

# **Sequenzspezifische RNA-Detektion basierend auf dem RNA-bindenden Protein Pumilio**

*Sequence-specific RNA-detection using the RNA-binding protein  
Pumilio*

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Diplom-Biochemikerin  
**Anna Katharina Rath**

Hamburg, 2014



Der experimentelle Teil der vorgelegten Arbeit wurde von Juli 2010 bis April 2014 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie im Department Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Andrea Rentmeister angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Andrea Rentmeister

Prof. Dr. Ulrich Hahn

Datum der Disputation: 9. Mai 2014



Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Rath, A. K., Kellermann, S. J., Rentmeister, A. (2014). „Programmable Design of Functional Ribonucleoprotein-Complexes“, Chemistry-An Asian Journal, DOI: 10.1002/asia.201402220

Kellermann, S. J.\*, Rath, A. K.\*, Rentmeister, A. (2013), "Tetramolecular Fluorescence Complementation for Detection of Specific RNAs in Vitro", Chembiochem **14**(2): 200-204

\* geteilte Erstautorenschaft

In folgenden Arbeiten wurden Methoden verwendet oder Ergebnisse beschrieben, die unter meiner Anleitung im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind:

Haase, D. (2014), „Sequenzspezifische Modifikation von RNA“, Universität Hamburg, Masterarbeit

Eisenlohr, B. L. (2013), „Extension of the TetFC System“, Universität Hamburg, Bachelorarbeit

Mutas, M. (2012), „Nachweis von *in vivo* produzierter RNA mittels Pumilio und Split-GFP“, Universität Hamburg, Bachelorarbeit

Kellermann, S. J. (2012), „Etablierung einer Methode zur Detektion von RNA *in vitro* basierend auf Split-GFP und Pumilio“, Universität Hamburg, Masterarbeit



„Achtung! Jetzt gibt es nur zwei Möglichkeiten:  
Entweder es funktioniert oder es funktioniert nicht.“

*Lukas in „Jim Knopf und Lukas, der Lokomotivführer“*

*Allen, die mir geholfen haben, so weit zu kommen  
und mich durch diese Arbeit begleitet haben!*



# I. Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abkürzungsverzeichnis	
III	Abstract	
IV	Zusammenfassung	
V	Abbildungsverzeichnis	
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Bedeutung von RNA-Detektionsmethoden	1
1.2.	Methoden zum Nachweis von RNA in Zellen	4
1.3.	Das RNA-bindende Protein Pumilio	16
2.	ZIELSETZUNG	27
3.	ERGEBNISSE	29
3.1.	Klonierung, Reinigung und Charakterisierung von Pumilio	29
3.2.	Charakterisierung der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung	35
3.3.	TetFC zur Strukturanalyse	42
3.4.	Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung (RNP-FC)	51
3.5.	Versuch der Entwicklung eines Pumilio-Screening-Systems	71
4.	DISKUSSION	85
4.1.	Das RNA-bindende Protein Pumilio	85
4.2.	Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung	88
4.3.	Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung	97
4.4.	Pumilio-Screening	100
5.	AUSBLICK	105
6.	MATERIAL	109
6.1.	Geräte	109
6.2.	Verbrauchsmaterialien	110
6.3.	Chemikalien	110
6.4.	Puffer, Medien und Lösungen	110
6.5.	Enzyme und Proteine	113
6.6.	Längenstandards	113
6.7.	Kommerziell erworbene Kits und Säulen	113
6.8.	Nukleotide und Radionukleotide	114
6.9.	Oligonukleotide	114

## INHALTSVERZEICHNIS

---

6.10. Antikörper	117
6.11. Bakterienstämme	117
6.12. Plasmide	117
6.13. Software	118
7. METHODEN	121
7.1. Mikrobiologische Methoden	121
7.2. Molekularbiologische Methoden	122
7.3. Proteinbiochemische Methoden	128
7.4. Interaktionsstudien der Proteine Pumilio und Nanos	132
7.5. Fluoreszenzkomplementierung	134
8. LITERATURANGABEN	137
9. ANHANG	I
9.1. Entsorgung	i
9.2. Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS	ii
9.3. Plasmidsequenzen	iv
10. DANKSAGUNG	XV
11. LEBENSLAUF	XVII
12. VERÖFFENTLICHUNGEN	XIX
13. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	XX

## II. Abkürzungsverzeichnis

2'-F	2'-Desoxy-2'-Fluor
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	A/U-reiches Element
AS	Aminosäure
AS	Antisense
AU	Willkürliche Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung
bp	Basenpaare
Brat	<i>brain tumor</i>
BS	Bindestelle
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CBD	Chitin-Bindedomäne
CD	Circulardichroismus
Ci	Curie
CIEX	<i>cation exchange chromatography</i>
CP	Hüllprotein ( <i>coat protein</i> )
CPEBP	<i>cytoplasmic polyadenylation element binding protein</i>
CRISPR	<i>clustered intergenic short palindromic repeats</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECHO	<i>exciton-controlled hybridization-sensitive oligonucleotide</i>
EDT	Ethylendithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EJC	<i>exon junction complex</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
FBF	<i>fem-3 binding factor</i>
FC	Fluoreszenzkomplementierung
FCCS	Fluoreszenzkrosskorrelationspektroskopie
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FI	Fluoreszenzintensität(en)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FIT	<i>forced intercalation</i>
FLAsH	<i>fluorescein arsenical hairpin binder</i>
Fluc	<i>fire fly luciferase</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	Förster-Resonanz Energie Transfer
FRMP	<i>fragile x mental retardation protein</i>
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
hb	<i>hunchback</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRE	<i>iron response element</i>
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
LB	Luria-Bertani
MB	<i>molecular beacon</i>
miRNA	micro RNA
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTRIP	<i>multiply labeled tetravalent RNA imaging probe</i>
NBT	3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylylen)-bis-[2-(4-nitro-phenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid]
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
Nos	Nanos
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline + tween</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA	<i>peptidic nucleic acid</i>
PP7	<i>Pseudomonas</i> Phage 7
PUF	Pumilio und FBF
Pum	Pumilio
Pum-HD	Pumilio-Homologie-Domäne
RBP	RNA-bindendes Protein
Rel. FI	Relative Fluoreszenzintensität
Rluc	<i>Renilla luciferase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RNP-FC	Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S10	Faltblatt 10 des GFPs
S11	Faltblatt 11 des GFPs
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium lauryl sulfate</i> )
SLO	Streptolysin O
SMART	<i>simple modular architecture research tool</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
SSC	<i>standard saline citrate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Tetra-Cystein
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
TetFC	Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TO	Thiazol-Orange
TriFC	Trimolekulare Fluoreszenzkomplementierung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

U	Unit
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
Var1	Variante 1 (Pum6-2/7-2)
Var2	Variante 2 (Pum1-2/2-1/3-2)
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
YFP	gelb ( <i>yellow</i> )-fluoreszierendes Protein
YT	<i>yeast extract, tryptone</i>
ZBP	<i>zip code binding protein</i>

### III. Abstract

RNA imaging in living cells is important for analysis of subcellular localization, structural changes as well as processing of RNAs. Especially, visualization of dynamics and transport processes of subcellularly localized RNAs may help us understand their role in neuronal diseases and cancer. Development of genetically encoded probes is especially important to keep natural conditions within the cell.

