittweise kleine Volumina von SRB2m-RNA hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 – 4  $\mu$ M zu erreichen (Kap. 2.2.5.). Vor jeder FCS-Messung wurden Sulforhodamin B und RNA 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe der höchsten RNA-Konzentration von 3  $\mu$ M konnte eine deutliche Verschiebung auf der Zeitachse der Autokorrelation beobachtet werden (**Abb. 47a**). Diffusionszeit, Diffusionskoeffizient und andere Parameter der FCS-Messungen von

Sulforhodamin B und nach Zugabe von 4 µM SRB2m-RNA sind in **Tabelle 20** zusammengefasst.



#### Abbildung 46 Herstellung der SRB2m- und FB1-RNA

a) und b) Das DNA-Templat zur *in vitro*-Transkription der SRB2m- (a) und FB1-DNA (b) wurde mittels PCR hergestellt und gelelektrophoretisch in einem nativen 10 %igen Polyacrylamidgel getrennt (Kap. 2.2.2.2. - 2.2.2.4.). In Bahn 1 wurde der Größenstandard *pUC19 DNA/Mspl* aufgetragen. c) und d) Die SRB2m-DNA (c, 73 bp) und FB1-DNA (d, 111 bp) wurden *in vitro* – transkribiert und gelelektrophoretisch in einem denaturierenden 10 %igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel getrennt (Kap. 2.2.2.4., 2.2.2.5. und 2.2.2.7.). In Bahn 1 wurde der Größenstandard *RiboRuler™ RNA Low Range Ladder* aufgetragen. e) – f) Die SRB2m-RNA (e und g, 54 nt) und FB1-RNA (f, 90 nt) wurden gereinigt und gelelektrophoretisch in einem denaturierenden 10 %igen Gel getrennt (Kap. 2.2.2.4., 2.2.2.4., 2.2.2.7. und 2.2.2.8.). e) und f) In Bahn 1 wurde der Größenstandard *RiboRuler™ RNA Low Range Ladder* aufgetragen aufgetragen aufgetragen aufgetragen aufgetragen. g) In Bahn 1 wurde *Gene Ruler™ DNA Ultra Low Range Ladder* aufgetragen als kleinster Nukleinsäure-Größenstandard.

Die durchschnittliche Diffusionszeit wurde mittels eines *Fitting*-Modells für eine Diffusionsspezies identifiziert (Glg. 3 mit n = 1). In Abhängigkeit von der RNA-Konzentration erhöhte sich die Diffusionszeit von 31  $\mu$ s auf 122  $\mu$ s (D = 0,73 x 10<sup>-10</sup> ± 0,02 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>; Glg. 5; **Abb. 48a**). Dieser Wert wurde der Komplexdiffusionszeit zugeordnet. Die Auswertung der Daten mittels eines *Fitting*-Modells für zwei

a)

b)

Diffusionsspezies bei fixierter Fluorophordiffusionszeit ergab die Konzentration des Komplexes (Glg. 3 mit n = 2).

1,0 0,8 0,6 G(1) 0,4 0,2 0,0 0,01 0,00 -0,01 1 10 100 1000 τ **(μs)** 1,0 0,8 0,6 <u>(</u>ц) 0,4 0,2 0,0 0,01 0,00 -0,01 10 100 1000 1 τ (µs)



a) und b) Bei 0,2 µs normalisierte Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von 10 nM Sulforhodamin B vor (offene Symbole) und nach Zugabe von 3 µM SRB2m-RNA (a; gefüllte Symbole) oder von 3 µM FB1-RNA (b; Kontrolle; gefüllte Symbole) (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.; Messzeit 40 x 10 s; 15 % AOTF). Die Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von den Ergebnissen eines *fits* an ein Modell für eine Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 1) sind unterhalb der jeweiligen Autokorrelationsfunktion dargestellt. Arithmetische Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

Der Komplexanteil wurde für die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen berechnet (Glg. 30). Die Erhöhung der molekularen Zählrate von Sulforhodamin B nach Bindung an SRB2m von 26 kHz auf 36 kHz wurde in der Berechnung des Komplexanteils berücksichtigt (Glg. 31; **Tab. 20**). Der korrigierte Komplexanteil wurde gegen die RNA-Konzentration aufgetragen und an eine hyperbolische Funktion *gefittet* (Glg. 32; **Abb. 48b**). Es ergab sich eine Dissoziationskonstante von 238  $\pm$  42 nM, die sich in der Größenordnung der Literaturwerte von 70 nM und 360 nM befand [89].

Das *fitten* der Diffusionszeit, die durch das *fitten* der Daten an ein Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt worden war, mittels einer hyperbolischen Funktion in Abhängigkeit von der RNA-Gesamtkonzentration ergab eine Dissoziationskonstante von 148 ± 32 nM (**Abb. 48a**; Glg. 32). Sie ähnelt in Übereinstimmung mit der Aussage einer früheren Studie [140] dem durch im *Fitting*-Modell für zwei Diffusionsspezies bestimmten Wert. Die Möglichkeit einer solchen Auswertung kann interessant sein, wenn der Unterschied der Diffusionszeiten von Komplex und freiem Ligand zu gering für eine Unterscheidung im *Fitting*-Modell für zwei Diffusionsspezies ist.





Mittels FCS wurde die Diffusionszeit von Sulforhodamin B nach Zugabe von SRB2m-RNA (gefüllte Symbole) oder FB1-RNA (offene Symbole) bis zu einer Konzentration von etwa 4  $\mu$ M gemessen (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Die Messzeit betrug 40 x 10 s und die Laserstärke 15 % AOTF. a) Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$  von Sulforhodamin B nach Zugabe verschiedener Mengen SRB2m- oder FB1-RNA. Die Diffusionszeiten nach Zugabe von SRB2m wurden nichtlinear an eine hyperbolische Funktion *gefittet* (Glg. 32; K<sub>d</sub> = 148 ± 32 nM, R<sup>2</sup> = 0,87). b) Der Anteil des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes Y wurde durch ein *Fitting*-Modell für zwei Diffusionsspezies bestimmt, wobei die Diffusionszeit des ungebundenen Fluorophors fixiert wurde (Glg. 3). Der um die im Komplex veränderte molekulare Zählrate korrigierte Komplexanteil Y' wurde nichtlinear an eine hyperbolische Funktion *gefittet*. (Glg. 32; K<sub>d</sub> = 238 ± 24 nM, R<sup>2</sup> = 0,98). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden von Daten aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet.
Als ein weiterer Parameter wurde die Triplett-Singulett-Wechselwirkung, d.h. der Anteil der Chromophore, die sich im Triplettzustand befinden  $T_T$  und die Triplettzeit  $\tau_T$  von Sulforhodamin B und vom Sulforhodamin B-SRB2m-Komplex analysiert (Kap. 2.2.5.1. und 2.2.5.3.). Der Triplettanteil  $T_T$  war im Komplex mit 17 % signifikant höher als im ungebundenen Fluorophor mit 2 % (**Tab. 20**). Auch die Triplettzeit  $\tau_T$  erhöhte sich von 2 µs auf 10 µs. Beide Werte überschritten jedoch nicht die Grenzwerte von 20 - 30 % und 5 – 10 µs [131, 132]. Eine Veränderung der Singulett-Triplett-Wechselwirkung von *Rhodamin-6Green* (R6G) in Abhängigkeit von der dGTP-Konzentration wurde bereits früher beschrieben [128]. Ob durch das *fitten* der Daten tatsächlich Triplettzeit und –anteil des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes identifiziert wurden, wurde experimentell überprüft (siehe Kap. 3.2.3.).

RNA	Molekulare Zählrate (kHz)	τ <sub>Diff</sub> (μs)	D (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>T</sub> (μs)	$\chi^2$ –Test
-	$26\pm5$	30,6 ± 0,4	2,91 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,03 x 10 <sup>-10</sup>	8 ± 1	2 ± 1	2,5 x 10 <sup>-6</sup> ± 1,2 x 10 <sup>-7</sup>
SRB2m	$36\pm2$	$122\pm3$	0,73 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,02 x 10 <sup>-10</sup>	17 ± 1	$10\pm4$	7,5 x 10 <sup>-6</sup> ± 2,3 x 10 <sup>-6</sup>
-	29 ± 2	30,5 ± 0,5	2,93 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,05 x 10 <sup>-10</sup>	11 ± 1	$3\pm 2$	2,5 x 10 <sup>-6</sup> ± 1,2 x 10 <sup>-7</sup>
FB1	26 ± 5	30,1 ± 0,1	2,97 x 10 <sup>-10</sup> ± 0,01 x 10 <sup>-10</sup>	9±3	2,3 ± 0,2	2,5 x 10 <sup>-6</sup> ± 1,2 x 10 <sup>-7</sup>

## Tabelle 20 FCS-Parameter von Sulforhodamin B

Mittels FCS wurde die Diffusionszeit von Sulforhodamin B vor und nach Zugabe von 4  $\mu$ M SRB2m-RNA oder FB1-RNA (Kap. 2.2.5.) gemessen und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Parameter der FCS-Messungen von Sulforhodamin B vor (-) und nach Zugabe von 4  $\mu$ M SRB2m-RNA bzw. 3  $\mu$ M FB1-RNA wurden durch *Fitten* an ein Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 1; D: Glg. 5; Versuche aus **Abb. 48**). Arithmetische Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

Die RNA eines Fluoreszein bindenden RNA-Aptamers (FB1) wurde als Kontroll-RNA in einem vergleichbaren Titrationsexperiment verwendet (**Abb. 46b**, **d** und **f**) [89]. Die Zugabe von FB1-RNA bewirkte weder eine Veränderung der Diffusionszeit noch der molekularen Zählrate oder der Singulett-Triplett-Wechselwirkung (**Abb. 48a**; **Tab. 20**). Dies ist auch in der Autokorrelationsfunktion von Sulforhodamin B vor und nach Zugabe von 3 µM FB1-RNA zu beobachten (**Abb. 47b**). Damit konnte die Spezifität der Bindung von SRB2m an Sulforhodamin B auf Einzelmolekülebene unter Betrachtung der molekularen Zählrate, der Triplettzeit und der Diffusionszeit nachgewiesen werden.

Eine Veränderung der Fluoreszenzemission von Rhodaminen durch Interaktion mit Nukleotiden oder RNA-Aptameren wurde mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie bereits detailiert untersucht [91, 92, 187, 188]. Als Ursache wurde der photoinduzierte Elektronentransfer beschrieben, der durch die hydrophobe Wechselwirkung von Farbstoff und Nukleotid in Abhängigkeit von Redoxpotentialen ermöglicht wird [187, 188]. Eine geringe Änderung der Fluoreszenzintensität wurde auch für Sulforhodamin B nach Bindung an SRB2m erwähnt [89]. Auch bei der Wechselwirkung von Sulforhodamin B und SRB2m könnte ein photoinduzierter Elektronentransfer auftreten.

Des Weiteren wurde für verschiedene Triphenyl-Methan-Farbstoffe eine Verschiebung des Emissionsmaximums um 8 - 10 nm in den längerwelligen Bereich des Spektrums nach Bindung an SRB-2 beobachtet [91]. Mittels eines Fluoreszenzspektrometers wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Horst Weller an der Universität Hamburg eine Verschiebung des Emissionsmaximums von Sulforhodamin B von 584 auf 591 nm nach Zugabe von SRB2m-RNA beobachtet (**Abb. 49**). Auch eine geringfügige Erhöhung der Fluoreszenzintensität konnte beobachtet werden. Die Verschiebung des Emissionsmaximums in den längerwelligen Bereich würde in FCS-Messungen die Zählrate im Bereich des BP-Filters 585-615 erhöhen und stellt ebenfalls eine Erklärung für die Erhöhung der molekularen Zählrate von Sulforhodamin B nach Bindung an SRB2m dar.



Abbildung 49 Fluoreszenzemissionsspektren von Sulforhodamin B

Abgebildet sind Fluoreszenzemissionsspektren von Sulforhodamin B bei 565 nm Anregung vor (gefüllte Quadrate) und nach Zugabe von 1 µM SRB2m-RNA (offene Quadrate).

Die gemessene Erhöhung des Triplettanteils von Sulforhodamin B im Komplex mit SRB2m muss auch als Hinweis auf eine erhöhte Tendenz zum Photobleichen interpretiert werden,

die durch die SRB2m-Bindung hervorgerufen wird [129, 138]. Dies stimmt mit der gemessenen Verringerung der Zählrate von Sulforhodamin B während der Titration von 116 auf 78 kHz um ein Drittel überein. In einer publizierten Studie wurde eine Messzeit von 10 x 10 s bei einer Laserenergie von 10 % AOTF für Messungen mit Sulforhodamin B eingesetzt [93]. Nach Reduktion der Messzeit von 40 x 10 s auf 5 x 10 s bei gleichzeitiger Reduktion der Laserenergie von 15 auf 10 % AOTF während eines Titrationsexperiments von Sulforhodamin B und SRB2m (**Abb. 50**) wurde jedoch eine vergleichbare Verringerung der Zählrate um ein Drittel von 56 auf 37 kHz zu dem in **Tabelle 20** und **Abbildung 48** dargestellten Experiment gemessen.



Abbildung 50 Titrationsexperiment von Sulforhodamin B und SRB2m mittels FCS bei geringerer Laserstärke und Messzeit

Mittels FCS wurde die Diffusionszeit von Sulforhodamin B nach Zugabe von SRB2m-RNA bis zu einer Konzentration von etwa 4  $\mu$ M gemessen (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Die Messzeit betrug 5 x 10 s und die Laserstärke 10 % AOTF. Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff}}$  von Sulforhodamin B nach Zugabe verschiedener Mengen SRB2m- oder FB1-RNA. a) Die Diffusionszeiten nach Zugabe von SRB2m wurden nichtlinear an eine hyperbolische Funktion *gefittet* (Glg. 32; K<sub>d</sub> = 137 ± 32 nM, R<sup>2</sup> = 0,88). b) Der Anteil des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes Y wurde durch ein *Fitting*-Modell für zwei Diffusionsspezies bestimmt, wobei die Komplexdiffusionszeit fixiert wurde (Glg. 3). Der um die im Komplex veränderte molekulare Zählrate korrigierte Komplexanteil Y' wurde nichtlinear an eine hyperbolische Funktion *gefittet*. (Glg. 32; K<sub>d</sub> = 272 ± 54 nM, R<sup>2</sup> = 0,93). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden von Daten aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

Eine vergleichbare Erhöhung des Triplettanteils und der Triplettzeit konnten ebenfalls festgestellt werden. Aus den Experimenten, die in **Abbildung 48** und **50** dargestellt sind ergab sich eine durchschnittliche Erhöhung des Triplettanteils um das Dreifache und der Triplettzeit um das Siebenfache. Die Dissoziationskonstante betrug nach Auswertung der Diffusionszeit 137  $\pm$  30 nM (**Abb. 50a**; Glg. 32). Die Auswertung der Daten mittels eines

*Fitting*-Modells für zwei Komponenten ergab nach Fixieren der Komplexdiffusionszeit eine Dissoziationskonstante von 272 ± 54 nM (**Abb. 50b**; Glg. 3 mit n = 2; Glg. 30 - 32). Eine Auswertung der Daten nach Fixieren der Komplexdiffusionszeit ist aufgrund des höheren Unterschiedes zur Triplettzeit vermutlich genauer als nach Fixieren der Diffusionszeit des ungebundenen Fluorophors. Der Komplexanteil sollte sich theoretisch nach Erreichen des Sättigungsbereiches dem Wert 1 annähern. Die kürzere Messzeit und das geringere Signal bzw. Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis führten u.U. dazu, dass sich der Komplexanteil statt bis auf 0,93, wie nach den längeren Messzeiten, nur bis auf 0,85 erhöhte. Die Dissoziationskonstanten, die bei unterschiedlichen Messzeiten und Laserstärken bestimmt wurden, unterschieden sich um etwa ein Zehntel und stimmten damit in der Größenordnung überein.

Durch Photobleichen kann die Bestimmung der Diffusionszeiten ungenau werden. Werden aber die Laserenergie und Messzeit so niedrig eingestellt, dass das Risiko des Photobleichens minimert ist, kann es durch eine zu geringe Signalintensität oder ein zu geringes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu einer ungenauen Bestimmung der Diffusionszeit kommen [145]. Eine höhere Ungenauigkeit in der Bestimmung des Komplexanteils war bei der geringeren Messzeit und Laserenergie zu beobachten.

In dem in **Abbildung 48** dargestellten Experiment konnten mit 15 % AOTF Laserstärke eine im Vergleich zur Literatur sehr hohe molekulare Zählrate von 26 kHz von Sulforhodamin B und von 36 kHz des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes erreicht werden [93]. Im Zusammenhang mit der langen Messzeit von 40 x 10 s kann deshalb von einer sehr hohen Signalintensität und einem sehr hohen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis gesprochen werden [145]. Die Übereinstimmung der in diesem Experiment ermittelten Dissoziationskonstante mit Literaturdaten und der Konstante aus dem Experiment bei kurzer Messzeit spricht gegen eine ausgeprägte Veränderung der Diffusionszeiten durch Photobleichen. Die Genauigkeit der Diffusionszeit des Komplexes sollte zusätzlich durch den Vergleich der aus der Diffusionszeit berechneten molekularen Größe (hydrodynamischer Radius r<sub>H</sub>; Glg. 8) mit den Trägheitsradien aus RKWS-Experimenten überprüft werden (Kap. 3.2.6.).

Würde die Diffusionszeit des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes ohne vorhergehende Titration gemessen, sollten sich Artefakte, die durch Photobleichen verursacht wurden, durch eine stark verringerte Messzeit ebenfalls minimieren lassen. In zwei unabhängigen Experimenten wurde eine 13 nanomolare Sulforhodamin B-Lösung nach Zugabe von SRB2m mit einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M vermesssen. Es wurde eine Diffusionszeit von 126 ± 7  $\mu$ s (D = 0,71 x 10<sup>-10</sup> ± 0,04 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>; Glg. 5) bestimmt, die mit der in der Titration bestimmten Diffusionszeit von 122  $\mu$ s (D = 0,73 x 10<sup>-10</sup> ± 0,02 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>, **Tab. 20** und **Abb. 48**) sehr gut übereinstimmt. Ein ausgeprägtes Artefakt bei der Bestimmung der Diffusionszeit konnte demzufolge ausgeschlossen werden.

# 3.2.2. Tendenz des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes zur Spinumkehr

Es sollte im Folgenden überprüft werden, ob die kurzzeitigen Fluoreszenzintensitätsfluktuationen von bis zu 10 µs von einer Singulett-Triplett-Wechselwirkung verursacht wurden (Tab. 20; siehe auch Kap. 2.2.5.1. und 2.2.5.3.). Dazu wurde eine Lösung, in der Sulforhodamin B vollständig durch SRB2m gebunden war, mit unterschiedlichen Laserintensitäten bestrahlt. Der Triplettanteil T<sub>T</sub> sollte sich theoretisch proportional abhängig von der Laserintensität erhöhen, um schließlich einen Sättigungsbereich zu erreichen [126, 128, 129].

Die Zählrate und die molekulare Zählrate stiegen proportional zur Laserstärke an (**Abb. 51a** und **b**). Für die molekulare Zählrate existiert ein Maximum, weshalb sie bei der Laserenergie von 0,4 mW abzuflachen beginnt (**Abb. 51b**; Kap. 2.2.5.3.). Ein vergleichbares Phänomen wurde für R6G beobachtet [129].

Der Triplettanteil T<sub>T</sub> stieg von 4 bis 26 % proportional zu der Laserintensität an (**Abb. 51c**). Ein Sättigungsbereich wurde nicht erreicht. Die Triplettzeit  $\tau_T$  wies konstante Werte von etwa 10 µs auf (**Abb. 51d**). Die hohe Triplettzeit bei 0,05 mW Laserenergie ist vermutlich bedingt durch die zu geringe Signalintensität von 9 kHz molekularer Zählrate und 18 kHz Zählrate bei einer Messzeit von 5 x 10 s. Die Konstanz der Triplettzeit steht im Kontrast zu dem beobachteten Absinken der Triplettzeit von R6G in Gegenwart von 2 mW dGTP mit Zunahme der Laserenergie [128].

Die beobachtete proportionale Erhöhung des Triplettanteils zur Laserenergie deutet darauf hin, dass die kurzzeitigen Fluoreszenzintensitätsfluktuationen, die in Kapitel 3.2.1. dem Triplettzustand zugeordnet wurden, tatsächlich vom Triplettzustand verursacht wurden. Jedoch ist die Relaxationszeit von etwa 10  $\mu$ s außerhalb typischer Triplettzeiten von 2 – 4  $\mu$ s. Es könnte sich bei den beobachteten Fluktuationen auch um den Wechsel zwischen einem fluoreszenten und nichtfluoreszenten Zustand handeln. Dieser könnte durch Wechselwirkung der für die Bindung notwendigen negativ geladenen Sulfongruppen des Sulforhodamin B mit der Aptamer-RNA hervorgerufen worden sein.



Abbildung 51 Abhängigkeit der Triplett-Singulett-Wechselwirkung des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes von der Laserenergie

Eine etwa 5  $\mu$ M SRB2m enthaltende Sulforhodamin B-Lösung (13 nM) wurde mit 2 bis 20 % der maximalen Laserstärke von 2,5 mW eines Helium-Neon Lasers bei 543 nm bestrahlt und mittels FCS mit einer Messzeit von 5 x 10 s gemessen (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.). a) Zählrate. b) Molekulare Zählrate. c) Triplettanteil T<sub>T</sub>. d) Triplettzeit  $\tau_T$ . Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18; b - d) wurden von Daten aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

## 3.2.3. Detektion des SRB2m-PBV-Komplexes durch die molekulare Zählrate

Eine Bindung von Patent Blau V (PBV) an SRB-2 wurde in einer früheren Studie beschrieben [91]. Eine 107-fach erhöhte Quantenausbeute durch Bindung an SRB-2 auf 0,04 wurde nachgewiesen. Fluoreszenzintensitätsmessungen ergaben einen K<sub>d</sub> von 23  $\mu$ M. Die Bindung an die minimierte Form SRB2m, die für die Sulforhodamin B-Erkennung optimiert wurde, und an die sich durch 3 Mutationen unterscheidende RNA SRB2m2 wurden mittels FCS untersucht (Kap. 2.1.9. und 1.4.). Es sollte dadurch eine mögliche Anwendbarkeit von PBV in Kombination mit SRB2m für die RNA-Markierung mittels FCS überprüft werden. Absorptions-und Emissionsmaxima, Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute und Molekulargewicht sind in **Tabelle 21** zusammengefaßt (siehe Kap. 2.2.5.) [91, 103].

Tabelle 21 Spektrale Eigenschaften von Sulfornodamin B und PBV						
Markierung	Absorptions- Emissions- maximum maximum		Extinktionskoeffizient $\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Quanten- ausbeute	m (g/mol)	
Sulforhodamin B	565	586	8,7 x 10 <sup>4</sup>	0,69	580	
Patent Blau V	638	666	nicht bekannt	0,0004	583	

Ungebundenes PBV ergab keine Autokorrelationsfunktion, obwohl die Zählrate eine

gleichmäßige Fluktuation der Signalintensität über die Zeit ergab (Abb. 52a und 53a).



### Abbildung 52 Zählraten-Zeitverlauf von PBV

Die Zählrate von 16 nM PBV wies ohne Zugabe von SRB2m (a) und nach Zugabe von etwa 60 µM SRB2m (b) einen gleichmäßigen Verlauf auf (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.). Aggregate und starkes Photobleichen waren nicht zu erkennen.

a)

b)



Abbildung 53 Autokorrelationsfunktion des PBV-SRB2m-Komplexes

a) und b) Bei 0,2  $\mu$ s normalisierte Autokorrelationsfunktionen G( $\tau$ ) von 16 nM PBV vor (offene Symbole) und nach Zugabe von etwa 60  $\mu$ M SRB2m RNA (b, gefüllte Symbole) oder 60  $\mu$ M tRNA (d, gefüllte Symbole) (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.). Die Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von den Ergebnissen eines *fits* an ein Modell für eine Diffusionsspezies (Glg. 3 mit n = 1) sind jeweils unterhalb der Autokorrelationsfunktion dargestellt.

Die Zählrate von PBV nahm proportional zur Konzentration zu (16 nM: 3 kHz; 0,16  $\mu$ M: 27  $\pm$  8 kHz; 1,6  $\mu$ M: 341  $\pm$  27 kHz). Jedoch blieb die molekulare Zählrate unter 0,5 kHz.

Diese Beobachtung kann durch die geringe Quantenausbeute von PBV von 3,9 x 10<sup>-4</sup> erklärt werden, die eine Einzelmoleküldetektion nicht ermöglicht (Kap. 2.2.5.1.) [91].

Die Affinitäten von SRB2m2 als auch von SRB2m zu PBV wurden getestet. Ausführlich dargestellt ist im Folgenden die Titration von SRB2m2. Die Aptamer-RNA wurde wie in Kapitel 2.2.2.9. beschrieben de- und renaturiert, um die Tertiärstruktur des Aptamers reproduzierbar herzustellen.

Zu in Selektionspuffer gelöstem PBV wurden schrittweise kleine Volumina von SRB2m2-RNA hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 0,4 bis 60  $\mu$ M zu erreichen (Kap. 2.2.5.). Vor jeder Messung wurden PBV und RNA 1 min bei RT inkubiert. Die Autokorrelationsfunktion wurde mittels eines Modells für eine Diffusionsspezies *gefittet* (Glg. 3 mit n = 1). Im Folgenden wurden die RNA-Konzentrations-Abhängigkeit der Zählrate, der molekularen Zählrate, der Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen, der Diffusionszeit, der zeitlich nicht normalisierten Autokorrelations-Amplitude und der Tendenz zu Spinumkehr analysiert, um den PBV-SRB2m2-Komplex spektroskopisch zu charakterisieren (**Abb. 54**; siehe auch Kap. 2.2.5.3.).

Schrittweise Zugaben von 0,4 bis 4 µM SRB2m2 zu 16 nM PBV führten zu einem Anstieg der Autokorrelations-Amplitude (**Abb. 54a**, siehe auch Kap. 2.2.5.3.). Die molekulare Zählrate erhöhte sich von 0,2 auf 6,2 und die Zählrate von 2 kHz auf 9 kHz (**Abb. 54b** und **c**). Es wurde deshalb auf eine Erhöhung der Signalintensität durch Zugabe von SRB2m2 geschlossen. In **Tabelle 22** sind die Parameter der FCS-Messung von PBV in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von SRB2m2 zusammengefasst.

[SRB2m2] (µM)	Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	Ν	T <sub>T</sub> (%)	τ <sub>τ</sub> (μs)	$\chi^2$ –Test
0	0,2 ± 0,1	2 ± 1	380	95	21 ± 28	5,3 x 10 <sup>-4</sup> ± 5,0 x 10 <sup>-4</sup>
3	$5\pm3$	6 ± 1	1,5 ± 0,9	17 ± 1	$6\pm4$	5,8 x 10 <sup>-5</sup> ± x 2,9 10 <sup>-5</sup>
4	$6\pm3$	9 ± 1	1,9 ± 0,8	16 ± 1	8 ± 4	2,3 x 10 <sup>-5</sup> ±3,1 x 10 <sup>-7</sup>
60	8 ± 2	$54\pm 6$	8,1 ± 0,1	$20\pm4$	$22\pm5$	1,4 x 10 <sup>-6</sup> ±7,8 x 10 <sup>-7</sup>

## Tabelle 22 FCS-Parameter von PBV

Mittels FCS wurde die Diffusionszeit von Sulforhodamin B vor und nach Zugabe von 3, 4 oder 60  $\mu$ M SRB2m2-RNA (Kap. 2.2.5.) gemessen und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Parameter der FCS-Messungen von PBV vor und nach Zugabe von bis zu 60  $\mu$ M SRB2m2-RNA wurden durch *Fitten* an ein Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 1; Versuche aus **Abb. 54**). Arithmetische Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen wurden nach Gleichung 17 und Standardabweichungen nach Gleichung 18 berechnet.

Die zusätzliche Zugabe von RNA auf bis zu 60  $\mu$ M Endkonzentration bewirkte ein weiteres Ansteigen der Zählrate, die schließlich in einen Sättigungsbereich von 54 kHz überging (**Abb. 54b**). Die molekulare Zählrate erhöhte sich nicht mehr signifikant (**Abb. 54c**). Man konnte also auf ein konstantes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis schließen. Trotzdem sank die Amplitude der zeitlich nicht normalisierten Autokorrelationsfunktion (**Abb. 54a**). Durch die kontinuierliche Erhöhung der Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration konnte dieses Phänomen erklärt werden (**Abb. 54d**). Beide Parameter verhalten sich umgekehrt proportional zueinander (Kap. 2.2.5.3.) [131]. Es wurde aus der maximalen Partikelzahl N von 8,1 ± 0,1 eine PBV-Konzentration von 16 nM berechnet (Glg. 3 - 7). Weil für PBV kein Extinktionskoeffizient bekannt ist, wurde mittels FCS die PBV-Konzentration bestimmt (**Tab. 21**). Während des gesamten Experiments war die Diffusionszeit nahezu konstant (**Abb. 54e**). Es wurde daraus geschlossen, dass nur der Komplex mittels FCS detektiert werden konnte. Die Reduzierung der Diffusionszeit mit zunehmender RNA-Konzentration von etwa 160 auf 144 µs kann durch die Zunahme der Signalintensität und des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses erklärt werden.

Auch Photobleichen könnte eine Reduktion der Diffusionszeiten verursachen. Bei maximaler Signalintensität und maximalem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis wurde die Diffusionszeit des PBV-SRB2m2-Komplexes auf 144  $\pm$  8 µs (D = 1,09 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,06 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; Glg. 5) bestimmt. Wurde die Diffusionszeit von PBV nach Zugabe von 60 µM SRB2m ohne vorhergehende Titration gemessen, wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit 141  $\pm$  1 µs eine vergleichbare Diffusionszeit erhalten (D = 1,11 x 10<sup>-10</sup>  $\pm$  0,01 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; Glg. 5). Es konnten somit durch die Titration bedingte Artefakte, wie z.B. Photobleichen, in der bestimmten PBV-SRB2m2-Mobilität ausgeschlossen werden.

Die Bildung des Komplexes konnte durch die Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen während der Titration direkt gemessen werden. Auch die Zählrate stellte ein Maß für die Komplexbildung dar. Die Zählrate und die Anzahl der Partikel im Detektionsvolumen zeigten eine Abhängigkeit von der SRB2m2-Konzentration, die durch eine hyperbolische Funktion nichtlinear beschrieben werden konnte (Glg. 32; **Abb. 54b** und **d**). Es ergaben sich daraus Dissoziationskonstanten von  $32 \pm 3$  bzw.  $19 \pm 2 \mu$ M.

SRB2m stimmte in zwei voneinander unabhängig durchgeführten Titrationen in den K<sub>d</sub>-Werten und der Mobilität nahezu exakt mit den Ergebnissen der SRB2m2-Experimente überein (Anzahl der Partikel: K<sub>d</sub> = 17 µM; Zählrate: K<sub>d</sub> = 32 µM; D = 1,18 x 10<sup>-10</sup> ± 0,04 x 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>). Die drei Punktmutationen, in denen sich SRB2m2 von SRB2m unterscheidet, scheinen entsprechend dieser Ergebnisse keinen Einfluss auf die Affinität zu PBV auszuüben.





Mittels FCS wurde die Diffusionszeit von PBV nach Zugabe von SRB2m2-RNA (gefüllte Symbole) oder von tRNA (offene Symbole) bis zu einer Konzentration von etwa 60  $\mu$ M gemessen (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. a) Amplitude der nicht normalisierten Autokorrelationsfunktion zum Zeitpunkt 0, G(0). b) Zählrate von PBV (16 nM) nach Zugabe von SRB2m2 oder tRNA. Die Zählrate nach Zugabe von SRB2m2 wurde mit einer hyperbolischen Funktion *gefittet* (Glg. 32; K<sub>d</sub> = 32 ± 3  $\mu$ M, R<sup>2</sup> = 0,99). c) Die molekulare Zählrate von PBV nach Zugabe von SRB2m2. d) Anzahl der Partikel N im Detektionsvolumen, reduziert um den Triplettanteil T<sub>T</sub> und hyperbolisch *gefittet* (Glg. 32; K<sub>d</sub> = 19 ± 2  $\mu$ M, R<sup>2</sup> = 0,98). e) Die Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff}}$  von PBV (3 - 60  $\mu$ M). f) Triplettzeit  $\tau_{T}$ , *gefittet* mit einer hyperbolischen Funktion (Glg. 32; K<sub>d</sub> = 13 ± 7  $\mu$ M, R<sup>2</sup> = 0,91; 1 - 60  $\mu$ M). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden von Daten aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

Die Zugabe von vergleichbaren Mengen von tRNA zu PBV rief keine signifikante Erhöhung der Zählrate hervor (**Abb. 54b**). Dies ist auch in den Autokorrelationsfunktionen sichtbar (**Abb. 53b**). Die Zugabe von 5  $\mu$ M G4-min-RNA (62 nt) bewirkte mit 1,3  $\pm$  0,9 bzw. 0,5  $\pm$  0,3 kHz ebenfalls keine zu SRB2m2 vergleichbare Erhöhung der Zählrate oder der molekularen Zählrate von PBV [105]. Es handelte sich also um eine spezifische Bindung von SRB2m und SRB2m2 an PBV.

Des Weiteren wurde die Singulett-Triplett-Wechselwirkung untersucht (Kap. 2.2.5.1. und 2.2.5.3.). Die Triplettzeit  $\tau_T$  erhöhte sich in Abhängigkeit von der SRB2m2-Konzentration von 1 µs auf 22 µs, während der Triplettanteil T<sub>T</sub> während der Titration relativ konstant 18 ± 2 % aufwies (**Abb. 54f**). Ob es sich tatsächlich um Parameter des Triplettzustandes handelte, wurde experimentell überprüft (siehe Kap. 3.2.4.). Die Abhängigkeit der Triplettzeit von der SRB2m2-Konzentration ergab eine Dissoziationskonstante von 13 ± 7 µM (Glg. 32). Diese befindet sich in der Größenordnung der mittels N und Zählrate bestimmten K<sub>d</sub>-Werte von 32 und 19 µM, weist jedoch eine höhere Standard-abweichung auf.