In order to develop a completely protein-based sequence-specific RNA probe, the RNA-binding protein Pumilio was produced, purified and characterized. The tetramolecular fluorescence complementation (TetFC), an RNA detection method based on Pumilio and a tripartite split-GFP, was characterized for future applications *in vivo*. A negative temperature dependency as well as a detection limit of 16 nM RNA in presence of competitive RNA was determined. The results of this study in combination with the possibility to produce all components by the cellular machinery suggest that TetFC may become realized *in vivo*.

Furthermore, TetFC could be used to detect formation of a stem-loop-structure within RNA with a 5-fold signal enhancement. A structural difference of two RNAs that differ only in two nucleotides was also demonstrated. These results are the basis for future analyses of RNA-secondary structures in cells.

The number of RNA targets accessible by TetFC was increased by developing ribonucleoprotein-fluorescence complementation (RNP-FC). Application of short single stranded staple RNAs in combination with a new Pumilio variant stimulated efficiently self-organized formation of an RNP-complex on target RNA containing only one or even no Pumilio binding motif. With the use of one staple RNA the L1 RNA could be detected *in vitro* with a 25-fold increased signal compared to non-target RNA. Using combinations of two staple RNAs, spliced and unspliced HIV-RNAs could be discriminated yielding a detection system independent on Pumilio's inherent sequence specificity. Development of a new *in vitro* screening system for Pumilio proteins was not successful, since the previously described RNA-dependency of the interaction of Pumilio with the protein Nanos could not be confirmed.

In summary, this thesis provides first results for future Pumilio-based sequence-specific RNA detection *in vivo* via TetFC and RNP-FC. These systems should not only allow imaging of subcellular localization of endogenous RNA but also to build up tailor-made artificial RNPs.



## IV. Zusammenfassung

Die Visualisierung von RNAs in lebenden Zellen ist sehr bedeutend für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation, der Strukturveränderungen sowie der Prozessierung von RNA. Insbesondere die Verfolgung der Dynamiken und Transportprozesse subzellulär lokalisierter mRNAs, könnte dazu beitragen, die Rolle dieser mRNAs bei der Entstehung neuronaler Fehlregulationen oder Krebs besser zu verstehen. Die Entwicklung genetisch kodierbarer Sonden zur Detektion endogener RNA ist von großer Bedeutung, da die natürlichen Prozesse in der Zelle nicht durch das Einbringen der Sonden von außen gestört werden.

Für die Entwicklung einer vollständig proteinbasierten Sonde zur sequenzspezifischen Detektion von RNA, wurde im Rahmen dieser Arbeit das RNA-bindende Protein Pumilio rekombinant produziert, gereinigt und charakterisiert. Die RNA-Detektionsmethode der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung (TetFC), die auf Pumilio und einem dreiteiligen *split*-GFP beruht, wurde bezüglich einer *in vivo* Anwendung charakterisiert. Dabei wurde eine negative Temperaturabhängigkeit und eine Nachweisgrenze von 16 nM in Anwesenheit kompetierender RNA bestimmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TetFC *in vivo* realisierbar ist. Des Weiteren wurde mit der TetFC die Ausbildung einer Stamm-Schleife-Struktur mit einem 5-fachen Signalanstieg nachgewiesen. Darüber hinaus wurde der Unterschied in der Struktur zweier RNAs aufgezeigt, welche sich in ihrer Sequenz lediglich durch zwei Nukleotide unterscheiden. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für zukünftige intrazelluläre RNA-Strukturanalysen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anzahl möglicher RNA-Targets der TetFC durch die Entwicklung der Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung erweitert. Die Verwendung kurzer einzelsträngiger Staple-RNAs, sowie einer neuen Pumilio-Variante stimulierte dabei erfolgreich die Fluoreszenzkomplementierung an Target-RNA, die nur ein oder gar kein Pumilio-Bindemotiv enthält. Mit einem 25-fachen Signalanstieg konnte bei Verwendung einer Staple-RNA die L1 mRNA *in vitro* detektiert werden. Mit Hilfe zweier Staple-RNAs konnten gespleißte und ungespleißte HIV-RNAs unabhängig von der Sequenzspezifität des Pumilio-Proteins *in vitro* unterschieden werden.

Die Etablierung einer neuen Screening-Strategie für Pumilio-Varianten mit veränderten Bindungseigenschaften war nicht erfolgreich, da die (in der Literatur beschriebene) RNA-Abhängigkeit der Interaktion des Pumilios mit dem Protein Nanos nicht bestätigt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit die Grundlagen zur Pumilio-basierten sequenzspezifischen Detektion endogener RNA *in vivo* mittels TetFC und RNP-FC gelegt wurden. Diese Methoden sollten es ermöglichen, nicht nur die subzelluläre Lokalisation endogener RNA zu verfolgen sondern auch maßgeschneiderte RNPs aufzubauen.