Sowohl Sulforhodamin B als auch PBV verursachten in Wechselwirkung mit SRB2m eine Erhöhung der Triplettzeit während der Titration (Vergleich **Tab. 20** und **22**). Im Gegensatz zu Sulforhodamin B bewirkte PBV während der Titration keine Erhöhung des Triplettanteils. Der Triplettanteil des SRB2m-Sulforhodamin B- und SRB2m-PBV-Komplexes war mit 17 und 18 % vergleichbar hoch. Die Triplettzeit des SRB2m-PBV-Komplexes wies jedoch mit 22 µs einen erheblich höheren Wert auf als die Triplettzeit des SRB2m-Sulforhodamin B- Komplexes von 10 µs. Sie überschritt damit den Grenzwert von 10 µs für eine korrekte Anwendung des *Fitting*-Modells (Kap. 2.2.5.3.). Es wurde zusätzlich versucht, die Tendenz zum Singulett-Triplett-Übergang und die Triplettzeit zu verringern (siehe Kap. 3.2.4.). Aufgrund des großen Unterschiedes zur Komplexdiffusionszeit von 144 µs wurde eine exakte Unterscheidung beider Fluoreszenzfluktuationsprozesse für möglich gehalten.

Die Genauigkeit der gemessenen PBV-SRB2m-Komplex-Diffusionszeit sollte wie für den Sulforhodamin B-SRB2m-Komplex durch Vergleich des aus dem Diffusionkoeffizienten berechneten hydrodynamischen Radius mit dem Trägheitsradius aus RKWS-Messungen überprüft werden (siehe auch Kap. 3.2.6.). Auch die mittels FCS bestimmten Dissoziationskonstanten sollten im Vergleich mit Literaturwerten zur Überprüfung der Genauigkeit der FCS-Daten herangezogen werden (siehe für Sulforhodamin B Kap. 3.2.1.). Die Bindungskonstante des nicht minimierten SRB-2 an PBV ähnelte mit 23  $\mu$ M den durchschnittlichen K<sub>d</sub>-Werten von SRB2m2 und SRB2m von 26 und 25  $\mu$ M [91]. Dies stellt einen Hinweis auf eine exakte Bestimmung der Parameter des PBV-SRB2m(2)-Komplexes mittels FCS dar.

Die Titrationen ergaben, dass PBV ausschließlich im Komplex mit SRB2m2 bzw. SRB2m für die Einzelmolekülmethode sichtbar ist (**Abb. 54**). Dies ist am deutlichsten in den

Autokorrelationsfunktionen von ungebundenem und vollständig gebundenem PBV zu sehen (Abb. 53a). Die Abweichungen der gefitteten von der experimentell bestimmten Autokorrelationsfunktion sind entsprechend für das ungebundene PBV viel höher als für den PBV-SRB2m2-Komplex. Insgesamt wurden eine 24-fache Erhöhung der Zählrate und eine etwa 36-fache Erhöhung der molekularen Zählrate durch Komplexbildung gemessen. In Übereinstimmung mit dieser starken Signalintensitätserhöhung wurde in einer veröffentlichten Studie eine 107-fache Erhöhung der Quantenausbeute von PBV im Komplex mit SRB-2 gemessen [91]. Ursache für die Erhöhung der molekularen Zählrate könnte eine konformationelle Stabilisierung von PBV durch Bindung an SRB2m bzw. SRB2m2 sein (Abb. 4; siehe Text Kap. 1.4.) [91]. Eine wichtige Schlussfolgerung aus dem durchgeführten Titrationsexperiment ist, dass PBV in Kombination mit SRB2m für Einzelmolekülmessungen mittels FCS trotz einer hohen Triplettzeit geeignet ist (siehe Kap. 2.2.5.1.). Der PBV-SRB2m(2)-Komplex stellt aufgrund der ausgeprägten Erhöhung der Signalintensität im Vergleich zur ungebundenen Form von PBV ein Analogon zur Proteinmarkierung mittels GFP und in noch höherem Maß zu einer Proteinmarkierung mittels eines an eine Tetracystein-Aminosäuresequenz bindenden Fluoreszeinderivates dar [87, 88, 101, 102]. Während jedoch die Proteinmarkierung mittels GFP unabhängig von Dissoziationskonstanten ist, da die fluoreszente Komponente gentechnologisch mit dem zu markierenden Protein fusioniert ist, weisen die Tetracystein-Fluoreszeinderivat-Bindungen in der Regel pico- bis nanomolare Dissoziationskonstanten auf [88]. Die Dissoziationskonstante des PBV-SRB2m(2)-Komplexes erfordert im Gegensatz dazu einen hohen Überschuss an RNA, um relativ geringe Konzentrationen von PBV sichtbar zu machen. Dies verursacht u.U. hohe Kosten. Die Affinität könnte zudem für eine Detektion des Komplexes in vivo nicht ausreichen.

# 3.2.4. Tendenz des PBV-SRB2m-Komplexes zur Spinumkehr

Um zu überprüfen, ob die kurzzeitigen Fluoreszenzintensitätsfluktuationen von bis zu 22 µs tatsächlich von der Singulett-Triplett-Wechselwirkung herrührten (**Abb. 54f**; siehe auch Kap. 2.2.5.1. und 2.2.5.3.), wurde eine Lösung, in der PBV vollständig durch SRB2m2 gebunden war, mit unterschiedlichen Laserintensitäten bestrahlt.

Der Triplettanteil T<sub>T</sub> sollte sich theoretisch proportional abhängig von der Laserintensität erhöhen, um schließlich einen Sättigungsbereich zu erreichen [126, 128]. Dies konnte beobachtet werden. Die Zählrate und die molekulare Zählrate stiegen proportional zur Laserstärke an (**Abb. 55a** und **b**). Der Triplettanteil T<sub>T</sub> stieg zunächst mit der Laserintensität,

um bei hohen Intensitäten etwas abzuflachen (**Abb. 55c**). Beobachtet werden konnte auch, dass die Triplettzeit  $\tau_T$  mit der Laserenergie anstieg, um ab 0,2 mW in einen Sättigungsbereich überzugehen (**Abb. 55d**). Dies steht im Kontrast zu dem beobachteten Absinken der Triplettzeit von R6G mit Zunahme der Laserenergie in Gegenwart von 2 mW dGTP [128]. Die Relaxationszeit des Triplettzustandes von etwa 20 µs ist zudem ungewöhnlich hoch. Ein Wechsel des nichtfluoreszenten Zustandes des ungebundenen Farbstoffes mit dem fluoreszenten Zustand des gebundenen Farbstoffes könnte ebenfalls Ursache für diese Relaxationszeit sein.



Abbildung 55 Abhängigkeit der Triplett-Singulett-Wechselwirkung des PBV-SRB2m-Komplexes von der Laserenergie

Eine etwa 70  $\mu$ M SRB2m2 enthaltende PBV-Lösung (16 nM) wurde mit 1 bis 10 % der maximalen Laserstärke von 1,3 mW eines Helium-Neon Lasers bei 633 nm bestrahlt und mittels FCS gemessen (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.). a) Zählrate. b) Molekulare Zählrate. c) Triplettanteil T<sub>T</sub>. d) Triplettzeit  $\tau_T$ . Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18; b - d) wurden von Daten aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Die in den Titrationexperimenten eingesetzte Laserstärke von 3 % AOTF (0,15 mW des Helium-Neon Lasers bei 633 nm) erwies sich mit einer molekularen Zählrate von 9 kHz als optimal, da der Triplettanteil 20 % nicht signifikant überschritt.

Schweratomsalze, wie Kaliumiodit, aber auch Halogensalze wie Kaliumchlorid- (KCI) fördern eine hohe Besetzung des Triplettzustandes [127, 138, 170]. Da im Puffer der SRB2m2-RNA 100 mM KCI enthalten waren, wurde im Folgenden untersucht, ob sich durch Verringerung der KCI-Konzentration die Zeit des zusätzlichen Relaxationsprozesses verringern lassen würde (Kap. 2.1.4.). Das in **Abbildung 55** dargestellte Experiment wurde deshalb mit einem Puffer wiederholt, der 10 mM oder 100 mM KCI enthielt. Die Zählrate und molekulare Zählrate stiegen proportional zur Laserstärke an (**Abb. 56a** und **b**).

Ein von der KCI-Konzentration abhängiger Effekt konnte nicht beobachtet werden. Der Triplettanteil stieg zwischen 0,15 und 0,50 mW proportional zur Laserstärke an, während die Triplettzeit ab 0,5 mW einen Sättigungswert erreichte (**Abb. 56c** und **d**). Keine Reduktion der Triplett-Singulett-Wechselwirkung durch eine geringere KCI-Konzentration wurde regristriert. Die geringeren Werte der Zählrate, der molekularen Zählrate, des Triplettanteils und der Triplettzeit im Vergleich zum oben beschriebenen Experiment waren durch die geringere RNA-Konzentration bedingt und stimmten mit den in Kapitel 3.2.3. bestimmten Daten überein (**Tab. 22**).

In der 10 mM KCI enthaltenden PBV-RNA-Lösung wurden bei niedrigen Laserstärken von 0,05 und 0,10 mW ein höherer Triplettanteil und eine höhere Triplettzeit bestimmt als in der 100 mM KCI enthaltenden PBV-RNA-Lösung (**Abb. 56c** und **d**). Eine geringere KCI-Konzentration kann zu einer weniger affinen Bindung von SRB2m2 an PBV führen. Dies kann bei niedrigen Laserstärken zu einer geringeren Signalintensität führen, welche sich in einer unzureichenden Genauigkeit der Ergebnisse nach Anwendung des *Fitting*-Modells auswirkt (Glg. 3).

Bei 3 % AOTF (0,15 mW) wurde ein Triplettanteil von 15  $\pm$  2 bzw. 14  $\pm$  1 % und eine Triplettzeit von 10  $\pm$  5 bzw. 11  $\pm$  6 µs für die 100 mM bzw. 10 mM KCI enthaltende RNA-PBV-Lösung bestimmt. Durch die Verringerung der KCI-Konzentration konnte demnach keine signifikante Verringerung der Tendenz zum Singulett-Triplett-Übergang oder Triplettzeit bewirkt werden. Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei diesen kurzzeitigen Fluoreszenzintensitätsfluktuationen nicht ausschließlich um einen Triplettprozess handelt. Mit Hilfe der ConfoCor2-Software konnten jedoch chemische Relaxation und Triplett-Singulett-Wechselwirkung nicht unterschieden werden (siehe Kap. 2.2.5.3. Glg. 3). Die Übereinstimmung der Dissoziations-konstante mit Literaturwerten deutet jedoch auf eine ausreichende Genauigkeit in der Bestimmung der Konzentration und Mobilität hin. Die im Folgenden durchgeführte Analyse des aus der Mobilität der RNA-Fluorophor-

Komplexe mittels der Stokes-Einstein-Gleichung abgeleiteten hydrodynamischen Radien stellte eine weitere Möglichkeit dar, die Genauigkeit der Diffusionszeiten zu überprüfen.



Abbildung 56 Abhängigkeit der Triplett-Singulett-Wechselwirkung von der KCI-Konzentration

Eine etwa 6  $\mu$ M SRB2m2 enthaltende PBV-Lösung (16 nM) wurde mit 1 bis 10 % der maximalen Laserstärke von 1,3 mW eines Helium-Neon Lasers bei 633 nm bestrahlt und mittels FCS gemessen (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.5.). Die PBV-SRB2m-Lösung enthielt 10 mM KCI (offene Symbole) oder 100 mM KCI (gefüllte Symbole). a) Zählrate. b) Molekulare Zählrate. c) Triplettanteil T<sub>T</sub>. d) Triplettzeit  $\tau_T$ . Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden von Daten aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

# 3.2.5. Hydrodynamische Radien von SRB2m und den SRB2m-Fluorophor-Komplexen

Mittels der Stokes-Einstein-Gleichung wurden aus den Diffusionskoeffizienten der Fluorophor-RNA-Komplexe die hydrodynamischen Radien berechnet (Glg. 8). Für den Sulforhodamin B-SRB2m-Komplex ergab sich ein hydrodynamischer Radius von  $2,9 \pm 0,1$  nm (D =  $0,73 \times 10^{-10} \pm 0,02 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ ) und für den PBV-SRB2m(2)-Komplex von  $1,9 \pm 0,1$  nm (D =  $1,18 \times 10^{-10} \pm 0,04 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) (**Tab. 23**). Konformationelle Änderungen konnten durch hydrodynamische Daten in früheren Studien identifiziert werden [189, 190].



### Abbildung 57 Dynamische Lichtstreuung durch SRB2m-RNA

Zwei unabhängige DLS-Messungen (10 x 40 s) von 100 bis 200 µM SRB2m RNA wurden durchgeführt (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.7.). Die Dichte-Verteilungen der hydrodynamischen Radien von 10 Einzelmessungen zweier unabhängiger Experimente sind abgebildet. Aggregate wurden nicht detektiert. Ein hydrodynamischer Radius von 3,1 nm wurde bestimmt.

Die strukturelle Flexibilität von RNA-Aptameren ist ein bekanntes Phänomen [191]. Um festzustellen, ob die unterschiedlichen hydrodynamischen Radien der SRB2m-Fluorophor-Komplexe von einem Artefakt oder von tatsächlichen Größenunterschieden der Komplexe verursacht wurden, wurden weitere Experimente durchgeführt. Zunächst wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) der hydrodynamische Radius von ungebundener RNA auf  $3,1 \pm 0,4$  nm bestimmt (**Abb. 57**; Kap. 2.2.7.). Er wies große Übereinstimmung mit dem Wert des Sulforhodamin B-Komplexes auf, was auf eine geringe Änderung der RNA-Konformation nach Bindung an Sulforhodamin B schließen lässt. Die Literaturrecherche ergab, dass für

eine RNA von 54 Nukleotiden ein hydrodynamischer Radius im Bereich von 2 bis 2,5 nm zu erwarten wäre [189, 192].



## Abbildung 58 Sekundärstrukturvorhersage des SRB2m-Aptamers

a) Ein  $\Delta$ G von –23 kkal/mol wurde mit *Mfold*3.2. berechnet (Kap. 2.1.10.). b) Eine Vorhersage einer Dimerisierung wurde mittels der *Software RNAcofold* getroffen (Kap. 2.1.10.). Ein  $\Delta$ G von –59 kkal/mol wurde berechnet.

Aufgrund der Diskrepanz von experimentellen Werten und Literaturwerten wurde mittels der *Software RNAcofold* eine Dimerisierung unter thermodynamischen Aspekten untersucht [107, 109]. Der ΔG-Wert für ein Dimer war mit -60 kHz etwa dreifach so hoch wie der ΔG-Wert des monomeren SRB2m, der mit *Mfold3.2* bestimmt wurde (**Abb. 58**) [106, 110]. Eine Dimerisierung wäre demnach energetisch begünstigt. Sie sollte mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrrelations-Spektroskopie (FCCS) überprüft werden (Kap. 2.2.5.3. und 2.2.5.4.). SRB2m wurde am 5'-Ende chemisch mit Atto647N oder Atto488 markiert. Gleiche Mengen beider Fluoreszenzspezies wurden de- und renaturiert. Für ein Dimer wäre theoretisch eine 50 %ige Kreuzkorrelation zu erwarten. Mittels FCCS konnte mit einer Kreuzkorrelation von unter 1 % kein gleichzeitiges Diffundieren von doppelt markierten Molekülen und damit keine

Dimerisierung detektiert werden (**Abb. 59a**; Glg. 12 - 14). Die Positivkontrolle ergab eine 70 %ige Kreuzkorrelation (**Abb. 59b**;  $68 \pm 6$  %). Der hydrodynamische Radius des Atto647Nmarkierten Monomers betrug 2,0 ± 0,1 nm und der des Atto488-markierten Monomers 2,2 ± 0,2 nm (Glg. 3 - 5 und 8; **Tab. 23**). Die Ähnlichkeit der in unterschiedlichen Detektionskanälen bestimmten Werte widerspricht einem durch Artefakte bedingten Unterschied der molekularen Größen beider Komplexe. Im Vergleich zu den etwa 1,4-fach größeren hydrodynamischen Radien der ungebundenen RNA, bestimmt mittels DLS, und der Sulforhodamin B-gebundenen RNA, bestimmt mittels FCS, erscheint es möglich, dass das chemische Modifizieren der 5' Termini eine Dimerisierung der Partikel verhindert hat (**Tab. 23**). Die Termini von SRB2m sind an der Dimerisierung beteiligt (**Abb. 58b**).



Abbildung 59 Analyse der Dimerisierung von SRB2m mittels FCCS

Nicht normalisierte Autokorrelationsfunktionen der verschiedenen markierten Spezies und Kreuzkorrelationsfunktionen sind abgebildet (Kap. 2.2.5.). (a) Gleiche Mengen von Atto488- (Dreiecke) und Atto647N- (Quadrate) markierter SRB2m-RNA wurden de- und renaturiert (Kap. 2.2.2.9.). Die Kreuzkorrelation wurde bestimmt (schwarze Rhomben, weniger als 1 % Kreuzkorrelation) (Kap. 2.2.5.). (b) Gleiche Mengen von komplementärer Alexa488- (Dreiecke) und Cy5- (Quadrate) markierter 70 nt-ssDNA (von der Firma Zeiss zur Verfügung gestellt) wurden hybridisiert und die Kreuzkorrelation bestimmt (Rhomben, 68  $\pm$  6 % Kreuzkorrelation). Arithmetische Mittelwerte aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Messungen wurden mit Gleichung 17 berechnet.

Der hydrodynamische Radius der monomeren RNA war nahezu identisch mit dem hydrodynamischen Radius des RNA-PBV-Komplexes (**Tab. 23**). Entsprechend könnte es sich bei dem ungebundenen Aptamer um ein Dimer, Trimer oder Tetramer handeln, das durch das Binden an PBV in Monomere zerteilt wird, jedoch durch Sulforhodamin B in der molekularen Größe bzw. im Oligomerisierungsgrad nicht signifikant verändert wird. Diese Theorie konnte in Roentgenkleinwinkelstreuungsexperimenten geprüft werden (Kap. 2.2.8.).

# 3.2.6. Trägheitsradien, Oligomerisierungsgrad und Konformation von SRB2m und der SRB2m-Fluorophor-Komplexe

Roentgenkleinwinkelstreuungsexperimente (RKWS) wurden in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. Dmitri Svergun und Dr. Petr Konarev vom EMBL Outstation am Desy in Hamburg durchgeführt und ausgewertet. Sie ergaben von ungebundener RNA einen Trägheitsradius der ungebundenen RNA von 2,8 nm, der dem durch DLS bestimmten hydrodynamischen Radius von 3,1 nm ähnelte und sich erheblich von den durch FCCS bestimmten hydrodynamischen Radien der Monomere unterschied. Es wurde eine Mischung von monomeren und dimeren SRB2m-Molekülen identifiziert. Hierbei wurde in Betracht gezogen, dass das ausgeschlossene Volumen von Nukleinsäuren in nm<sup>3</sup> etwa dem Molekulargewicht in kDa entspricht (**Tab. 23**) [100].

Probe	Oligomerisierungsstatus	Methode	r <sub>H</sub> oder r <sub>G</sub> (nm)	D <sub>max</sub> (nm)	V <sub>p</sub> (nm <sup>3</sup> )
SPB2m		DLS	$3,1\pm0,4$		
UKDZIII	monomer: 27 % dimer: 73 %	RKWS	$2,8\pm0,1$	10,0 ± 1,0	38,0 ± 4,0
SRB2m Atto488	monomer: 100 %	FCS/FCCS	$2,2\pm0,2$		
SRB2m Atto647N	monomer: 100 %	FCS/FCCS	$2,0\pm0,1$		
SRB2m +		FCS	$\textbf{2,9}\pm\textbf{0,1}$		
Sulforhodamin B	monomer: 58 % dimer: 42 %	RKWS	$2,5\pm0,1$	8,5 ± 1,0	30,5 ± 3,0
SRB2m +		FCS	1,9±0,1		
PBV	monomer: 100 %	RKWS	$\textbf{2,3}\pm\textbf{0,1}$	8,0 ± 1,0	$23,5\pm3,0$

## Tabelle 23 Die molekulare Größe der SRB2m-RNA

Hydrodynamische Radien  $r_{H_{r}}$  wurden mittels FCS, FCCS (Kap. 2.2.5) oder DLS (Kap. 2.2.7) bestimmt. Trägheitsradien  $r_{G}$ , Maximalgrößen  $D_{max}$  und Ausschlußvolumen  $V_{p}$  wurden mittels RKWS bestimmt (Kap. 2.2.8). SRB2m wurde ohne oder nach Zugabe der Fluorophore Sulforhodamin B und PBV vermessen. Atto488- oder Atto647N-markiertes SRB2m wurde mittels FCS vermessen. Es wurde zudem der Oligomerisierungsstatus von SRB2m, der sich aus FCCS- und RKWS-Messungen ergab, dargestellt. Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden von Daten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Aufgrund des Molekulargewichtes von SRB2m von etwa 18 kDa und des ausgeschlossenen Volumens von 38 nm<sup>3</sup> wurde auf einen hohen Dimer-Anteil geschlossen. Ein *Fitten* der Daten durch das Programm OLGOMER ergab exaktere Aussagen über das Verhältnis von Monomer und Dimer in der Lösung. Ungebundene RNA lag zu 73 % als Dimer vor und zu 27 % als Monomer.

Nach Zugabe von Sulforhodamin B verringerte sich der Trägheitsradius um 0,3 nm auf 2,5 nm. Dieser Wert lag etwas unterhalb des mittels FCS bestimmten hydrodynamischen Radius von 2,9 nm. Sulforhodamin B-Bindung führte zu einem geringen Verschieben des chemischen Gleichgewichtes zwischen Monomer und Dimer hin zum Monomer mit 58 % (**Tab. 23**). Nach Zugabe von PBV zu ungebundenem SRB2m erfolgte eine ausgeprägte Reduktion des Trägheitsradius von 2,8 auf 2,3 nm. Der Trägheitsradius des PBV-SRB2m-Komplexes war damit etwa 1,4-fach größer als der durch FCS bestimmte hydrodynamische Radius. Das ausgeschlossene Volumen des SRB2m-PBV-Komplexes von 23,5 nm<sup>3</sup> ähnelte dem Wert des Molekulargewichtes von SRB2m. Die Analyse der RKWS-Daten ergab, dass PBV ein nahezu vollständiges Verschieben des chemischen Gleichgewichtes hin zum Monomer bewirkte. RKWS-Experimente bestätigten die auf der Grundlage von FCCS- und FCS-Messungen aufgestellte Hypothese, dass nach Bindung an PBV eine Trennung von niedermolekular aggregierten SRB2m-Molekülen in Monomer erfolgen könnte.

Mittels RKWS konnte zusätzlich ab initio die RNA-Konformation bestimmt werden. In Abbildung 60a ist die logarithmisierte Signalintensität der gestreuten Strahlung in Abhängigkeit vom Momenttransfer s wiedergegeben. In Abbildung 60b ist die ab initio-Struktur der ungebundenen RNA und des monomeren SRB2m-PBV-Komplexes dargestellt. Die errechneten Streumuster dieser Modelle sind in Abbildung 60a zu sehen. Sie stimmen mit den experimentellen Daten sehr gut überein. Es wurde eine globuläre und eine helikale Domäne der RNA identifiziert, wobei ausgeprägte konformationelle Änderungen nach Fluorophor-Bindung nicht detektiert wurden. Für helikale Moleküle können sich Trägheitsradius und hydrodynamischer Radius um den Faktor 1,5 unterscheiden, wobei der Trägheitsradius den höheren Wert aufweist [157, 158]. Der 1,4-fache Unterschied zwischen den molekularen Größen des PBV-SRB2m-Komplexes in RKWS- und FCS-Messungen stimmt mit dieser Theorie überein. Die helikale Konformation ist jedoch nicht sehr ausgeprägt. Unter Umständen verursacht die heterogene Konformation mit überwiegendem Dimer-Anteil ein anderes Verhältnis von Trägheitsradius und hydrodynamischem Radius. Die hydrodynamischen Radien der ungebundenen RNA und des RNA-Sulforhodamin B-Komplexes sind etwas größer als die entsprechenden Trägheitsradien. Zudem ist der Unterschied zwischen der molekularen Größe von Monomer und Dimer in RKWS-Messungen im Vergleich zu hydrodynamischen Messungen etwa 0,5 nm geringer.



Abbildung 60 Strukturelle Charakterisierung von SRB2m mittels RKWS

a) Experimentelle Streumuster (Punkte mit experimentellen Fehlern) von SRB2m (Kurve 1), von SRB2m und Sulforhodamin B (Kurve 2) sowie von SRB2m und PBV (Kurve 3) (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.8.). Streumuster eines typischen *ab initio* Modells berechnet mittels DAMMIN für SRB2m nach PBV-Zugabe und berechnet mittels SASREF für SRB2m sind abgebildet als durchgezogene Linie. *Fits* für SRB2m bzw. SRB2m und Sulforhodamin B mit Hilfe des Programms OLIGOMER sind als gestrichelte Linien gezeigt. Das Diagramm zeigt die logarithmisierte Streuintensität als eine Funktion des Momenttransfers s (Glg. 33). Die Kurven sind aus Übersichtsgründen um eine Einheit versetzt dargestellt. b) Typische *ab initio* Modelle der ungebundenen SRB2m RNA (Modell 1), erstellt mittels SASREF, und der SRB2m-RNA nach Zugabe von PBV (Modell 2), erstellt mittels DAMMIN (Kap. 2.2.8; Auflösung 10 - 15 Å). Das ungebundene SRB2m besteht aus zwei Monomeren (rot und grün). Die rechte und untere Abbildung zeigen die Modelle um 90° um y- oder x-Achsen gedreht. Der Größenstandard ist 2 nm.

Die Wirkung der Fluorophore auf den Oligomerisierungszustand der ungebundenen SRB2m-RNA ist vereinfacht in **Abbildung 61** schematisch dargestellt.



Abbildung 61 Oligomerisierungszustand von SRB2m

Schematische Darstellung zum Oligomerisierungszustand der SRB2m-RNA (Dreiecke) und der RNA-Fluorophor-Komplexe sowie zur Detektierbarkeit der RNA-Fluorophor-Komplexe mittels FCS. Zu dimerem SRB2m (Mitte) wurde PBV (schwarz umrandeter Stern) oder Sulforhodamin B (roter Stern) gegeben. Die Bindung an PBV verursachte eine Separierung des Dimers in Monomere und eine Erhöhung der Quantenausbeute von PBV (blauer Stern), die den PBV-RNA-Komplex mittels FCS sichtbar werden ließ (rechts). Sulforhodamin B verursacht eine geringfügige Separierung in Monomere und veränderte seine Quantenausbeute nicht signifikant (links). Das Ausmaß der strukturellen Veränderung der Aptamer-RNA und der Veränderung der Quantenausbeute bzw. Fluoreszenzemission der Fluorophore im Komplex entsprechen einander. Mittels NMR wurde die Wechselseitigkeit von konformationellen Änderungen eines RNA-Aptamers und Veränderungen der Elektronenstruktur des daran bindenden Fluorophors Malachitgrün bereits nachgewiesen [193].

Es konnten mittels FCS im Rahmen dieser Arbeit simultan eine strukturbiochemische Fragestellung untersucht und photophysikalische Phänomene dokumentiert werden. Konformationelle Änderungen eines fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotides wurden bereits in einer früheren Studie mittels FCS charakterisiert und mit Veränderungen der photophysikalischen Eigenschaften des an die DNA bindenden Tetramethylrodamins in Verbindung gebracht [194]. Zu RNA-Fluorophor-Wechselwirkungen konnten auf der Basis von freier dreidimensionaler Diffusion keine vergleichbar komplexen Studien in der Literatur gefunden werden.

# 3.2.7. Kristallisation des Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers

Um eine genauere Strukturanalyse des RNA-Fluorophor-Komplexes mittels Roentgenstrukturanalyse durchzuführen, wurden Kristallisationsexperimente mit Sulforhodamin B und SRB2m durchgeführt (Kap. 2.2.9.). In den DLS-Messungen, die unmittelbar vor dem Ansetzen des Kristallisationsansatzes durchgeführt wurden, waren keine Aggregate vorhanden. RNA wurde mit der 50-fachen Menge von Sulforhodamin B in einem screening des Nucleic Acid Miniscreen angesetzt. Ein Mikroliter 90 µM RNA wurde mit 2 µL der jeweiligen Kristallisationsbedingung des Nucleic Acids Miniscreens gemischt und im Verfahren des "hangig drop" bei 4°C über einem Reservoir mit 35 % MPD inkubiert (siehe Abb. 7 in Kap. 2.2.9.). Nach 6 bis 20 Tagen wurden stabförmige Kristalle beobachtet mit einer Größe von etwa 250 µm x 10 µm (Abb. 62a oberes Bild; Kristallisationsbedingung: 10 % MPD, 40 mM Natrium-Cacodylat pH 6,0 und 12 mM Spermine sowie 80 mM Strontiumchlorid). Bei 4°C, aber auch bei 19 °C kon nten diese Ergebnisse mit selbst angesetztem Puffer bei 5-fachem Überschuss von Sulforhodamin B reproduziert werden (Abb. 62a unteres Bild). Es konnte in einer denaturierenden Gelelektrophorese festgestellt werden, dass die Kristalle RNA enthielten (Abb. 62b). Die Kristalle waren jedoch nicht roentgentauglich, vermutlich aufgrund der Heterogenität der Kristalle.





#### Abbildung 62 SRB2m-Kristalle

a) 90 µM SRB2m-RNA wurde mit der 5 - bzw. 50 fachen Menge von Sulforhodamin B inkubiert und im Verfahren des *,hangig drop'* kristallisier (Kap. 2.2.2.9. und 2.2.9.). Bei 4° C erschienen nach 6 bzw. 10 - 20 Tagen nadelförmige Kristalle, die im Lichtmikroskop polarisierten. Der Maßstab beträgt 0,2 mm b) Kristallanalyse mit einer 10 %igen denaturierenden PAGE (Kap. 2.2.2.7. und 2.2.2.4.). Auf Bahn 1 wurde der RNA–Größenstandard (RNA low range ladder), dessen unterste Bande 100 Nukleotiden entspricht, aufgetragen. Auf Bahn 2 wurde ein gewaschener Kristall aufgetragen. Die 54 Nukleotide enthaltende SRB2m RNA konnte detektiert werden. Sie war nicht degradiert.

Eine Variation der Strontiumchloridkonzentration zwischen 10 und 100 mM und des MPD-Gehaltes zwischen 5 und 20 % im Verfahren des *sitting drop*' mittels eines Kristallisationsroboters erbrachte keine Kristalle. Der Ersatz von Strontiumchlorid durch Bariumchlorid zwischen 10 und 100 mM erbrachte ebenfalls keine Kristalle.

## 3.2.8. Affinität von Fusionskonstrukten zu Sulforhodamin B

Die Tendenz des Aptamers, Dimere zu bilden, könnte sich negativ auf die Affinität von Fusionskonstrukten zu den Fluorophoren auswirken. In einer Zusammenarbeit im Rahmen einer Diplomarbeit (Katja Eydeler) wurden am 3'- und 5'-Terminus 150 bzw. 80 Nukleotide enthaltende Fusionskonstrukte generiert [195]. Die Dissoziationskonstante des Sulforhodamin B-Fusionskonstrukt-Komplexes stimmte mit der des RNA-Aptamers überein. Dies traf auch auf Triplettzeit und -anteil zu. Im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit (Eileen Magbanua) wurde ein am 5'-Terminus 800 Nukleotide und am 3'-Terminus 1.200 Nukleotide enthaltendes RNA-Aptamer-Fusionskonstrukt generiert [196]. Dieses wies in FCS-Titrationsexperimenten mit Sulforhodamin B eine etwa 5-fach verringerte Dissoziationskonstante im Vergleich zu SRB2m auf. Eine heterogene RNA-Konformation könnte dazu beigetragen haben, dass nur ein Bruchteil der RNA-Moleküle Sulforhodamin B binden konnte. Es wurden etwa 50 % Triplettanteil und 80 µs Triplettzeit im Komplex bestimmt. Die Triplettzeit lag demzufolge zwischen der Diffusionszeit des freien Fluorophors und des Komplexes. Eine Anwendung des Fitting-Modells für zwei Diffusionsspezies erscheint in diesem Fall als problematisch. Auch dies könnte die höhere Dissoziationskonstante erklären.

# 3.2.9. Spezifität der Fluorophor-SRB2m-Bindung in Zellextrakten

Für eine Anwendung von SRB2m und Sulforhodamin B bzw. PBV *in vivo* ist ein geringes Ausmaß an unspezifischer Wechselwirkung mit zellulären Komponenten unerlässlich. Dies sollte zunächst getestet werden, indem HEK293-Zellextrakte (Kap. 2.2.4.3.; 3,5 und 7 mg/mL Gesamtproteingehalt) zu einer 10 nanomolaren Fluorophor-Lösung gegeben wurden und die Diffusionszeit gemessen wurde (**Abb. 63a**). Die Spezifität der Bindung von SRB2m an Sulforhodamin B bzw. PBV wurde des Weiteren überprüft, indem 4 μM RNA zu der Fluorophor-Zellextrakt-Lösung gegeben wurde, um eine vollständige Bindung des Fluorophors zu erreichen. Eine Erhöhung der Diffusionszeit in Zellextrakt-Messungen im Vergleich zu *in vitro*-Messungen würde auf eine unspezifische Bindung an zelluläre Komponenten hinweisen.

Die Diffusionszeit von Sulforhodamin B betrug *in vitro* 31  $\mu$ s und im Zellextrakt 44 ± 3  $\mu$ s. Nach Zugabe von SRB2m RNA wurde *in vitro* eine Diffusionszeit von 122  $\mu$ s und im Zellextrakt von 141 ± 3  $\mu$ s gemessen (**Abb. 63a**).



Abbildung 63 Sulforhodamin B und PBV in Zellextrakten

FCS-Messung (Kap. 2.2.5.) von Sulforhodamin B (F, 13 nM) oder PBV (F2, 16 nM) bzw. des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes (K) oder des PBV-SRB2m-Komplexes (K2) ohne oder nach Zugabe von zytosolischen HEK293-Zellextrakten (+ ZE) (Kap. 2.2.4.3.). a) Diffusionszeiten. b) und c) Molekulare Zählraten (b) und Zählraten (c) von PBV (F2) und des PBV-SRB2m-Komplexes (K2). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) wurden aus den Ergebnissen zweier unabhängiger Experimente bestimmt.

Mittels des *Fitting*-Modells für zwei Diffusionskomponenten bei fixierter Fluorophor-Diffusionszeit ergab sich ein Komplexanteil von 98 % bzw. 97 %. Es konnte demzufolge eine geringe Bindung von Sulforhodamin B an zelluläre Komponenten im Zellextrakt festgestellt werden, die die auf Diffusion basierte Detektion des Komplexes jedoch nicht maßgeblich beeinflusste. Die FCS-Parameter sind in **Tabelle 24** aufgeführt.