## V. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 RNA-Detektion mittels proteinbasierter Sonden und Fluoreszenzreportern.....	10
Abbildung 1.2 RNA-Detektion mittels Fluoreszenzkomplementierung.....	11
Abbildung 1.3 RNA-Detektion mittels proteinbasierter Sonden und <i>guide</i> -Nukleinsäuren.....	14
Abbildung 1.4 Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung.....	15
Abbildung 1.5 Verteilung der Proteine Nos, Pum und Hunchback im <i>Drosophila</i> Embryo.....	18
Abbildung 1.6 Sequenzspezifische RNA-Bindung der humanen Pum-HD.....	20
Abbildung 3.1 Reinigung des Pumilio-wt Proteins.....	30
Abbildung 3.2 Strukturanalyse von Pum-wt mittels CD-Spektroskopie.....	31
Abbildung 3.3 Spezifische Bindung von Pumilio-wt an boxA RNA.....	32
Abbildung 3.4 Einfluss verschiedener Puffer auf die Bindung von Pum-wt.....	33
Abbildung 3.5 Bindungsstudien von Pumilio-wt mit 2'-Desoxy-2'-fluorpyrimidin-RNA.....	34
Abbildung 3.6 Temperaturabhängigkeit der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung.....	36
Abbildung 3.7 Temperaturabhängigkeit der Proteinkomplementierung.....	37
Abbildung 3.8 Spezifische RNA-Detektion in Anwesenheit kompetierender RNA.....	38
Abbildung 3.9 Nachweis <i>in vivo</i> produzierter boxAB RNA mittels TetFC.....	39
Abbildung 3.10 Nachweis <i>in vivo</i> produzierter Hb-boxAB RNA mittels TetFC.....	40
Abbildung 3.11 Schema des Nachweises einer Stamm-Schleife-Struktur.....	43
Abbildung 3.12 Nachweis der Ausbildung einer Stamm-Schleife-Struktur mittels TetFC.....	44
Abbildung 3.13 Nachweis temperaturinduzierter RNA-Strukturveränderungen.....	46
Abbildung 3.14 Nachweis metabolitinduzierter Veränderungen der RNA-Struktur.....	48
Abbildung 3.15 Nachweis SAM-induzierter Strukturveränderungen von RNA mittels TetFC.....	49
Abbildung 3.16 Vorhergesagte Sekundärstrukturen der boxA-SR1-B und boxA-SR2-B RNAs.....	49
Abbildung 3.17 Konzept der RNP-FC zur Detektion der boxAC RNA.....	52
Abbildung 3.18 Nachweis der boxAC RNA mittels RNP-FC.....	53
Abbildung 3.19 Zeitabhängigkeit der RNA-Detektion mittels RNP-FC.....	53
Abbildung 3.20 Protein-Engineering einer Pumilio-Variante spezifisch für boxL.....	55
Abbildung 3.21 Reinigung und Charakterisierung der neuen Pumilio-Variante Pum-Var2.....	56
Abbildung 3.22 Sequenzspezifische Bindung von Pum-Var2 an boxL.....	57
Abbildung 3.23 Sequenzspezifische Bindung von Pum-Var2 an längere RNAs mit boxL-Motiv... ..	57
Abbildung 3.24 Bindungsstudien von Pum-wt und MUT3-2 mit boxL.....	58
Abbildung 3.25 Prinzip der RNP-FC zur Detektion der L1 RNA.....	59
Abbildung 3.26 Bindungsstudien der Pumilio-Proteine für RNP-FC.....	60
Abbildung 3.27 Sequenzspezifische Detektion der L1 RNA mittels RNP-FC.....	61
Abbildung 3.28 Bildung der Proteinkomplexe aus Pumilio und rekonstituiertem GFP.....	62
Abbildung 3.29 Detektion der boxLI RNA in Anwesenheit kompetierender RNA.....	63

Abbildung 3.30 Nachweis <i>in vivo</i> hergestellter L1 mRNA.....	64
Abbildung 3.31 Vereinfachte Darstellung des HIV-Infektionszyklusses.....	65
Abbildung 3.32 Detektion gespleißter und ungespleißter HIV-RNA mittels RNP-FC.....	66
Abbildung 3.33 Unterscheidung gespleißter und ungespleißter HIV RNA mittels RNP-FC.....	67
Abbildung 3.34 Einfluss der Staple RNAs auf die RNP-FC zur Detektion der HIV-RNA.....	68
Abbildung 3.35 Einfluss der Staple-RNA Konzentration auf die RNP-FC.....	69
Abbildung 3.36 Einfluss der Target-RNA Konzentration auf die RNP-FC mit zwei Staples.....	70
Abbildung 3.37 Screening-Schema basierend auf Fluoreszenzpolarisation.....	72
Abbildung 3.38 Herstellung der Pumilio-Variante Pum-wt <sup>ΔGPH</sup> .....	73
Abbildung 3.39 Bindungsstudien der Variante Pumilio-wt <sup>ΔGPH</sup> .....	74
Abbildung 3.40 Reinigung von TC-Nos aus Einschlusskörperchen.....	75
Abbildung 3.41 Rückfaltung von TC-Nos auf Nickel-NTA-Agarose-Beads.....	76
Abbildung 3.42 Produktion und Reinigung TC-Nos aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	77
Abbildung 3.43 Etablierung der Fluoreszenzmarkierung von TC-Nos mit FLAsH.....	78
Abbildung 3.44 Spezifische Fluoreszenzmarkierung von TC-Nos mit FLAsH.....	79
Abbildung 3.45 Interaktion von Pum-wt <sup>ΔGPH</sup> mit gefaltetem TC-Nos.....	80
Abbildung 3.46 Reinigung des Proteins GST-Nos und TEV-Spaltung.....	83
Abbildung 3.47 RNA-Abhängigkeit der Interaktion von Pum-wt und Pum-wt <sup>ΔGPH</sup> mit GST-Nos..	84

# 1. Einleitung

## 1.1. Bedeutung von RNA-Detektionsmethoden

Lokalisation, Dynamik und Regulation von RNA werden immer wichtiger für unser Verständnis der Genexpression und RNA-Viruspathogenese. Ein verbessertes Verständnis dieser Prozesse ist notwendig, um Genexpressionsnetzwerke zu erstellen oder neue Ziele für die medizinische Behandlung zu finden. Neben RNA-Synthese, -Prozessierung oder -Abbau steht die Verfolgung der Dynamiken und des Transports in lebenden Zellen im Vordergrund. Einen Hauptgrund für dieses verstärkte Interesse stellt die subzelluläre Lokalisation von mRNAs dar, welche eine Schlüsselrolle in der post-transkriptionalen Genregulation spielt. Die Basis dieser Regulation stellt die Direktion der mRNA an den Bestimmungsort der Proteine dar.<sup>1-3</sup> In den letzten Jahren ist bekannt geworden, dass diese Art der Regulation keine Ausnahme, sondern einen Regelfall darstellt und die subzelluläre mRNA-Lokalisation weit verbreitet ist.<sup>4-9</sup> Besonders in Neuronen spielt die subzelluläre mRNA-Lokalisation eine wichtige Rolle bei der räumlichen und zeitlichen Genregulation und bildet die Grundlage für die neuronale Plastizität, das Lernen und die Ausbildung des Gedächtnisses.<sup>10-15</sup>

Bei der Entwicklung neuer Methoden zum RNA-Nachweis liegt das Hauptinteresse auf der räumlichen und zeitlichen Verfolgung der subzellulären Lokalisation in lebenden Zellen. Denn um nur zu bestimmen, in welchen Bereichen der Zelle bestimmte RNAs zu definierten Zeitpunkten vorliegen, können etablierte Methoden wie Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) verwendet werden, welche fixierte Zellen benutzen.