SRB2m	Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> * (%)	τ <sub>τ</sub> * (µs)	$\chi^2$ –Test
-	16 ± 4	72±3	17 ± 1	13 ± 2	9,4 x 10 <sup>-6</sup> ± 1,2 x 10 <sup>-5</sup>
+	$24\pm 6$	$71\pm4$	$22\pm1$	14 ± 1	8,2 x 10 <sup>-6</sup> ± 8,9 x 10 <sup>-6</sup>

## Tabelle 24 FCS-Parameter von Sulforhodamin B in Zellextrakten

 $^{\ast}$  Relaxationsprozesse im Bereich von bis zu 20  $\mu s$ 

Zytosolische Zellextrakte wurden aus HEK293-Zellen präpariert (Kap. 2.2.4.3.; 7 mg/mL). Mittels FCS wurde die Diffusionszeit von Sulforhodamin B in zytosolischen Zellextrakten vor und nach Zugabe von 4  $\mu$ M SRB2m-RNA gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.5.5. beschrieben, ausgewertet. Die Parameter der FCS-Messungen von Sulforhodamin B vor (-) und nach Zugabe (+) von 4  $\mu$ M SRB2m-RNA wurden durch *fitten* an ein Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 1; Versuche aus **Abb. 63**). Arithmetische Mittelwerte (Glg. 17) und Standardabweichungen (Glg. 18) aus den Messungen zweier unabhängiger Experimente wurden berechnet.

Zählrate und molekulare Zählrate waren in Zellextrakten mit 24 und 16 kHz ausreichend hoch. Der Triplettanteil von 17 und 22 % befand sich unterhalb des Grenzbereiches von 20 -30 %, die Triplettzeit befand sich mit 13 und 14 µs etwas oberhalb des Grenzbereiches von 5 -10 µs (Kap. 2.2.5.3.). Der Triplettanteil von Sulforhodamin B war in Zellextrakten um 11 % und die Triplettzeit war um 11 µs höher als *in vitro* (siehe auch **Tab. 20**). Der Triplettanteil des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes war in Zellextrakten um 5 % und die Triplettzeit war um 4 µs höher als *in vitro*. Trotz der ausgeprägteren Tendenz zum Singulett-Triplett-Übergang und der längeren Triplettzeit weisen die Werte des  $\chi^2$ -Tests mit 9,4 x 10<sup>-6</sup> und 8,2 x 10<sup>-6</sup> auf eine ausreichende Qualität des *fits* hin und befinden sich im Bereich der Werte der *in vitro*-Messungen (siehe auch **Tab. 20**).

Zählrate, molekulare Zählrate und Diffusionszeiten von PBV wurden im Folgenden analysiert, um das Ausmaß unspezifischer Bindung an zelluläre Komponenten festzustellen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 25** wiedergegeben. PBV wies *in vitro* eine molekulare Zählrate von 0,2 kHz und im Zellextrakt von 4 kHz auf (**Abb. 63b**; siehe auch in **Tab. 22**: 4  $\mu$ M SRB2m2). Nach RNA-Zugabe wurden *in vitro* 6 kHz gemessen, im Zellextrakt 10 kHz (**Abb. 63b**). PBV wies *in vitro* eine Zählrate von 2 kHz, im Zellextrakt von 5 kHz auf (**Abb. 63c**). Nach Zugabe von RNA wurden *in vitro* 9 kHz gemessen, im Zellextrakt 32 kHz. Die Werte des  $\chi^2$  –Tests wiesen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen *in vitro* auf eine unzureichende Qualität des *fits* der Messung von PBV mit 7,5 x 10<sup>-4</sup> in Zellextrakten hin (siehe auch **Tab. 22**). Das Ergebnis des  $\chi^2$  –Tests zum *Fit* der Messung des PBV-SRB2m2-Komplexes war mit 8,2 x 10<sup>-5</sup> ausreichend und in derselben Größenordnung wie in den *in vitro*-Messungen.

SRB2m2	Molekulare Zählrate (kHz)	Zählrate (kHz)	T <sub>T</sub> * (%)	τ <sub>T</sub> * (µs)	$\chi^2$ –Test
-	4 ± 2	$5,3\pm0,2$	$48\pm4$	19 ± 4	$7,5 \times 10^{-4} \pm 9,4 \times 10^{-4}$
+	$10\pm2$	32 ± 2	21 ± 4	21 ± 1	8,2 x 10 <sup>-5</sup> ± 1,1 x 10 <sup>-4</sup>

## Tabelle 25 FCS-Parameter von PBV in Zellextrakten

 $^{\ast}$  Relaxationsprozesse im Bereich von bis zu 20  $\mu s$ 

Zytosolische Zellextrakte wurden aus HEK293-Zellen präpariert (Kap. 2.2.4.3.; 7 mg/mL). Mittels FCS wurde die Diffusionszeit von PBV in zytosolischen Zellextrakten vor und nach Zugabe von 4  $\mu$ M SRB2m2-RNA gemessen (Kap. 2.2.5.) und, wie in Kapitel 2.2.5.3. und 2.2.3.5. beschrieben, ausgewertet. Die Parameter der FCS-Messungen von PBV vor (-) und nach Zugabe (+) von 4  $\mu$ M SRB2m2-RNA wurden durch *Fitten* an ein Modell für eine Diffusionsspezies bestimmt (Glg. 3 mit n = 1; Versuche aus **Abb. 63**).

Der Triplettanteil des PBV-SRB2m2-Komplexes war in Zellextrakten um 4 %, die Triplettzeit war um 13 µs höher als im Vergleich zu den *in vitro*-Messungen. Wie bei der Messung des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes zeigte sich in Gegenwart des Zellextraktes eine längere Triplettzeit und eine geringfügig ausgeprägtere Tendenz zum Singulett-Triplett-Übergang. Vor allem die Triplettzeit ist als sensitiver Parameter für Veränderungen der Mikroumgebung bekannt [126, 128, 138]. Die Diffusionszeit des Komplexes *in vitro* wies 166 µs und im Zellextrakt 200 ± 55 µs auf (**Abb. 63a**). PBV zeigte aufgrund der erheblich erhöhten Zählrate und der molekularen Zählrate in Zellextrakten demzufolge eine ausgeprägtere Tendenz als Sulforhodamin B, unspezifisch an zelluläre Komponenten zu binden. Der SRB2m-PBV-Komplex wies eine ebenfalls erheblich erhöhte Zählrate und molekulare Zählrate sowie Diffusionszeit in Zellextrakten auf. Diese Beobachtung kann mit der im Vergleich zu Sulforhodamin B 100-fach geringeren Affinität von PBV zu SRB2m erklärt werden (Kap. 3.2.1. und 3.2.3.).

## 3.2.10. *In vivo*-Anwendung von Sulforhodamin B und PBV

Die Anwendung von Sulforhodamin B in lebenden Zellen sollte nun getestet werden. Sulforhodamin B wurde mit einer Konzentration von 100 nM bis 50 µM in HeLa-Zellen mikroinjiziert (**Abb. 64**; Kap. 2.2.4.1. und 2.2.6.). Die Messungen wurden 2- bis 6-mal in unterschiedlichen Zellen wiederholt. Die mittels FCS bestimmte molekulare Zählrate betrug zwischen 0,5 und 12 kHz, die Zählrate zwischen 4 und 240 kHz (Kap. 2.2.5.). Eine Konzentration von 0,1 µM erwies sich für die Signalintensität als optimal. Die Diffusionszeiten nach dem *fitten* der Daten an ein Modell für eine Diffusionsspezies schwankten zwischen 1 µs und 100 ms. Nach dem *fitten* der Daten an Modelle für zwei oder drei Diffusionszeiten im Bereich des freien Fluorophors nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der geringen unspezifischen Wechselwirkung von Sulforhodamin B mit zellulären Bestandteilen in Zellextrakten, ergaben die FCS-Messungen nach Mikroinjektion von Sulforhodamin B in HeLa-Zellen einen relativ hohen Anteil an unspezifischer Bindung



## Abbildung 64 kLRM-Aufnahmen und FCS-Messungen von Sulforhodamin B in vivo

Mikroinjektion von 0,1 µM Sulforhodamin B in HeLa-Zellen (Kap. 2.2.6. und 2.2.4.). Mikroskopische Aufnahme nach Anregung bei 543 nm im kLRM. Die Positionen der FCS-Messungen wurden durch Kreuze markiert. Für FCS-Messungen wurden 5 % AOTF des 543 nm HeNe-Lasers für 10 x 10 s verwendet. Eine Veränderung der Morphologie der Zellen nach Bestrahlung bei 0,1 bis 7 % AOTF konnte innerhalb der folgenden 4 Stunden nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde eine Aufnahme von Sulforhodamin B in lebende HeLa-Zellen durch Diffusion beobachtet. In einer Zusammenarbeit im Rahmen von zwei Diplomarbeiten (Kap. 3.2.7.) wurde die Aufnahme von Sulforhodamin B in lebenden COS-7-, HeLa- und HEK293-Zellen durch Diffusion systematisch untersucht. Eine gleichmäßige Verteilung des durch Diffusion aufgenommenen Farbstoffes konnte im Zytosol nicht detektiert werden. Im Bereich des endoplasmatischen Retikulums konzentrierte sich der Farbstoff in Granula, was übereinstimmte mit einer in früheren Studien beobachteten unspezifischen Bindung von Sulforhodamin B an Proteine [197].



#### Abbildung 65 kLRM-Aufnahmen von PBV in vivo

Aufnahme von PBV durch HeLa-Zellen durch Diffusion (Kap. 2.2.6. und 2.2.4.). Es wurden HeLa-Zellen mit 2,5 μM PBV über 24 Stunden inkubiert. Aufnahme nach Laser-Anregung bei 633 nm lichtmikroskopisch überlagert im kLRM. a) Fluoreszenzintensitätsprofil einer Zelle. b) Dreidimensionale Darstellung einer Zelle. An zwei Schnittebenen ist der in x- und y-Richtung aufgenommene `Stapel` in z-Richtung (vertikal) einsehbar (siehe **Abb. 7a** in Kap. 2.2.5.2.). PBV verteilte sich im gesamten Zellkörper.

155

Eine Verdrängung dieser unspezifischen Bindung durch Transkription des Aptamers *in vivo* nach Transfektion eines Aptamer-kodierenden Plasmids konnte in HeLa- oder COS-7-Zellen nicht festgestellt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine auf Diffusion basierte Aufnahme von PBV durch HeLa-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 65**). Das Fluoreszenzsignal von PBV reichte zur intrazellulären Detektion mittels des kLRM aus. Eine Inkubation von 24 bis 48 Stunden resultierte in einer zu Sulforhodamin B vergleichbaren unspezifischen Bindung an zelluläre Komponenten (**Abb. 66**). Abgestorbene Zellen, die apoptotische Körperchen bildeten, wurden besonders stark angefärbt.



Abbildung 66 kLRM-Aufnahmen von PBV in vivo-unspezifische Bindung

Aufnahme von PBV durch HeLa-Zellen mittels Diffusion (Kap. 2.2.4. und 2.2.6.). Es wurden HeLa-Zellen mit 2,5 μM PBV über 48 Stunden inkubiert. Aufnahme nach Laser-Anregung bei 633 nm (linke Seite) oder lichtmikroskopisch (rechte Seite) durch das kLRM. Eine gesunde Zellpopulation ist rechts zu sehen. PBV ist im Zytosol ungleichmäßig verteilt. Es sammelte sich im Bereich des endoplasmartischen Retikulums an.

Die Mikroinjektion von 80 µM SRB2m RNA konnte die Signalintensität von PBV nicht signifikant erhöhen (Daten nicht gezeigt). Sulforhodamin B und PBV scheinen für intrazelluläre Messungen aufgrund unspezifischer Bindung an zelluläre Komponenten nicht geeignet zu sein. Zusätzlich reicht die Affinität zu SRB2m nicht aus, um die unspezifischen Wechselwirkungen zu verdrängen.

# 3.2.11. Vergleich des Sulforhodamin B-SRB2m und PBV-SRB2m-Komplexes

Die chemischen Strukturen von Sulforhodamin B und PBV ähneln sich in hohem Maß. Im Komplex mit SRB2m ergeben sich jedoch unterschiedliche photophysikalische Eigenschaften der Fluorophore und strukturbiochemische Eigenschaften der RNA.

Sulforhodamin B verändert seine Fluoreszenzemissionseigenschaften nur geringfügig nach Bindung an das Aptamer. Die Detektion des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes basiert deshalb auf dessen Mobilität, die sich von der Mobilität von ungebundenem Sulforhodamin B unterscheidet. Die Detektion des PBV-SRB2m-Komplexes basiert hingegen auf der erhöhten molekularen Zählrate und Zählrate von PBV im Komplex. Ungebundenes PBV weist ein zu geringes Signal für eine Autokorrelationsanalyse auf. Die gemessene Diffusionszeit entspricht damit der Komplexdiffusionszeit. Der SRB2m-PBV-Komplex weist dementsprechend im Gegensatz zu Sulforhodamin B ein zu vernachlässigendes Hintergrund-Signal auf. Weil SRB2m zu PBV jedoch eine etwa 100-fach geringere Affinität als zu Sulforhodamin B aufweist, benötigen beide Systeme einen vergleichbar hohen RNA-Überschuss für die Charakterisierung des Komplexes. Aus der relativ hohen Affinität von Sulforhodamin B zu SRB2m ergibt sich außerdem, dass der Komplex in Zellextrakten detektierbar ist. Beide Fluorophore können durch Diffusion durch die Zellmembran gelangen. Eine Anwendung *in vivo* ist aufgrund der unspezifischen Wechselwirkung mit der zellulären Umgebung jedoch nicht möglich.

Die *in vitro* unter optimalen Bedingungen gemessene molekulare Zählrate des PBV-RNA-Komplexes war mit 8 kHz erheblich geringer als die molekulare Zählrate des etwa gleich konzentrierten Sulforhodamin B-RNA-Komplexes mit 36 kHz. Dies stimmt mit den veröffentlichten Werten der Quantenausbeuten von 0,7 für Sulforhodamin B und von 0,04 für den PBV-SRB-2-Komplex überein. Die molekulare Zählrate deutet auf eine geringere Eignung des PBV-RNA-Komplexes als des Sulforhodamin B-RNA-Komplexes für FCS-Messungen hin.

Sulforhodamin B und PBV weisen unterschiedliche Absorptions- bzw. Emissionsspektren auf. Deshalb wurden sie durch unterschiedliche Laserlinien angeregt und unterschiedliche Strahlengänge verwendet. Der PBV-SRB2m-Komplex wies mit 1,9 nm einen erheblich geringeren hydrodynamischen Radius als der Sulforhodamin B-SRB2m-Komplex mit 2,9 nm auf. Ob es sich bei den unterschiedlichen hydrodynamischen Radien des PBV-SRB2m- und Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes um ein Artefakt handelte, wurde in RKWS-Messungen überprüft. PBV verursachte eine stärkere Reduktion der molekularen Größe der SRB2m-RNA als Sulforhodamin B durch die Trennung der mehrheitlich als Dimer vorliegenden RNA in Monomere. Auch FCCS-Messungen ergaben, dass monomere RNA, unabhängig von dem Detektionskanal, einen mit dem SRB2m-PBV-Komplex übereinstimmenden hydrodynamischen Radius aufweist. Der mittels FCS detektierte Unterschied in den molekularen Größen der SRB2m-RNA im Komplex mit PBV und Sulforhodamin B wurde somit nachweislich durch unterschiedliche RNA-Fluorophor-Wechselwirkungen verursacht.

# 3.2.12. Zusammenfassende Darstellung zum Sulforhodamin B und PBV bindenden RNA-Aptamer

Fluorophor bindende RNA-Aptamere können für die RNA-Markierung ein Analogon zur GFP-Markierung darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit des minimierten Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers in der RNA-Markierung mittels FCS analysiert.

# 3.2.12.1. Die Detektion des Sulforhodamin B-SRB2m-Komplexes mittels FCS

Sulforhodamin B wies im SRB2m-Komplex eine 4-fach erhöhte Diffusionszeit auf. Die Konzentrationen von freiem und an das Aptamer gebundenem Sulforhodamin B konnten mittels eines Fitting-Modelles für zwei unterschiedliche Diffusionsspezies bestimmt werden. In Titrationsexperimenten wurde eine Dissoziationskonstante des SRB2m-Sulforhodamin B-Komplexes von 238 ± 42 nM berechnet, die mit Literaturwerten übereinstimmte. Die molekulare Zählrate von Sulforhodamin B erhöhte sich nach Bindung an das RNA-Aptamer nur geringfügig, wies jedoch eine deutliche Verschiebung des Emissionsspektrums hin zu längerwelligeren Wellenlängen auf. Eine erhöhte Tendenz zu Photobleichen äußerte sich in der Verringerung der Zählrate um ein Drittel. Dieses Phänomen konnte durch erheblich verringerte Messzeit und Laserenergie nicht gemindert werden. Die Mobilität des Komplexes  $(D = 0.73 \times 10^{-10} \pm 0.02 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1})$  wurde durch das Photobleichen jedoch nicht signifikant verändert. Eine Veränderung der molekularen Zählrate und der Diffusionszeit konnte nach Verwendung eines gegen Fluoreszein selektierten RNA-Aptamers nicht festgestellt werden. Dies deutet auf eine hohe Spezifität der Bindung von Sulforhodamin B an SRB2m hin. Sulforhodamin B ist in Kombination mit dem RNA-Aptamer SRB2m aufgrund der geringen Abweichungen der experimentellen von der gefitteten Autokorrelationsfunktion und der hohen Übereinstimmung der Dissoziationskonstanten mit veröffentlichten Werten zur exakten Bestimmung der Mobilität in FCS-Messungen geeignet. An RNA gebundenes und freies Fluorophor konnten in Zellextrakten durch ihre Mobilitäten voneinander unterschieden werden. Die ausgeprägte unspezifische Wechselwirkung mit zellulären Komponenten in lebenden Zellen lässt jedoch eine Anwendung von Sulforhodamin B in vivo als problematisch erscheinen.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit wurde in RNA-Fusionskonstrukten von etwa 280 Nukleotiden ein Erhalt der Affinität zu Sulforhodamin B bei vergleichbaren photochemischen Eigenschaften der Fluorophore festgestellt. Die Anwendung des RNA-Aptamers in kleineren Fusionskonstrukten *in vitro* ist somit möglich. Bei einem etwa 2.000 Nukleotide enthaltenden RNA-Fusionskonstrukt wurde eine etwa fünffach verringerte Affinität zu Sulforhodamin B bestimmt. Diese Beobachtung beschränkt die Anwendung von SRB2m und Sulforhodamin B auf Fusionskonstrukte von weniger als 2.000 Nukleotiden.

## 3.2.12.2. Die Detektion des PBV-SRB2m-Komplexes mittels FCS

In der veröffentlichten Studie über SRB-2 und PBV war das ungebundene PBV detektierbar. In FCS-Messungen wurde hingegen ein zu vernachlässigendes Signal von ungebundenen PBV festgestellt. Das minimierte Aptamer SRB2m2 wurde in Titrationsexperimenten zu PBV gegeben. Dabei wurde eine Erhöhung der Zählrate, der molekularen Zählrate und der Partikelzahl in Abhängigkeit von der SRB2m2-Konzentration festgestellt. Die Diffusionszeit war nahezu konstant. Es wurde somit mittels FCS ausschließlich der SRB2m2-PBV-Komplex detektiert, der eine Diffusionskonstante von  $1,11 \pm 0,01 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  aufwies. Der SRB2m-PBV-Komplex ergab mit  $1,18 \pm 0.04 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  eine ähnliche Mobilität. Vergleichbare Konzentrationen von tRNA verursachten keine signifikante Erhöhung der Zählrate oder der molekularen Zählrate von PBV. Dies deutet auf eine spezifische Bindung von PBV an SRB2m2 und SRB2m in vitro hin. Mittels Zählrate und der Partikelzahl im Detektionsvolumen wurde eine Dissoziationskonstante des SRB2m2-PBV-Komplexes von  $32 \pm 3$  und  $19 \pm 2 \mu$ M errechnet. Die erheblich erhöhte molekulare Zählrate von PBV nach Bindung an SRB2m(2) und die Nichtdetektierbarkeit von ungebundenem PBV ermöglichten FCS-Messungen des Komplexes mit einem zu vernachlässigenden Hintergrund-Signal. PBV kann in Kombination mit dem RNA-Aptamer SRB2m(2) deshalb als Analogon zur Proteinmarkierung mittels der Tetracystein-Sequenz und eines Fluoreszeinderivates oder mittels GFP verstanden werden. Die durchschnittlichen Dissoziationskonstanten des SRB2m2-PBV-Komplexes von 26 µM und des SRB2m-PBV-Komplexes von 25 µM lagen in der Größenordnung der veröffentlichten Dissoziationskonstante des SRB-2-PBV-Komplexes von 23 µM. Daraus ergibt sich eine sehr hohe RNA-Konzentration, um geringste PBV-Konzentrationen sichtbar zu machen. Das relativ schwache Signal des PBV-SRB2m-Komplexes, das sich in einer durchschnittlichen molekularen Zählrate von 8 kHz ausdrückt, weist zusammen mit der langen Relaxationszeit des Triplettzustands darauf hin, dass sich PBV im Grenzbereich der Eignung für FCS-Messungen befindet. Obwohl gezeigt werden konnte, dass PBV durch die Zellmembran diffundiert, verhindern die ausgeprägte unspezifische Wechselwirkung mit zellulären Komponenten und die geringe Affinität zu SRB2m(2) eine Anwendung von PBV in Zellextrakten und in vivo.

## 3.2.12.3. Strukturbiochemische Charakterisierung von SRB2m und der Fluorophor-SRB2m-Komplexe

Die molekulare Größe des Fluorophor-RNA-Komplexes, die v.a. durch die RNA bestimmt wird, konnte mittels FCS charakterisiert werden. Der hydrodynamische Radius r<sub>H</sub> von SRB2m betrug im Komplex mit PBV 1,9  $\pm$  0,1 nm und mit Sulforhodamin B 2,9  $\pm$  0,1 nm. Mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie wurde von monomerem SRB2m ein r<sub>H</sub> von 2,1 ± 0,1 nm bestimmt. Die Hypothese einer durch PBV verursachten Reduktion der molekularen Größe der RNA, die verbunden ist mit einer Auftrennung in Monomere, konnte in Experimenten mit Roentgenkleinwinkelstreuung (RKWS) bestätigt werden. Mittels RKWS wurde eine signifikante Reduktion des Trägheitsradius der SRB2m-RNA nach Bindung an PBV gemessen. Ungebundene RNA wies einen Dimer-Anteil von 73 % und einen Monomer-Anteil von 27 % auf. Die Wechselwirkung mit Sulforhodamin B führte zu einer Reduktion des Dimer-Anteils auf 42 %. Die Wechselwirkung mit PBV verursachte eine vollständige Auftrennung der Dimere in Monomere. Das Gleichgewicht zwischen Dimer und Monomer wurde demzufolge durch die Wechselwirkung der RNA mit PBV und Sulforhodamin B unterschiedlich stark verändert. Eine helikale und eine globuläre Domäne der SRB2m-RNA wurden identifiziert. Keine signifikante konformationelle Änderung wurde nach Bindung der Fluorophore registriert. Trägheitsradien und hydrodynamische Radien befanden sich in derselben Größenordnung. Die Trägheitsradien wiesen jedoch einen geringeren Unterschied zwischen dem PBV-SRB2m-Komplex und Sulforhodamin-PBV-Komplex auf als die hydrodynamischen Radien.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit RNA-Fluorophor-Wechselwirkungen in funktionellen, photochemischen und strukturbiochemischen Aspekten beleuchtet werden. Erstmalig wurde eine Erhöhung der Triplettzeit eines Fluorophors durch die Wechselwirkung mit RNA gefunden und die Dissoziationskonstante mit Hilfe dieses Parameters bestimmt. Die Eignung des PBV und Sulforhodamin B bindenden RNA-Aptamers SRB2m für FCS wurde überprüft. Für die Charakterisierung von rekombinanter RNA *in vitro* steht in Gestalt des Sulforhodamin B und PBV bindenden RNA-Aptamers eine interessante Alternative zu bereits etablierten Methoden der indirekten RNA-Markierung zur Verfügung.
# 3.2.13. Ausblick zum Sulforhodamin B und PBV bindenden Aptamer

Mit dem Ziel einer hochaufgelösten strukturbiochemischen Charakterisierung des SRB2m-Sulforhodamin B-Komplexes wurden Kristallisationsansätze vorgenommen. Die Kristallisationsbedingung, mit der stabförmige Kristalle erhalten wurden, erfordert jedoch weitere Optimierung um roentgenkristallograhpisch analysierbare Kristalle zu erhalten.

Die Komplexe aus SRB2m und Sulforhodamin B bzw. PBV wiesen eine geringere molekulare Zählrate als die Atto647N-markierte RNA, die in Kapitel 3.1. verwendet wurde, auf. Es könnten deshalb für die Selektion von Fluorophor bindenden RNA-Aptameren photostabilere Fluorophore als PBV und Sulforhodamin B eingesetzt werden.

Die Tendenz von Sulforhodamin B und PBV, unspezifisch Proteine zu binden, lässt eine *in vivo*-Anwendung als problematisch erscheinen. Als Target für RNA-Aptamere wären dementsprechend Fluorophore geeignet, die nicht unspezifisch an zelluläre Komponenten binden. Ein Aptamer, das mit sehr hoher Affinität und Spezifität an ein photostabiles Fluorophor bände, welches zudem effizient Photonen absorbierte und emittierte, wäre eine ernstzunehmende Alternative für die RNA-Charakterisierung *in vitro* und *in vivo*.

# 4. Literaturverzeichnis

- 1. Cech, T.R., A.J. Zaug, and P.J. Grabowski, 1981. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. Cell 27, 487-496.
- 2. Guerrier-Takadaa, C., et al., 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell 35, 849-858.
- 3. Nissen, P., et al., 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science 289, 920-930.
- 4. Eigen, M. and P. Schuster, 1982. Stages of emerging life Five principles of early organization. J Mol Evol 19, 47-61.
- 5. Winkler, W.C. and C.E. Dann, 2006. RNA allostery glimpsed. Nature Structural & Molecular Biology 13, 569-571.
- 6. Fire, A., et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811.
- 7. Tuschl, T., et al., 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. Genes Dev 13, 3191-3197.
- 8. Zamore, P., et al., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25-33.
- 9. Elbashir, J.M., et al., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411, 494-498.
- 10. Hammond, S.M., 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. FEBS lett 31, 5822-5829.
- 11. Hammond, S.M., et al., 2000. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 404, 292-296.
- 12. Li, L.-C., et al., 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 17337-17342.
- 13. Fukagawa, T., et al., 2004. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. Nat Cell Biol 6, 784-791.
- 14. Volpe, T.A., et al., 2002. Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi. Science 297, 1833-1837.
- 15. Bühler, M. and D. Moazed, 2007. Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. Nature Structural & Molecular Biology 14, 1041-1048.
- 16. Bernstein, E., et al., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 401, 363-366.
- 17. Billy, E., et al., 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal tetracarcinoma cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 14428–14433.
- 18. Provost, P., et al., 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. EMBO J 21, 5864-5874.
- 19. Tolia, N.H.J.-T., Leemor, 2007. Slicer and the Argonautes. Nat Chemical Biology 3, 36-43.
- 20. Tomari, Y., et al., 2004. A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. Science 306, 1377-1380.
- 21. Hannon, G.J. and J.J. Rossi, 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. Nature 431, 371-378.
- 22. Berns, K., et al., 2004. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. Nature 428, 431-437.
- 23. Kittler, R., et al., 2007. Genome-scale RNAi profiling of cell division in human tissue culture cells. Nat Cell Biol 9, 1401-1412.
- 24. Ambros, V., 1989. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans.* C R Biologies 57, 49-57.
- 25. Chalfie, M., H.R. Horvitz, and J.E. Sulston, 1981. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans.* C R Biologies 24, 59-69.

- 26. Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, and W. Filipowicz, 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? Trends in Cell Biology 17, 118-126.
- 27. He, L. and G. J.Hannon, 2004. MicroRNAs: Small RNAs With A Big Role In Gene Regulation. Nature 5, 522-531.
- 28. Wiemer, E.A.C., 2007. The role of microRNAs in cancer: No small matter. European Journal of Cancer 43, 1529 1544.
- 29. Lee, Y., et al., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J 21, 4663-4670.
- 30. Lee, Y., et al., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425, 415-409.
- 31. Hutvagner, G., et al., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science 293, 834-838.
- 32. Grishok, A., et al., 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. Cell 106, 23-34.
- 33. Knight, S.W. and B.L. Bass, 2001. A Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis elegans*. Science 293, 2269-2271.
- 34. Ketting, R.F., et al., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans.* Genes Dev 15, 2654–2659.
- 35. Verdel, A., et al., 2004. RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex. Science 303, 672-676.
- 36. Robertson, H.D., R.E. Webster, and N.D. Zinder, 1968. Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. J Biol Chem 243, 82-91.
- 37. Robertson, H.D. and J.J. Dunn, 1975. Ribonucleic acid processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III. J Biol Chem 250, 3050-3056.
- 38. Sun, W. and A.W. Nicholson, 2001. Mechanism of action of *Escherichia coli* ribonuclease III. Stringent chemical requirement for the glutamic acid 117 sidechain and Mn<sup>2+</sup> rescue of the Glu117Asp mutant. Biochemistry 40, 5102-5110.
- 39. Campbell, F.E., et al., 2002. Pre-steady-state and Stopped-flow Fluorescence Analysis of *Escherichia coli* ribonuclease III: Insights into Mechanism and Conformational Changes Associated With Binding and Catalysis. J Mol Biol 317, 21-40.
- 40. Sun, W., A. Pertzev, and A.W. Nicholson, 2005. Catalytic mechanism of *Escherichia coli* ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis. Nucleic Acids Research 33, 807-815.
- 41. Peacock, C.S., et al., 2007. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. Nature Genetics 39, 839-847.
- 42. Bernstein, E., et al., 2003. Dicer is essential for mouse development. Nature Genetics 35, 215-217.
- 43. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 15, 188-200.
- 44. Zhang, H., et al., 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNA at their termini without a requirement for ATP. EMBO J 21, 5875-5885.
- 45. Yan, K.S., et al., 2003. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. Nature 426, 469-474.
- 46. Lingel, A., et al., 2003. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. Nature 426, 465-469.
- 47. Song, J.-J., et al., 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. Nature Structural Biology 10, 1026-1032.
- 48. MacRae, I.J., K. Zhou, and J.A. Doudna, 2007. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. Nature Structural & Molecular Biology doi:10.1038/nsmb1293.

- 49. Vermeulen, A., et al., 2005. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. RNA 11, 674-682.
- 50. MacRae, I.J., et al., 2006. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. Science 311, 195-311.
- 51. Zhang, H., et al., 2004. Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. Cell 118, 57-68.
- 52. Ma, E., et al., 2008. Auto-inhibition of Human Dicer by its Internal Helicase Domain. J Mol Biol doi: 10.1016/j.jmb.2008.05.005.
- 53. Lee, Y.S., et al., 2004. Distinct Roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways. Cell 117, 69-81.
- 54. Hammond, S.M., et al., 2001. Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. Science 293, 1146-1150.
- 55. Tomari, Y., et al., 2004. RISC Assembly Defects in the Drosophila RNAi Mutant armitage. Cell 116, 831-841.
- 56. Pham, J.W., et al., 2004. A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in Drosophila. Cell 117, 83-94.
- 57. Maniataki, E. and Z. Mourelatos, 2005. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. Genes Dev 19, 2979-2990.
- 58. Gregory, R.I., et al., 2005. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. Cell 123, 631-640.
- 59. Tahbaz, N., et al., 2004. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. EMBO Reports 5, 189-194.
- 60. Chendrimada, T.P., et al., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature 436, 740-744.
- 61. Haase, A.D., et al., 2005. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO Reports 6, 961-967.
- 62. Lee, Y., et al., 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. EMBO J 25, 522-532.
- 63. Kok, K.H., et al., 2007. Human TRBP And PACT Directly Interact With Each Other And Associate With DICER To Facilitate The Production Of Small Interfering RNA. J Biol Chem doi: 10.1074/jbc.M611768200.
- 64. Prasher, D., et al., 1996. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene 111, 229-233.
- 65. Eigen, M. and R. Rigler, 1994. Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 5740-5747.
- 66. Koltermann, A., et al., 1998. Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: High throughput screening for enzyme activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1421-1426.
- 67. Rotman, B., 1963. Measurement of activity of single molecules of b-D-Galactosidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 1081.
- 68. Xue, Q.F. and E.S. Yeung, 1995. Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme. Nature 373, 681.
- 69. Magde, D., E. Elson, and W.W. Webb, 1972. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. Physical Review letters 29, 705-708.
- 70. Ehrenberg, M. and R. Rigler, 1974. Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. Chem. Phys. 4, 390-401.
- 71. Haustein, E. and P. Schwille, 2004. Single-molecule spectroscopic methods. Current Opinion in Structural Biology.
- 72. Kinjo, M. and R. Rigler, 1995. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. Nucleic Acids Research 23, 1795-1799.
- 73. Schwille, P., F. Oehlenschläger, and N.G. Walter, 1996. Quantitative Hybridization Kinetics of DNA Probes to RNA in Solution Followed by Diffusional Fluorescence Correlation Analysis. Biochemistry 35, 10182-10193.

- 74. Kinjo, M., et al., 1998. Single-Molecule Analysis of Restriction DNA Fragments Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. Analytical Biochemistry 260, 166-172.
- 75. Kettling, U., et al., 1998. Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. Biochemistry 95, 1416-1420.
- 76. Korn, K., et al., 2000. Analysis of the RNase T1 Mediated Cleavage of an Immobilized Gapped Heteroduplex via Fluorescence Correlation Spectroscopy. Biol Chem 381, 259-263.
- 77. Kohl, T., E. Haustein, and P. Schwille, 2005. Determining Protease Activity *In Vivo* by Fluorescence Cross-Correlation Analysis. Biophys. J. 89, 2770-2782.
- 78. Mhlanga, M.M., et al., 2005. tRNA-linked molecular beacons for imaging mRNAs in the cytoplasm of living cells. Nucleic Acids Research 33, 1902-1912.
- 79. Sokol, D.L., et al., 1998. Real time detection of DNA. RNA hybridisation in living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 11538-11543.
- 80. Marme, N., et al., 2006. Identification of single-point mutations in mycobacterial 16S rRNA sequences by confocal single-molecule fluorescence spectroscopy. Nucleic Acids Research 34, e90.
- 81. Bertrand, E., et al., 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. Molecular Cell 2, 437-445.
- 82. Fusco, D., et al., 2003. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. Current Biology 13, 161-167.
- 83. Haim, L., et al., 2007. A genomic integration method to visualize localization of endogenous mRNAs in living yeast. Nature Methods 4, 409-412.
- 84. Rackham, O. and C.M. Brown, 2004. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. EMBO J 23, 3346-3355.
- 85. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature 346, 818-822.
- 86. Tuerk, C. and L. Gold, 1990. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. Science 249, 505-510.
- 87. Griffin, B.A., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, 1998. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. Science 281, 269-272.
- 88. Adams, S.R., et al., 2002. New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling *in Vitro* and *in Vivo*: Synthesis and Biological Applications. J Am Chem Soc 124, 6063-6076.
- 89. Holeman, L.A., et al., 1998. Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. Folding and Design 3, 423-431.
- 90. Grate, D. and C. Wilson, 1999. Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 6131–6136.
- 91. Babendure, J.R., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, 2003. Aptamers Switch on Fluorescence of Triphenylmethane Dyes. J Am Chem Soc 125, 14716-14717.
- 92. Stojanovic, M.N. and D.M. Kolpashchikov, 2004. Modular Aptameric Sensors. J Am Chem Soc 126, 9266-9270.
- 93. Rigler, P. and W. Meier, 2006. Encapsulation of fluorescent molecules by functionalized polymeric nanocontainers: investigation by confocal fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy. J Am Chem Soc 128, 367-73.
- 94. Hermann, T. and D.J. Patel, 2000. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. Science 287.
- 95. Najafi-Shoustari, S.H. and M. Famulok, 2005. Competitive regulation of modular allosteric aptazymes by a small molecule and oligonucleotide effector. RNA 11, 1514-1520.
- 96. Baugh, C., D. Grate, and a.C. Wilson, 2000. 2.8 A Crystal Structure of the Malachite Green Aptamer. J Mol Biol 301, 117-128.
- 97. Sussman, D., J.C. Nix, and C.J. Wilson, 2000. The structural basis for molecular recognition by the vitamin B12 RNA aptamer. Nature Structural & Molecular Biology 7, 53-57.