Der Vorgang der subzellulären Lokalisation wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert, (i) die lokale Transkription, (ii) die Degradierung bzw. Stabilisierung der mRNAs in bestimmten Bereichen, (iii) die Verankerung diffundierender mRNAs an bestimmte Proteine und (iv) der aktive Transport entlang von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten. Dabei stellt die lokale Transkription den am seltensten vorkommenden Mechanismus dar, welcher hauptsächlich in mehrkernigen Zellen auftritt und in Muskelfasern von Wirbeltieren oder in *Drosophila* Embryos beobachtet wurde.<sup>16-19</sup> Die Regulation der mRNA-Lokalisation über ortsgebundene Degradierung bzw. Stabilisierung ist ebenfalls wenig verbreitet und wurde in der Entwicklung von *Drosophila* Embryos beispielsweise für *nanos* und *hsp38* mRNA beobachtet.<sup>20,21</sup> Ebenfalls in *Drosophila* wurde beobachtet, dass diffundierende mRNAs während der Oogenese durch die Interaktion mit bestimmten Proteinen an die Translationsstelle verankert werden.<sup>2,22</sup> Auch in der Oogenese von *Xenopus* wird dieser Mechanismus zur subzellulären Lokalisation von mRNAs wie *Xcat2* oder *Xdaz1*, verwendet.<sup>6,23</sup>

Diese drei Regulationsprozesse sind aber nicht geeignet, um RNA schnell und gerichtet an ihren Bestimmungsort zu bringen, besonders wenn große Distanzen überwunden werden müssen. Aus diesem Grund ist der meist verbreitete Weg zur RNA-Lokalisation der aktive Transport von mRNAs entlang des Cytoskeletts. Dieser Regulationsweg beruht auf der Erkennung und Bindung von *cis*-agierenden Bereichen im 3'-UTR der mRNAs durch *trans*-agierende RNA-bindende Proteine (RBP) und deren Einbindung in Ribonukleoproteinpartikel.<sup>8</sup> Eine Besonderheit weisen dabei Hefen auf, bei denen Lokalisationselemente ebenfalls in der kodierenden Sequenz der mRNA zu finden sind.<sup>24</sup> Diese Ribonukleoproteinpartikel assoziieren mit molekularen Motoren und weisen eine komplexe und dynamische Zusammensetzung auf.<sup>1</sup> Zum aktiven Transport der Partikel werden diese entweder von Dynein oder Kinesin entlang der Mikrotubuli oder anhand von Myosin entlang der Aktinfilamente bewegt.<sup>25</sup> Dieser aktive Transport wurde in *Drosophila* während der Oogenese und der Embryonalentwicklung beobachtet.<sup>26-36</sup> Auch in *S. cerevisiae* wurde dieser Mechanismus während der Zellteilung dokumentiert, wo mehr als 30 mRNAs aktiv zur Knospungsspitze transportiert werden.<sup>37,38</sup> In *Xenopus* tritt der aktive Transport von RNA ebenfalls während der Oogenese auf, wo beispielsweise die *Vgh1* mRNA über Kinesin-1 entlang der Mikrotubuli transportiert wird.<sup>6,39</sup> Auch in Pilzpathogenen wie *Ustilago maydis* werden mRNPs zur RNA-Lokalisation entlang von Mikrotubuli transportiert.<sup>40,41</sup>

Aber nicht nur in diesen Organismen sondern auch in migrierenden Säugerzellen wurde der Mechanismus des aktiven Transports für viele Transkripte beobachtet.<sup>4</sup> Das am besten charakterisierte Beispiel ist die  $\beta$ -Aktin mRNA, deren Lokalisation an den Wachstumskegeln von Fibroblasten für die korrekte Orientierung der Zellmigration notwendig ist.<sup>42</sup> Die  $\beta$ -Aktin mRNA wird an einem *cis*-agierenden Element, dem *zip code*, durch das ZBP1 (*zip code binding protein*) gebunden und entlang der Aktinfilamente<sup>42-44</sup> aber auch zu einem großen Teil entlang der Mikrotubuli über Myosin II-B transportiert.<sup>45</sup> Besonders in Dendriten finden sich verschiedene RNA-beihaltende Partikel, die an der Regulation des Transports und der Translation beteiligt sind.<sup>46,47</sup> Um eine zeitliche Regulation der Genexpression gewährleisten zu können, wird die Translation in den Transportpartikeln unterdrückt. Dies geschieht durch die Interaktion der RNA mit *trans*-agierenden Proteinen, zumeist eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren, deren Rekrutierung und Interaktion mit anderen Repressoren die Ausbildung des Initiationskomplexes verhindert.<sup>48-53</sup> Diese Art der Translationsunterdrückung ermöglicht es auch, zwischen verschiedenen mRNAs zu unterscheiden und deren Translation separat anzuschalten. So unterdrückt zum Beispiel das Protein Cyfip1, ein eIF4E-Protein in Säugerzellen, die Translation des *fragile-X-syndrome* Proteins (FRMP).<sup>49</sup> Auch die Bindung anderer Proteine, wie ZBP1 an die  $\beta$ -Aktin mRNA führt zu deren Translationsinhibierung.<sup>54</sup> Andere *trans*-agierende Faktoren, welche die Translation regulieren sind CPEBPs (*cytoplasmic polyadenylation element binding proteins*),<sup>55,56</sup> deren Bindung eine Translationsinhibierung auslösen, welche wiederum durch Phosphorylierung des Proteins ausgeschaltet werden kann.<sup>57-61</sup> CPEB-Proteine

inhibieren die Translation hauptsächlich durch die Kontrolle der Polyadenylierung,<sup>57-59</sup> können aber auch auf Poly(A)-unabhängigem Wege agieren.<sup>56</sup> Die Initiation der Translation erfolgt dann durch die Dissoziation dieser RBPs von den mRNAs, welche durch Verdrängung oder Phosphorylierung veranlasst wird.<sup>51,56,62</sup> Im Anschluss können Polysomen binden und die Proteine an ihrem Bestimmungsort synthetisieren.<sup>63</sup> Um eine Translation weit ab von dem typischen Ort der Proteinsynthese zu gewährleisten, müssen sich in der Nähe der subzellulär lokalisierten mRNAs weitere Faktoren, wie Ribosomen, befinden. In der Tat wurde gezeigt, dass sich an den Wachstumskegeln der Axone sowie an den Synapsen und den Wachstumskegeln von Fibroblasten Proteine der Translationsmaschinerie, wie Ribosomen oder Initiationsfaktoren, befinden.<sup>64-71</sup> Auch konnte die Bewegung der Ribosomen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden.<sup>72</sup> In anderen Studien wurden Polysomen in den Transportpartikeln nachgewiesen<sup>73,74</sup> und es wurde gezeigt, dass sie in Fibroblasten mit Aktin assoziiert sind.<sup>75</sup> In Pilzpathogenen wurde beobachtet, dass mRNAs mittels *endosomal trafficking* transportiert und gleichzeitig translatiert werden.<sup>24</sup>

Die subzelluläre Lokalisation von mRNAs spielt eine wichtige Rolle, um die Genexpression zeitlich und räumlich zu regulieren. Deren Fehlregulation hat oft schwerwiegende Folgen und kann unter anderem zu neuronalen Erkrankungen oder Krebs führen.<sup>76,77</sup> Die Untersuchung der Dynamiken und Transportprozesse der mRNA könnte helfen, deren Rolle für die Entstehung vieler Erkrankungen zu verstehen. Aus diesem Grund wurden bereits verschiedene Methoden zum Nachweis von mRNAs entwickelt, welche im folgenden Kapitel zusammengefasst werden (1.2).

## 1.2. Methoden zum Nachweis von RNA in Zellen

Um Einblick in Prozesse wie Synthese, Prozessierung oder Transport von RNAs zu erhalten, und die subzelluläre RNA-Lokalisation zu verfolgen, können verschiedene Detektionsmethoden angewandt werden. Neben Methoden, um Momentaufnahmen der RNA in fixierten Zellen zu erlangen, gibt es eine Reihe von Verfahren zur Verfolgung der RNA in lebenden Zellen. Diese bedienen sich verschiedener Sonden, welche in die Gruppen der nukleinsäurebasierten und proteinbasierten Sonden unterteilt werden können. Im Idealfall möchte man eine Sonde nutzen, die (i) endogene RNA detektiert, (ii) spezifisch an ihr Target bindet und (iii) wenig Hintergrundfluoreszenz aufweist, (iv) möglichst klein ist und (v) genutzt werden kann, um den RNA-Transport zu verfolgen, sowie (vi) in der Zelle hergestellt oder leicht eingebracht werden kann und (vii) es erlaubt Einzelmolekülsensitivität zu erreichen. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die verschiedenen Methoden zum RNA-Nachweis in Zellen gegeben und auf deren Vor- bzw. Nachteile eingegangen.

### 1.2.1. Nachweis von RNA mittels nukleinsäurebasierter Sonden

Für Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von mRNA in fixierten Zellen stand als erste Methode die *in situ* Hybridisierung (ISH) zur Verfügung.<sup>78</sup> Bei dieser Methode wird die zu untersuchende mRNA nach Hybridisierung von komplementärer Nukleotidsonden autoradiographisch oder antikörpervermittelt nachgewiesen.<sup>79,80</sup> Die Einführung von Fluoreszenzreportern erlaubte zusätzlich das Multiplexing verschiedener RNAs und die Co-Visualisierung von RNA und fluoreszenzmarkierten Proteinen.<sup>81</sup> Neben fluoreszenzmarkierten Sonden gibt es auch die Möglichkeit die Sonde über Gold mittels Elektronenmikroskopie nachzuweisen, wobei die Sonde entweder direkt mit Gold markiert oder über einen Goldgekoppelten Antikörper nachgewiesen wird.<sup>35,82-85</sup>

Die Methode der ISH wurde erfolgreich in vielen Organismen angewandt und erfolgt besonders zuverlässig in Gewebekulturzellen.<sup>86,87</sup> Durch den Einsatz einer quantitativen Fluoreszenzdetektion oder die Anwendung mehrerer Oligonukleotidsonden war sogar der Nachweis einzelner Moleküle möglich.<sup>88-90</sup> Die ISH weist aber auch einige Nachteile auf. So sind histochemische Färbemethoden nur semi-quantitativ, da das Signal oft stark variiert und nicht linear zur Menge an RNA ansteigt.<sup>91</sup> Außerdem traten bei der ISH gerade in neuronalem Gewebe Probleme mit der Penetration und Signalamplifikation auf.<sup>92</sup> Das Hauptproblem der ISH stellt aber die Beschränkung auf fixierte Zellen dar. So kann durch die ISH zwar die Verteilung einer RNA nachgewiesen werden, nicht aber deren Dynamiken, Transport oder Synthese in lebenden Zellen. Aus diesem Grund wurden mehrere Methoden entwickelt, die es erlauben, RNA in lebenden Zellen nachzuweisen. Erste Experimente dahingehend wurden bereits im Jahr 1972 von Miller *et al.* durchgeführt, denen es möglich war, RNA innerhalb lebender Zellen zu

markieren, indem sie den Zellen fluoreszenzmarkierte Nukleotide zur Verfügung stellten.<sup>93</sup> Bei dieser Methode wurden aber alle RNAs einer Zelle markiert, wodurch es nicht möglich war, bestimmte RNAs zu verfolgen. Aus diesem Grund folgten mehrere Ansätze, um die RNAs außerhalb der Zelle zu markieren und dann in die Zelle einzubringen.<sup>33,94-100</sup> Das Einbringen der RNA, welches oft mittels Mikroinjektion erfolgt, kann aber potentiell schädigend für die Zellen sein und zu unnatürlichen Lokalisations- oder Expressionsmustern führen.<sup>101</sup> Deshalb ist man dazu übergegangen endogene RNA mittels nukleinsäurebindender Farbstoffe<sup>102</sup> oder Hybridisierung markierter linearer Oligonukleotidsonden nachzuweisen. Die Bandbreite der linearen Oligonukleotidsonden umfasst unter anderem einfach markierte lineare Nukleotidsonden,<sup>103,104</sup> 2'-O-Methyl-RNA-Sonden<sup>105</sup> und Kombinationen mehrerer linearer fluoreszenzmarkierter Sonden, welche nebeneinander hybridisieren und dadurch ein FRET-Signal auslösen.<sup>106-109</sup> Trotz der Erfolge mittels FRET stellt das Hauptproblem der linearen Nukleotidsonden die hohe Hintergrundfluoreszenz dar, welche dadurch entsteht, dass die Sonden permanent fluoreszieren und es keine Möglichkeit gibt, ungebundene Sonden zu entfernen. Aus diesem Grund wurden die *molecular beacons* (MBs) entworfen, die aus einem Oligonukleotid bestehen, welches an den freien Enden je mit einem Fluoreszenzfarbstoff bzw. einem Quencher markiert ist. Im ungebundenen Zustand bildet dieses Oligonukleotid eine Stamm-Schleife-Struktur aus, wodurch Quencher und Farbstoff in räumliche Nähe gebracht werden, so dass eine Fluoreszenzemission verhindert wird. Erst die Hybridisierung mit der Target-RNA bedingt das Aufschmelzen des Stamms und erlaubt die Fluoreszenzemission des Farbstoffes.<sup>110</sup> Die MBs wurden erfolgreich verwendet um RNA in lebenden Zellen zu detektieren und ebenfalls in Kombination mit FRET eingesetzt.<sup>105,111-115</sup> Die MBs weisen aber den Nachteil auf, dass sie durch unspezifische Öffnung ein hohes Hintergrundsignal auslösen und zu unspezifischen Signalen führen können.<sup>104,116,117</sup> Des Weiteren konnte Einzelmolekülsensitivität über MBs nur erreicht werden, wenn 96 Bindestellen in ein RNA-Molekül eingebracht wurden.<sup>118</sup> Durch das Einbringen photolabiler „*caging*“ Gruppen konnten MBs entworfen werden, deren Bindung an die Target-RNA erst durch Aktivierung mit Licht induziert wird.<sup>119</sup> Diese Technik verspricht reduzierte Hintergrundfluoreszenz und Einzelmolekülsensitivität.

Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden ebenfalls die *multiply labeled tetravalent RNA imaging probes* (MTRIP) entwickelt. Durch das Anfügen mehrerer fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonden an einen Liganden konnte zum ersten Mal Einzelmolekülsensitivität erreicht werden.<sup>113,120</sup> Dabei wurden an ein Streptavidin vier fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden gekoppelt, die jeweils an einen anderen Teil der Target-RNA binden. Findet nun eine Hybridisierung eines der vier Oligonukleotide statt, so werden die anderen drei Farbstoffe ebenfalls an die RNA gebracht. Durch die Bindung an verschiedene Bereiche der RNA wird das Signal zusätzlich verstärkt. Diese Erhöhung der Sensitivität machte es möglich, dass lediglich zwei MTRIPs benötigt wurden, um Einzelmolekülsensitivität zu erreichen. Dies brachte

den weiteren Vorteil mit sich, dass das Molekulargewicht der Sonde relativ klein gehalten werden kann und somit wahrscheinlich den natürlichen Transport der RNA nicht stört.<sup>121</sup> Trotz dieser Fortschritte im Bereich der Sensitivität und Größe weisen die MTRIPs jedoch noch das Problem der dauerhaften Fluoreszenz auf. Um die Fluoreszenz der Sonde kontrollieren zu können, wurden deshalb die *caged fluorescent nucleotides* eingesetzt. Durch den Einbau des Fluorophors in eine photolabile Gruppe konnte die Fluoreszenzemission gezielt in bestimmten Bereichen der Zelle eingeschaltet und verfolgt werden.<sup>122</sup>

Weitere Verfahren um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, verwenden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden, deren Fluoreszenz vor der Hybridisierung an RNA unterdrückt wird. Diese Sonden basieren auf der Verwendung von Thiazol-Orange (TO)-markierten Nucleosiden, welche in die Nucleotidsonde eingebaut werden. So wurden beispielsweise doppelt markierte TO-Nucleoside in ECHO-Sonden (*exciton-controlled hybridization-sensitive oligonucleotide*) eingebaut, was zu einer Unterdrückung der Fluoreszenzemission des Farbstoffes führte. Erst die Hybridisierung der Sonde an komplementäre RNA und die Interkalation des Farbstoffes in die RNA führte zur Fluoreszenzemission.<sup>123-126</sup> Basierend auf einem ähnlichen Prinzip wurden die FIT (*forced intercalation*)-Sonden entwickelt, welche einen TO-Interkalator enthalten, der als artifizielle Nucleobase fungiert.<sup>127,128</sup> Das TO in den Sonden reagiert auf lokale Strukturveränderungen und interkaliert nach Hybridisierung an die Target-RNA, was zur Entstehung eines Fluoreszenzsignals führt und die Sonde für die RNA-Visualisierung in lebenden Zellen geeignet macht.<sup>127,128</sup> In diesen Sonden vermittelt ein PNA (Peptidnucleinsäure)-Rückgrat eine erhöhte Duplex- sowie Bio-Stabilität. Kürzlich wurde eine weitere Signalerhöhung von FIT-DNA Sonden durch die Kombination des TOs mit einem Oxazolopyridin-Analogon (JO) erreicht.<sup>129</sup>

Das Hauptproblem der genannten fluoreszenzmarkierten Nucleinsäuresonden liegt aber in der Aufnahme durch die Zelle. Da die Zelle nicht in der Lage ist, gezielt fluoreszenzmarkierte Nucleinsäuren herzustellen und diese negativ geladenen hydrophilen Makromoleküle von den Zellen normalerweise nicht spontan aufgenommen werden, müssen sie eingeschleust werden.<sup>130</sup> Um Oligonukleotidsonden in die Zellen zu bringen, wurden verschiedene Methoden verwendet, wie Zellpermeabilisierung<sup>131-133</sup> zellpenetrierende Peptide,<sup>120,134</sup> Injektion<sup>112,118,135-137</sup> oder Verwendung von Streptolysin O (SLO).<sup>111,113-115,120,138-140</sup> Alle diese Methoden weisen aber gewisse Limitierungen auf. Die Mikroinjektion kann schädigend für die Zelle sein und erfordert spezielles und teures Equipment sowie hinreichende Expertise.<sup>121</sup> Die Methode der Elektroporation kann nur auf nicht-adhärente oder trypsinierte Zellen angewandt werden<sup>133</sup> und bei der Verwendung von SLO ist die Größe des Moleküls auf 30-40 nm begrenzt und die Anzahl der aufgenommenen Moleküle ebenfalls limitiert.<sup>121</sup> Des Weiteren werden die Proben oft in den Kern transportiert, wo sie nicht mehr zur Verfügung stehen.<sup>116,118,136,137</sup> Das Problem des

Transports in die Zellen wurde kürzlich umgangen, indem ein MB über einen photospaltbaren Linker mit einem Nukleolin-Aptamer hybridisiert wurde.<sup>141</sup> Nach Bindung an den Zelloberflächenrezeptor über die Aptamerdomäne wurde das Molekül in die Zelle internalisiert. Im Anschluss führte die kontrollierte Spaltung des Linkers zur Freisetzung des MBs.<sup>141</sup> Diese aptamerbasierte Internalisierungsstrategie hat nicht nur den Vorteil der selbst-induzierten Internalisierung und der Photoaktivierbarkeit sondern kann ebenfalls genutzt werden, um bestimmte Zelltypen anzusteuern. Ein weiterer Ansatz zur Umgehung des Problems der Aufnahme wurde von Waki *et al.* vorgestellt. Um die Membrangängigkeit von Oligonukleotidsonden zu erhöhen, wurden Bispyren-modifizierte 2'-O-Methyl-RNAs verwendet, bei denen das Phosphodiesterückgrat durch einen Phosphothioatlinker ersetzt wurde, welcher die Membranpermeabilität und Nukleaseresistenz erhöhte.<sup>142</sup>

Trotz der Erfolge hinsichtlich der Internalisierung mittels Aptameren oder der Erhöhung der Membrangängigkeit, stellt die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide in die Zellen immer noch die größte Herausforderung für die Anwendung von nukleinsäurebasierten Sonden dar. Deshalb wurden Strategien entwickelt, welche RNAs gezielt in der Zelle mit Fluorophoren versehen. Einige dieser Methoden werden im Folgenden vorgestellt