- 98. Macaya, R.F., et al., 1993. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 3745-3749.
- 99. Svergun, D.I. and M.H.J. Koch, 2003. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. Rep. Prog. Phys. 66, 1735-1782.
- 100. Funari, S.S., et al., 2000. Structure of Free *Thermus flavus* 5S rRNA at 1.3 nm Resolution from Synchrotron X-ray Solution Scattering. J Biol Chem 275, 31283–31288.
- 101. Misteli, T. and D.L. Spector, 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nature Biotechnology 15, 961–963.
- 102. Welsh, S. and S.A. Kay, 1997. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. Current Opinion in Biotechnology 8, 617–622.
- 103. Beaumont, P.C., D.G. Johnson, and B.J. Parsons, 1998. Laser flash photolysis studies of some rhodamine dyes. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 94, 195-199.
- 104. Kolb, F., et al., 2005. Human Dicer: purification, properties, and interaction with PAZ PIWI domain proteins. Methods in Enzymology 392, 316-336.
- 105. Gilbert, B.A., et al., 1997. RNA aptamers that specifically bind to a K ras-derived farnesylated peptide. Bioorganic & Medicinal Chemistry 5, 1115-1122.
- 106. Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research 31, 3406-3415.
- 107. Bernhart, S.H., et al., 2006. Partition Function and Base Pairing Probabilities of RNA Heterodimers. Algorithms Mol. Biol 1, 1-3.
- 108. Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Research 16, 10881-10890.
- 109. Hofacker, I., et al., 1994. Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures. Monatshefte f. Chemie 125, 167-188.
- 110. Mathews, D.H., et al., 1999. Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J Mol Biol 288, 911-940.
- 111. Kibbe, W., 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Research 35, doi:10.1093/nar/gkm234.
- 112. Jurk, M., Bioanalytik. 1998, Heidelberg & Berlin: Spektrum Akademischer Verlag. 553-555.
- 113. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155, 335-350.
- 114. Saiki, R.K., et al., 1986. Analysis of enzymatically amplified b-globin and HLA-DQ a-DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 324, 163-166.
- 115. Milligan, J.F., et al., 1987. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. Nucleic Acids Research 15, 8783-8798.
- 116. Cunningham, P.R. and J. Ofengand, 1990. Use of inorganic pyrophostase to improve the yield of *in vitro* transcription reactions catalyzed by T7 RNA polymerase. Biotechniques 9, 713-714.
- 117. Kao, C., S. Rüdisser, and M. Zheng, 2001. A simple and efficient method to transcribe RNAs with reduced 3' heterogeneity. Methods 23, 201-205.
- 118. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Manniatis, Molecular Cloning: a laboratory manual. 3 ed. 1989, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- 119. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research 16, 6127-6145.
- 120. Sanger, F. and A.R. Coulson, 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol 94, 441-448.
- 121. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- 122. Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey, 1953. Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J. Exp. Med. 97, 695-710.

- 123. Graham, F.L., et al., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol. 36, 59-74.
- 124. Han, J., et al., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev 18, 3016-3027.
- 125. Schmidt, W., Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Science. 2005, Weinheim: Wiley-VCH.
- 126. Widengren, J., R. Rigler, and a.Ü. Mets, 1994. Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy. Journal of Fluorescence 4, 255-258.
- 127. Sande n, T., et al., 2007. Monitoring Kinetics of Highly Environment Sensitive States of Fluorescent Molecules by Modulated Excitation and Time-Averaged Fluorescence Intensity Recording. Anal Chem 79, 3330-3341.
- 128. Widengren, J., J. Dapprich, and R. Rigler, 1997. Fast interactions between Rh6G and dGTP in water studied by fluorescence correlation spectroscopy. Chemical Physics 216, 417-426.
- 129. Widengren, J., et al., 2007. Strategies to Improve Photostabilities in Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy. Journal of Physical Chemistry 111, 429-440.
- 130. Krichevsky, O. and G. Bonnet, 2002. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. Rep. Prog. Phys. 65, 251-297.
- 131. Weisshart, K., V. Jüngel, and S.J. Briddon, 2004. The LSM 510 META ConfoCor 2 System: An Integrated Imaging and Spectroscopic Platform for Single-Molecule Detection. Current Pharmaceutical Biotechnology 5, 135-154.
- 132. Weisshart, K., Application manual LSM 510-Confocor 2, in Zeiss: Jena.
- 133. Eggeling, C., et al., 2006. Analysis of Photobleaching in Single Molecule Multicolor Excitation and Förster Resonance Energy Transfer Measurements. J Phys Chem A 110, 2979-2995.
- 134. Patterson, G., R.N. Day, and D. Piston, 2001. Fluorescent protein spectra. Journal of Cell Science 114, 837-838.
- 135. Haupts, U., et al., 1998. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 13573–13578.
- 136. Kohl, T., E. Haustein, and P. Schwille, 2005. Determining Protease Activity *In Vivo* by Fluorescence Cross-Correlation Analysis. Biophysical Journal 89, 2770-2782.
- 137. Schwille, P. and E. Haustein, 2004. Fluorescence Correlation Spectroscopy. An Introduction to its Concepts and Applications. Biophysics Textbook http://www.biophysics.org/education/techniques.htm.
- 138. Widengren, J., U. Mets, and R. Rigler, 1995. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. J Phys Chem 99, 13368 –13379.
- 139. Rigler, R. and E.S. Elson, eds. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications*. 2001, Springer: Berlin.
- 140. Meseth, U., et al., 1999. Resolution of Fluorescence Correlation Measurements. Biophys. J. 76, 1619-1631.
- 141. Fernandez, M.X., et al., 2002. Calculation of hydrodynamic properties of small nucleic acids from their atomic structure. Nucleic Acids Research 30, 1782-1788.
- 142. Tirado, M.M., C.L. Martinez, and J.G.d.I. Torre, 1984. Comparism of theories for the translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. Applications to short DNA fragments. J Chem Phys 81, 2047-2052.
- 143. Schwille, P., F.-J. Meyer-Almes, and R. Rigler, 1997. Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Multicomponent Diffusional Analysis in Solution. Biophys. J. 72, 1878-1886.
- 144. Bacia, K. and P. Schwille, 2007. Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. Nature Protocols 2, 2842-2856.
- 145. Koppel, D.E., 1974. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. Physical Review 10, 1938-1945.
- 146. Weißhart, K., Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. 2005: Jena.

- 147. Lottspeich, F. and Zorbas, H., Bioanalytik. 1998, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- 148. Hill, A.V., 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. Journal of Physiology 40, iv-vii.
- 149. Fersht, A., Structure and Mechanism in Protein Science. 3 ed, ed. M.R. Julet and G.L. Hadler. 1999, New York: Freeman and Company.
- 150. Fradin, C., D. Zbaida, and M. Elbaum, 2005. Dissociation of nuclear import cargo complexes by the protein Ran: a fluorescence correlation spectroscopy study. C. R. Biologies 328, 1073-1082.
- 151. Barlowe, C., 2002. COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. Current Opinion in Cell Biology 14, 417-422.
- 152. Bonifacino, J.S. and B.S. Glick, 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. Cell 116, 153-166.
- 153. Dubin, S.B., J.H. Lunacek, and G.B. Benedek, 1967. Observation of the spectrum of light scattered by solutions of biological macromolecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1164-1171.
- 154. Pecora, R., 1972. Quasielastic light scattering from macromolecules. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. Chem. 1, 254-276.
- 155. Langowski, J., W. Kremer, and U. Kapp, 1992. Dynamic light scattering for study of solution conformation and dynamics of superhelical DNA. Methods in Enzymology 211, 430-448.
- 156. Guinier, A., 1939. La diffraction des rayons X aux trés petits angles; application á l'étude de phénoménes ultramicroscopiques. Ann. Phys. 12, 166-237.
- 157. Rubinstein, M. and R.H. Colby., Polymer Physics. 2003, Oxford: Oxford University Press.
- 158. Cola, E.D., et al., 2005. Persistence Length of Titin from Rabbit Skeletal Muscles Measured with Scattering and Microrheology Techniques. Biophys. J. 88, 4095-4160.
- 159. Roessle, M.W., et al., 2007. Upgrade of the Small Angle X-ray scattering Beamline X33 at the EMBL Hamburg. J. Appl. Crystallogr. 40, 190-194.
- 160. Konarev, P.V., et al., 2006. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Crystallogr. 39, 277-286.
- 161. Konarev, P.V., et al., 2003. PRIMUS A Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Crystallogr. 36, 1277-1282.
- 162. Svergun, D.I., 1992. Determination of the regularisation parameter in indirecttransform methods using perceptual criteria. J. Appl. Crystallogr. 25, 495-503.
- 163. Porod, G., O. Kratky, and O. Glatter, *Small-angle X-ray scattering*. 1982, Academic Press: London.
- 164. Svergun, D.I., 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. Biophys. J. 76, 2879-2886.
- Petoukhov, M.V. and D.I. Svergun, 2005. Global rigid body modelling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. Biophys. J. 89, 1237-1250.
- 166. Svergun, D.I., C. Barberato, and M.H.J. Koch, 1995. CRYSOL-a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. J. Appl. Crystallogr. 28, 768-773.
- 167. Akey, D.L. and J.M. Berger, 2005. Structure of the nuclease domain of ribonuclease III from *M. tuberculosis* at 2.1 Å. Protein Science doi:10.1110/ps.051665905.
- 168. Blaszczyk, J., et al., 2001. Chrystallographic and Modeling Studies of RNAse III Suggest a Mechanism for Double-Stranded RNA Cleavage. Structure 9, 1225-1236.
- 169. Takeshita, D., et al., 2007. Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human Dicer. J Mol Biol doi:10.1016/j.jmb.2007.08.069.
- 170. Widengren, J. and P. Schwille, 2000. Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy. J Phys Chem 104, 6416-6428.

- 171. Frank, R. and H. Köster, 1979. DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamide-gels. Nucleic Acids Research 6, 2069-2087.
- 172. Martinez, J. and T. Tuschl, 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. Genes Dev 18, 975-980.
- 173. Song, J.-J., et al., 2004. Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. Science 305, 1434-1437.
- 174. Kini, H.K. and S.P. Walton, 2007. *In vitro* binding of single-stranded RNA by human Dicer. FEBS lett doi:10.1016/j.febslet.2007.11.010.
- 175. Swaminathan, R., C. Hoang, and A. Verkman, 1997. Photobleaching Recovery and Anisotropy Decay of Green Fluorescent Protein GFP-S65T in Solution and Cells: Cytoplasmic Viscosity Probed by Green Fluorescent Protein Translational and Rotational Diffusion. Biophys. J. 72, 1900-1907.
- 176. Cleland, W., 1979. Substrate inhibition. Methods in Enzymology 63, 500-513.
- 177. Neet, K.E., 1980. Cooperativity in Enzyme Function: Equilibrium and Kinetic Aspects. Methods in Enzymology 64, 139-192.
- 178. Werther, T., et al., 2008. Amino Acids Allosterically Regulate the Thiamine Diphosphate-dependent a-Keto Acid Decarboxylase from Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem 283, 5344–5354.
- 179. Blangy, D., H. Buc, and J. Monod, 1968. Kinetics of the Allosteric Interactions of Phosphofructokinase from *Escherichia coli.* J Mol Biol 31, 13-35.
- 180. Frieden, C., 1979. Slow Transitions And Hysteretic behavior in Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 48, 471-489.
- 181. Rigler, R., et al., 1993. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low-background: analysis of translational diffusion. European biophysical journal 22, 169-175.
- 182. Chance, B., 1943. The Kinetics of the Enzyme-Substrate Compound of Peroxidase. J Biol Chem 151, 553-577.
- 183. Berg, O.G. and P.H.v. Hippel, 1985. Diffusion-controlled macromolecular interactions. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 14, 131-160.
- 184. Ogura, Y., 1955. Catalase activity at high concentration of hydrogen peroxide. Archives of Biochemistry and Biophysics 57, 288-300.
- Pack, C., et al., 2006. Microenvironment and Effect of Energy Depletion in the Nucleus Analyzed by Mobility of Multiple Oligomeric EGFPs. Biophys. J. 91, 3921– 3936.
- 186. Kim, S.A., K.G. Heinze, and P. Schwille, 2007. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. Nature Methods 3, 83-89.
- 187. Sauer, M., et al., 1995. New Fluorescent Dyes in the Red Region for Biodiagnostics. Journal of Fluorescence 5, 247-262.
- Seidel, C.A.M., A. Schulz, and M.H.M. Sauer, 1996. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. J Phys Chem 100, 5541-5553.
- 189. Serebrov, V., et al., 1998. Mg<sup>2+</sup> binding and structural stability of mature and *in vitro* synthesized unmodified *Escherichia coli* tRNAPhe. Nucleic Acids Research 26, 2723-2728.
- Borsch, M., et al., 1998. Conformational changes of the H<sup>+</sup>-ATPase from *Escherichia coli* upon nucleotide binding detected by single molecule fluorescence. FEBS lett 437, 251-4.
- 191. Patel, D.J., et al., 1997. Structure, Recognition and Adaptive Binding in RNA Aptamer Complexes. J Mol Biol 272, 645-664.
- 192. Skibinska, L., et al., 2004. Structural Similarity of *E. coli* 5S rRNA in Solution and Within the Ribosome. Biopolymers 73, 316-325.
- 193. Nguyen, D.H., et al., 2002. Binding to an RNA Aptamer Changes the Charge Distribution and Conformation of Malachite Green. J Am Chem Soc 124, 15081-15084.

- 194. Edman, L., Ülo Mets, and R. Rigler, 1996. Conformational transitions monitored for single molecules in solution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 6710-6715.
- 195. Eydeler, K., *In vitro und in vivo Anwendungen des Aptamers SRB2m*, in *Department für Chemie*. 2007, Hamburg: Hamburg.
- 196. Magbanua, E., Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von verschiedenen RNA-Fusions-Konstrukten, in Department für Chemie. 2007, Hamburg: Hamburg.
- 197. Tang-Wai, D.F., et al., 1993. The Nitrogen of the Acetamido Group of Colchicine Modulates P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance. Biochemistry 32, 6470-6476.