Eine neuartige Strategie zur Detektion endogener RNA stellt das sogenannte *spinach*-Aptamer da, welches von Paige *et al.* entwickelt wurde.<sup>143</sup> Dieses Aptamer bindet an ein GFP-ähnliches Fluorophor (DFHBI) und induziert dadurch dessen Fluoreszenz im grünen Bereich. Durch das Anfügen des Aptamers an die zu untersuchende RNA und die Bereitstellung des membrangängigen Fluorophors, war es möglich, RNA in Säugerzellen nachzuweisen.<sup>143</sup> Durch eine Optimierung der Sequenz konnte kürzlich eine thermostabile Variante des Aptamers erhalten werden, welche das Signal zu Rausch Verhältnis zur RNA-Visualisierung in Säuger- und Bakterienzellen noch verbesserte.<sup>144</sup> Eine ähnliche Strategie wurde kürzlich von Sunbul *et al.* entwickelt, die RNA in Bakterien nachweisen konnten, indem sie ein fluorophorbindendes Aptamer an die RNA fusionierten. Der Einsatz eines Konjugats aus Fluorophor und Quencher erlaubte das Aptamer-bedingte Anschalten des Fluoreszenzsignals.<sup>145</sup>

Einen weiteren Ansatz zur Detektion nativer RNA stellt die intrazelluläre chemo-enzymatische Modifizierung von RNA dar. Bei dieser Strategie soll die RNA in einem ersten Schritt durch ein intrazellulär produziertes Enzym mit einer reaktiven Gruppe versehen werden, welche im Anschluss durch eine bioorthogonale chemische Reaktion mit einem Reportermolekül gekoppelt werden soll. Mit Hilfe von Methyltransferasen konnten bereits erste Erfolge erzielt werden, um *in vitro* tRNA bzw. mRNA an ihrer 5'-Kappe mit reaktiven Gruppen zu versehen, welche im Anschluss chemisch fluoreszenzmarkiert werden konnten.<sup>146-148</sup> Unter Verwendung von Methyltransferasen und *guide*-RNAs war es auch möglich, tRNA und prä-mRNA

sequenzspezifisch *in vitro* zu modifizieren.<sup>149</sup> Trotz der Möglichkeit, die RNA-modifizierenden Enzyme genetisch zu kodieren, wird eine extrazelluläre Bereitstellung der fluoreszierenden Moleküle benötigt. Des Weiteren wurde eine sequenzspezifische Markierung für mRNAs zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben und die Anwendung der chemo-enzymatischen Modifizierung in Zellen stellt noch eine große Herausforderung dar.<sup>147</sup>

Da die vorgestellten Detektionsmethoden eine Veränderung der natürlichen RNA-Sequenz oder die Bereitstellung eines externen Fluorophors benötigen, liegt der Fokus dieser Arbeit auf proteinbasierten Sonden, welche im nächsten Kapitel vorgestellt werden.

## 1.2.2. Proteinbasierte Sonden zur RNA-Detektion

Proteinbasierte Sonden zur RNA-Detektion weisen den Vorteil auf, dass sie genetisch kodierbar sind und eingesetzt werden können, um intrazellulär produzierte RNAs nachweisen zu können. Diese Sonden sind zumeist Fusionsproteine aus RNA-bindenden Proteinen und fluoreszierenden Reporterproteinen. Mit Hilfe dieser proteinbasierten Sonden konnten bereits viele Erfolge hinsichtlich der RNA-Visualisierung in lebenden Zellen erlangt werden. In den folgenden Kapiteln werden diese Strategien zusammengefasst, wobei zunächst auf die proteinbasierten Sonden eingegangen wird, welche einen RNA-Nachweis mittels Fluoreszenz erlauben, aber kein einschaltbares Signal aufweisen. Im zweiten Abschnitt wird auf die Sonden eingegangen, welche ein Einschalten des Signals durch Proteinfragmentkomplementierung erlauben.

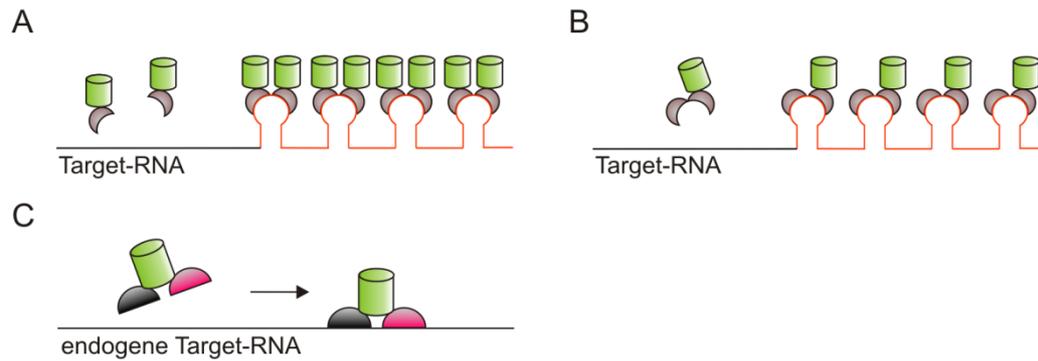
### 1.2.2.1. Permanent fluoreszierende proteinbasierte Sonden

Der erste große Durchbruch für die RNA-Detektion mittels proteinbasierter Sonden erfolgte im Jahre 1998 durch Bertrand *et al.*<sup>150</sup> Diese Gruppe nutzte die RNA-bindende Eigenschaft des *coat protein* des Phagen MS2, genannt MS2-CP,<sup>151,152</sup> um den Transport der *ASH1* mRNA in sich teilenden Hefezellen nachzuweisen. Durch das 6-malige Anfügen der 19-nt Zielsequenz des MS2-CP an die *ASH1* mRNA und die Fusionierung des Proteins mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) konnte die Lokalisation und der Transport der RNA mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden (siehe Abbildung 1.1 A).<sup>150</sup> An das MS2-CP-GFP Fusionsprotein wurde ein Kernlokalisierungssignal (NLS) angefügt, welches dazu führte, dass ungebundenes Protein in den Kern transportiert und das Hintergrundsignal reduziert wurde. Da das MS2-CP mit einem  $K_D$  von 5 nM an die RNA bindet und der RNA-Protein-Komplex sehr stabil ist,<sup>153</sup> konnte der Transport der RNA verfolgt werden. Im Jahr 2003 gelang es Fusco *et al.* durch das Anfügen von 24 MS2-Bindestellen (MS2-BS) an die  $\beta$ -Aktin mRNA einzelne RNA-Partikel in Säugerzellen zu verfolgen.<sup>44</sup> Da MS2-CP als Dimer bindet, wurden somit maximal 48 GFPs an eine RNA dirigiert. Golding *et al.* benötigten sogar 96 MS2-CP-Bindestellen, um Dynamiken einzelner RNA-Partikel in Bakterien zu bestimmen, da sie fusionierte Dimere des MS2-CPs verwendeten, welche jeweils mit nur einem GFP versehen waren.<sup>154</sup> Mit Hilfe ähnlicher Tandemproteine konnten Wu *et al.*