# Anhang

### I. Vektorkarten

Die Vektorkarte von pBlueskript II SK (+) (a), pcDNA3.1 (b) und pEGFP-N1 (c). *Multiple Cloning Site* von pBlueskript II SK (+) (d), pcDNA3.1 (e) und pEGFP-N1 (f). Alle Vektoren tragen eine Ampicillin-Restistenz. Die Vektoren pcDNA3.1 und pEGFP-N1 sind zur Expression von Genen in eukaryotischen Organismen geeignet.



c)



### d) pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826) Hinc II Apa I EcoO109 I Acc I Şal I BssH II T7 Promoter Kpn I Xho I Drall KS primer binding site... M13–20 primer binding site T7 primer binding site Bsp1061 Çlal Hind III EcoRV EcoRI Pstl Smal BamHI Spel Xbal I I I I I |Eag| BstX|\$ac|| || | | Sac I ... GGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTC.. ....KS primer binding site SK primer binding site T3 Promoter BssH II β-gal α-fragment -...CAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC T3 primer binding site M13 Reverse primer binding site T3 primer binding site e) enhancer region (3' end) 689 CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG 749 TAACAACTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT putative transcriptional start 3' end of hCMV 809 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC T7 promoter/primer binding site Nhe 1 Pme 1 Afl 11 Hind 111 Asp718 1 Kpn 1 869 GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC TTAAGCTTGG TACCGAGCTC BamH I BstX 1\* EcoRI EcoR V BstX 1\* Not 1 Xho 1 929 GGATCCACTA GTCCAGTGTG GTGGAATTCT GCAGATATCC AGCACAGTGG CGGCCGCTCG Xba I Apa 1 Pme I pcDNA3.1/BGH reverse priming site 989 AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC 1049 CATCTGTTGT TTGCCCCTCC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG BGH poly (A) site 1109 TCCTTTCCTA ATAAAATGAG GAAATTGCAT

f)

611 621 641 651 591 601 631 661 671 EGFP <u>ổ cta go</u>g cta ôcg gạc to<u>a gắt ct</u>o <u>gag ctổ aag ctt</u> o<u>ga ắtt c</u>tg ca<u>g tổg acg gta co</u>g g<u>ig gat coa cog g</u>i goc aco **atg giể** Sacl Hind III Apal BamHI Agel Bsp120 | Xmal Nhe | Eco47 || Bgl II Xho EcoRI Pst Sall Kpnl Accl Asp7181 Ech 36 ||

Anhang

### II. Sequenz des kodierenden Teils des humanen Dicer-Gens (ca. 5769 bp):

### 5'

tgccatggcaacaagaagcaattcatgataacatttatacgccaagaaaatatcaggttgaactgcttgaagcagctctggatcat aataccatcgtctgtttaaacactggctcagggaagacatttattgcagtactactcactaaagagctgtcctatcagatcagggga gacttcagcagaaatggaaaaaggacggtgttcttggtcaactctgcaaaccaggttgctcaacaagtgtcagctgtcagaactc attcagatctcaaggttggggaatactcaaacctagaagtaaatgcatcttggacaaaagagagatggaaccaagagtttacta agcaccaggttctcattatgacttgctatgtcgccttgaatgttttgaaaaatggttacttatcactgtcagacattaaccttttggtgtttg atgagtgtcatcttgcaatcctagaccacccctatcgagaaattatgaagctctgtgaaaattgtccatcatgtcctcgcattttggga tgctgaaactgcaactgacctggtggtcttagacaggtatacttctcagccatgtgagattgtggtggattgtggaccatttactgaca gaagtgggctttatgaaagactgctgatggaattagaagaagcacttaattttatcaatgattgtaatatatctgtacattcaaaagaa agagattctactttaatttcgaaacagatactatcagactgtcgtgccgtattggtagttctgggaccctggtgtgcagataaagtagc tggaatgatggtaagagaactacagaaatacatcaaacatgagcaagaggagctgcacaggaaatttttattgtttacagacactttcctaaggaaaatacatgcactatgtgaagagcacttctcacctgcctcacttgacctgaaatttgtaactcctaaagtaatcaaactgctcgaaatcttacgcaaatataaaccatatgagcgacagcagtttgaaagcgttgagtgtataataatagaaatcaggataat tatgtgtcatggagtgattctgaggatgatgatgaggatgaagaaattgaagaaaaagagaagccagagacaaattttccttctcc ttttaccaacattttgtgcggaattattttgtggaaagaagatacacagcagttgtcttaaacagattgataaaggaagctggcaaa gaagcagaattcagaaaacaggaagaggtacttaggaaatttcgagcacatgagaccaacctgcttattgcaacaagtattgta gaagagggtgttgatataccaaaatgcaacttggtggttcgttttgatttgcccacagaatatcgatcctatgttcaatctaaaggaag agcaagggcacccatctctaattataatgttagcggatacagacaaaataaaaagttttgaagaagaccttaaaaacctacaaa gttttcccaccatatgtgttgaggcctgacgatggtggtccacgagtcacaatcaacacggccattggacacatcaatagatactgt gctagattaccaagtgatccgtttactcatctagctcctaaatgcagaacccgagagttgcctgatggtacattttattcaactctttatc tgccaattaactcacctcttcgagcctccattgttggtccaccaatgagctgtgtacgattggctgaaagagttgtagctctcatttgct gtgagaaactgcacaaaattggcgaactggatgaccatttgatgccagttgggaaagagactgttaaatatgaagaggagcttg atttgcatgatgaagaagagaccagtgttccaggaagaccaggttccacgaaacgaaggcagtgctacccaaaagcaattcca gagtgtttgagggatagttatcccagacctgatcagccctgttacctgtatgtgataggaatggttttaactacacctttacctgatgaa ctcaactttagaaggcggaagctctatcctcctgaagataccacaagatgctttggaatactgacggccaaacccatacctcagat gagttgattacaagacttcaccagtatatattctcacatattcttcggcttgaaaaacctgcactagaatttaaacctacagacgctga ttcagcatactgtgttctacctcttaatgttgttaatgactccagcactttggatattgactttaaattcatggaagatattgagaagtctga agctcgcataggcattcccagtacaaagtatacaaaagaaacaccctttgtttttaaattagaagattaccaagatgccgttatcatt gtatgaaacttttgcagaatattataaaacaaagtacaaccttgacctaaccaatctcaaccagccactgctggatgtggaccaca catcttcaagacttaatcttttgacacctcgacatttgaatcagaaggggaaagcgcttcctttaagcagtgctgagaagaggaaa gccaaatgggaaagtctgcagaataaacagatactggttccagaactctgtgctatacatccaattccagcatcactgtggagaa

aagctgtttgtctccccagcatactttatcgccttcactgcctttgactgcagaggagctaagagcccagactgccagcgatgctgg cgtgggagtcagatcacttcctgcggattttagataccctaacttagacttcgggtggaaaaaatctattgacagcaaatctttcatctcaatttctaactcctcttcagctgaaaatgataattactgtaagcacagcacaattgtccctgaaaatgctgcacatcaaggtgctaa tagaacctcctctctagaaaatcatgaccaaatgtctgtgaactgcagaacgttgctcagcgagtcccctggtaagctccacgttga agtttcagcagatcttacagcaattaatggtctttcttacaatcaaaatctcgccaatggcagttatgatttagctaacagagacttttg ttgggtactcctcaaggactcttggccccaatcctggacttattcttcaggctttgactctgtcaaacgctagtgatggatttaacctgg agcggcttgaaatgcttggcgactcctttttaaagcatgccatcaccacatatctattttgcacttaccctgatgcgcatgagggccgc ctttcatatatgagaagcaaaaaggtcagcaactgtaatctgtatcgccttggaaaaaagaagggactacccagccgcatggtg gtgtcaatatttgatccccctgtgaattggcttcctcctggttatgtagtaaatcaagacaaaagcaacacagataaatgggaaaaa cctgatgtggagggctccgaaggaagaggctgactatgaagatgatttcctggagtatgatcaggaacatatcagatttatagata atatgttaatggggtcaggagcttttgtaaagaaaatctctcttttctcctttttcaaccactgattctgcatatgaatggaaaatgcccaa aaaatcctccttaggtagtatgccattttcatcagattttgaggattttgactacagctcttgggatgcaatgtgctatctggatcctagc aaagctgttgaagaagatgactttgtggtgggttctggaatccatcagaagaaaactgtggtgttgacacgggaaagcagtcca tttcttacgacttgcacactgagcagtgtattgctgacaaaagcatagcggactgtgtggaagccctgctgggctgctatttaaccag ctgtggggagagggctgctcagcttttcctctgttcactggggctgaaggtgctcccggtaattaaaaggactgatcgggaaaaggccctgtgccctactcgggagaatttcaacagccaacaaaagaacctttcagtgagctgtgctgctgctgctgctgctgcggccagttcacgct caccttatatcggggtttgaaaattttgaaaagaaaatcaactacagattcaagaataaggcttaccttctccaggcttttacacatg cctcctaccactacaatactatcactgattgttaccagcgcttagaattcctgggagatgcgattttggactacctcataaccaagca cctttatgaagacccgcggcagcactccccgggggtcctgacagacctgcggtctgccctggtcaacaacaccatctttgcatcg ctggctgtaaagtacgactaccacaagtacttcaaagctgtctctcctgagctcttccatgtcattgatgactttgtgcagtttcagcttg agaagaatgaaatgcaaggaatggattctgagcttaggagatctgaggaggatgaagaagaagaagaggatattgaagttcc aaaggccatgggggatatttttgagtcgcttgctggtgccatttacatggatagtgggatgtcactggagacagtctggcaggtgtac tatcccatgatgcggccactaatagaaaagttttctgcaaatgtaccccgttcccctgtgcgagaattgcttgaaatggaaccagaa actgccaaatttagcccggctgagagaacttacgacgggaaggtcagagtcactgtggaagtagtaggaaaggggaaatttaa aggtgttggtcgaagttacaggattgccaaatctgcagcagcaagaagagccctccgaagcctcaaagctaatcaacctcaggt tcccaatagctga 3'







0.5µg/lane, 20cm length gel, 1X TBE, 8W/cm, 3h

bp

300

200

150

100

- 75

50

PageRuler™ Unstained Protein Ladder



2%

- 34, 34

0.5µg/lane, 20cm length gel,

1X TAE, 8Wem, 3h

PAGE-Ruler<sup>™</sup> Prestained Protein-Ladder

10%





2

### RiboRuler<sup>™</sup> RNA low range



1X TAE, 7V/cm, 45min

0.5µg/lane, 8cm length gel,

750

500

250

25.0

25.0

25.0

5.0

5.0

5.0

5%1

## IV Gefahrenstoffinformation

Verbindung	R- und S-Sätze	Gefahrensymbol
Acrylamid	R 45-46-20/21- 25-36/38-43-48 23/24/25-62	т
	3 53-45-24-30/37	
Ammoniumperoxiddisulfat	R 8-22-36/37/38-42/43	O, Xn
(APS)	S 22-24-26-37	
Ampicillin	R 36/37/38-42/43	Xn
	S 23-26-36/37	
Beta-Mercaptoethanol	R20/22-24-34-51/53	T, N
	S26-36/37/39-45-61	
Bisacrylamid	R 22-20/21/22	Xn
	S 24/25-36/37	
Bromphenolblau	S 22-24/25	
5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-	R 36/37/38	Xi
Phosphat (BCIP)	S22-24/25/26	
Digitonin	R 23/24/25	Т
	S 22-28-36/37-45	
Dithiothreitol	R 22-36/38	Xn
(DTT)	S 24/25	
Essigsäure	R10-35	С
	S23-26-36/37/39-45	
Ethanol	R11	F
	S 7-16	

A	n	h	а	n	q

Ethidiumbromid	R22-26-36/37/38-68	T+
	S26-28-36/37-45	
Ethylendiamintetraessigsäure	R36-52/53	Xi
(FDTA)	S61	
	001	
Formaldehyd	R 23/24/25-34-40-43	т
	S 26-36/37/39-45-51	
Glutardialdehyd	R 23/25-34-42/43-50	Ν
	S 26-36/37/39-45-61	
Hepes	R36, R37, R38	Xi
	S26, S36	
Methanol	R 11-23/24/25-39/23-24/25	ΤF
Wouldhol	S 7-16-36/37-45	1,1
Natriumcacodylat	R 23/25-50/53	T, N
	S 20/21-28-45-60	
Natriumdodecylsulfat	R 21/22-36/37/38	Xn
(Sodiumdodecylsulfate, SDS)	S 26-36/37	
	Doc	•
Natriumnydroxid	R35	C
	S 26-37/39-45	
Natriumdihvdrogenphosphat	R 34	С
	S 26-45	•
4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid	R 20/21-33	Xn
(NBT)	S 22-45	
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiami	n R 11-20/22-34	F, C
(TEMED)	S 16-26-36/37/39- 45	
Patent Blau V (PBV)	S 22-24/25	

Penicillin G	R 42/43	Xn
	S 22-36/37	
Salzsäure	R 34-37	С
	S 26-36/37/39-45	
Silbernitrat	R 34-50/53	C, N
	S 26-45-60-61	
Streptomycin	R 61-22	Т
	S 53-36/37/39-45	
Strontiumchlorid	R 41	Xi
	S 26-39	
Tris	R 36/38	Xi
Triton X100	R 22-41	Xn
	S 25-26-39	

# Veröffentlichungen

Buchbeitrag (im Druck):

Werner, A. and Hahn, U. "FCS based characterisation of aptamer ligand interaction", Methods in Molecular Biology. Editor: Jones, T. L., Humana Press, Totowa NJ

# Posterpräsentationen

Arne Werner, Petr V. Konarev, Dmitri I. Svergun and Ulrich Hahn. 'Characterisation of the sulforhodamine B binding RNA-Aptamer by Fluorescence Correlation Spectroscopy and Small-Angle X-Ray-Scattering' 'RNA biochemistry & microRNAs Workshop', Meeting of the RNA study section of the German Society of Biochemistry and Molecular Biology (GBM), Kassel University, Germany, 12.10.-15.10. 2006

Arne Werner, Petr V. Konarev, Dmitri I. Svergun and Ulrich Hahn. 'Characterisation of the sulforhodamine B binding RNA-Aptamer by Fluorescence Correlation Spectroscopy and Small-Angle X-Ray-Scattering', Annual Meeting of the GBM, Hamburg University, Germany, 16.9.-19.9. 2007

Arne Werner, Patrick Ziegelmüller and Ulrich Hahn. 'An ultrasensitive mobility based enzyme assay for human Dicer', Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Germany, 27./.-3.8. 2008

Arne Werner, Patrick Ziegelmüller and Ulrich Hahn. 'An ultrasensitive mobility based enzyme assay for human Dicer', 14' th International Workshop on 'Single molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences', Berlin-Adlershof, Germany, 17.9.-19.9. 2008

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des spannenden Themas. Für seine Diskussionsbereitschaft und Geduld, mit denen er auf meine Fragen und Anliegen einging, möchte ich mich insbesondere bedanken.

Herrn Dr. Dmitri Svergun am EMBL Outstation am Desy in Hamburg möchte ich danken für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung strukturbiochemischer Fragen des RNA-Aptamers mit Hilfe von Roentgenkleinwinkelstreuung. Herrn Dr. Petr Konarev möchte ich für seine kollegiale Zusammenarbeit an diesem Projekt sowie die geduldige Beantwortung aller in diesem Zusammenhang auftretenden Fragen danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg möchte ich danken, für die Möglichkeit, DLS-Messungen und Kristallisationsexperimente in seinem Labor durchzuführen. Herrn Dr. Lars Redecke und Herrn Arne Meyer möchte ich danken für eine Einführung in diese Methodik. Herrn Dr. Markus Perbandt möchte ich danken für seine Unterstützung bei den Kristallisationsexperimenten und seine Hilfsbereitschaft bei der Beantwortung strukturbiochemischer Fragen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Patrick Ziegelmüller am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg, der erheblich zum Gelingen des molekularbiologischen und immunbiochemischen Teils meiner Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Peter Grunwald am Institut für Physikalische Chemie an der Universität Hamburg möchte ich danken für sein Interesse und seine Unterstützung in Fragen der Enzymkinetik und zu dem Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-basierten Enzym-*Assay*.

Maria de los Angeles Chavez Planes an der Universität Havanna in Kuba möchte ich für ihre freundliche Unterstützung in enzymkinetischen Fragen danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Horst Weller am Institut für Physikalische Chemie an der Universität Hamburg möchte ich mich für die Möglichkeit, in seinem Labor fluoreszenzspektroskopische Messungen durchzuführen, bedanken. Herrn Dr. Nikolai Gaponik möchte ich danken für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Messungen. Bei Herrn Dr. Witold Filipowicz am Friedrich Miescher Institut in Basel möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung eines das Dicer-Gen enthaltenden Plasmides bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel am Institut für Biochemie am Univesitätsklinikum Eppendorf der Universität Hamburg möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, einen zur Fluoreszenzdetektion geeigneten 2D-*Scanner* verwenden zu können.

Herrn Prof. Dr. Roger Goody am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund möchte ich für die freundliche Aufnahme in sein Labor und den Einblick in *pre-steady state*-Messungen und fluoreszenzspektroskopische Experimente danken.

Herrn Prof. Dr. Andrew Torda am Zentrum für Bioinformatik der Universität Hamburg möchte ich für die wertvollen Diskussionen bezüglich der formalen - englischsprachigen - Darstellung einzelmolekülspektroskopischer Daten danken.

Bei Frau Prof. Dr. Petra Schwille am Biotechnologischen Zentrum der Technischen Universität Dresden möchte ich mich bedanken für das freundliche Zurverfügungstellen von Plasmiden, die die Gensequenz von rot fluoreszierenden Proteinen enthalten.

Herrn Dr. Klaus Weißhart der Firma Zeiss in Jena möchte ich für die freundliche Beantwortung von Fragen bezüglich der Durchführung und Auswertung von Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messungen danken.

Herrn Dr. Tobias Kohl vom Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen möchte ich für seine Ratschläge bei den Anfängen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Experimente danken.

Den Herren Dr. Rico Czaja und Heiko Fickert sowie Frau Dr. Iris Fransson vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg möchte ich für ihre geduldige und freundliche Unterstützung bei meinen Anfängen in der RNA-Biochemie danken.

Bei Frau Elena Wasiljew und Frau Margot Binnewies möchte ich mich für ihre zuverlässige Unterstützung bei den molekular- und zellbiologischen Experimenten und in der Praktikumsbetreuung sowie für ihre angenehme Zusammenarbeit bedanken. Bei Frau Katja Eydeler und Frau Eileen Magbanua möchte ich mich bedanken für die freundliche Zusammenarbeit, insbesondere in der Durchführung und Datenanalyse der FCS-Messungen des Sulforhodamin B-bindenden RNA-Aptamers.

Frau Yvonne Michels, Jana Gerber, Katja Kleinstäuber und Herrn Güven Kurtbay möchte ich für ihre Unterstützung des Dicer-Projektes während ihrer Projektstudie oder als Hilfswissenschaftler danken.

Bei Frau Cindy Meyer und Frau Tijana Zivkovic möchte ich mich für das nette Miteinander und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie bedanken für die freundliche Athmosphäre und kollegiale Zusammenarbeit.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Ehemann Nils möchte ich für ihre immerwährende Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld während meiner Dissertation danken.

# Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Zusammenarbeiten sind im Text genannt.

Die Arbeit wurde zuvor keiner Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt.

Hamburg, 5. Mai 2008