2012 ebenfalls einzelne RNAs in lebenden Zellen mittels *fluorescence fluctuation spectroscopy* bestimmen (siehe Abbildung 1.1 B).<sup>155</sup> Ein großer Nachteil dieser Methoden ist der Eingriff in das natürliche System. Zum einen wird die RNA überproduziert und mit langen Nukleotidsequenzen versehen (24x MS2-BS entspricht ca. 456 nt), zum anderen binden relativ große Fusionsproteine an die RNA, welche das Transportverhalten der RNA stören könnten. Um dies zu umgehen, wurde im Jahr 2007 von Daigle *et al.* anstelle des MS2-CP das  $\lambda_{N22}$ -Peptid verwendet, welches aus nur 22 Aminosäuren besteht und mit einem  $K_D$  von 22 nM an das 15 nt BoxB-Motif bindet.<sup>156</sup> Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus vier  $\lambda_{N22}$ -Peptiden, drei GFPs und einem NLS war es möglich, in Zellen RNA-Moleküle zu visualisieren, welche nur vier BoxB-Motive trugen und demnach nur um 60 nt verlängert wurden.<sup>156</sup>

Neben dem  $\lambda_{N22}$ -Peptid wurde das proteinbasierte System der RNA-Detektion seit der Entdeckung auch auf andere RNA-bindende Proteine ausgeweitet, wie zum Beispiel auf das Hüllprotein des Phagen PP7.<sup>155,157,158</sup> Auch eine simultane Detektion verschiedener RNAs unter Verwendung mehrerer Sonden- und Reporterproteine war möglich.<sup>155,157,159-164</sup> Dabei war es möglich die Transkriptionsinitiation sowie -elongation zu verfolgen<sup>158</sup> und einzelne Allele zu untersuchen.<sup>157</sup> Die Methode des RNA-Nachweises mittels RNA-bindender Proteine und fluoreszierender Reporter wurde in verschiedenen Zelltypen angewandt<sup>22,44,150,154,165-168</sup> und ermöglichte Einzelallel-Analysen auch in Säugerzellen<sup>169</sup> und die Verfolgung der Transkription sowohl in Amöben<sup>167</sup> und Säugerzellen.<sup>160,170,171</sup> Des Weiteren konnten virale RNA und einzelne Virions in Säugerzellen<sup>159,162,164</sup> sowie virale RNAs und pri-miRNAs in Pflanzen nachgewiesen werden.<sup>172-175</sup> Die MS2-basierte RNA-Nachweismethode konnte unter Verwendung von Pflanzen<sup>173-176</sup> und einer transgenen Maus<sup>177</sup> genutzt werden, um mRNA in lebenden Organismen zu verfolgen, sogar mit Einzelmolekülsensitivität.<sup>178</sup> Im Jahr 2012 gelang es Yoshimura *et al.* mittels eines Fusionsproteins aus einem GFP und zwei RNA-bindenden Proteinen Pumilio endogene  $\beta$ -Aktin mRNA sequenzspezifisch in Säugerzellen zu detektieren (siehe Abbildung 1.1 C).<sup>179</sup>

Neben dem Nachweis von RNA wurden die Fusionsproteine aus RNA-bindenden Proteinen und fluoreszierenden Reportern auch erfolgreich verwendet, um RNA-Protein-Interaktionen zu analysieren und neue Interaktionspartner zu identifizieren.<sup>161</sup> Mit Hilfe der beiden Proteine MS2-CP und PP7-CP in Kombination mit GFP und RFP (rot fluoreszierendes Protein) gelang es Chao *et al.* die TRICK (*translating mRNA imaging by coat protein knock-off*)-Methode zur Verfolgung der Translation einzelner RNAs zu etablieren (J. Chao, FMI, Basel, CH).



**Abbildung 1.1 RNA-Detektion mittels proteinbasierter Sonden und Fluoreszenzreportern.**

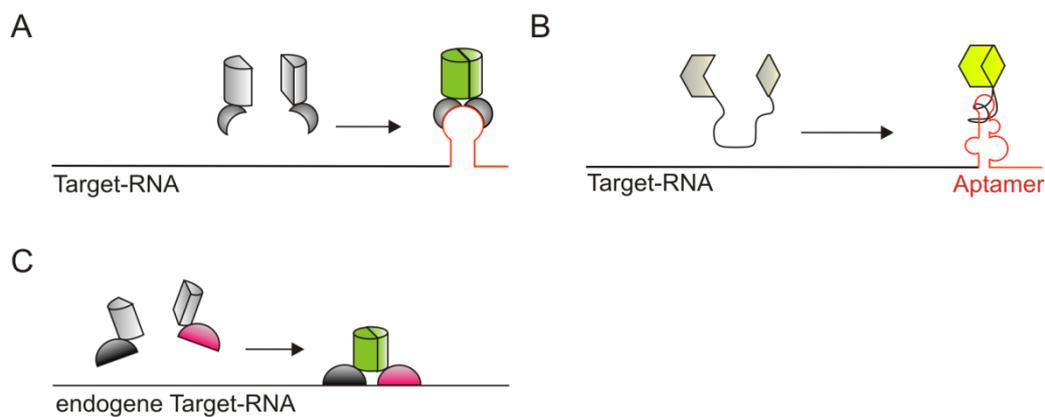
Schematische Darstellung. A: Detektion verlängerter RNA mittels Fusionsproteinen aus MS2-CP und GFP, und einem Kernlokalisierungssignal (NLS) (das erste Mal verwendet von Bertrand *et al.* für MS2-CP<sup>150</sup>); B: Verwendung der Tandem-Moleküle des MS2- bzw. PP7-CP mit einem GFP und einem NLS zum Nachweis verlängerter RNA;<sup>154,155</sup> C: Nachweis endogener Target-RNA mittels eines Fusionsproteins aus zwei Pumilio-Proteinen und einem GFP, sowie einem NLS.<sup>179</sup>

Die permanente Fluoreszenz des Reporterproteins, welche ein hohes Hintergrundsignal verursacht, stellt einen großen Nachteil dieser proteinbasierten Sonden dar.<sup>154</sup> Um die hohe Hintergrundfluoreszenz zu umgehen, wurde neben dem meist verwendeten Kernlokalisierungssignal oft die Methode des FRAP genutzt (*fluorescence recovery after photobleaching*), welche es erlaubt, neu translatierte oder diffundierte Proteine nach lokaler Photobleichung zu verfolgen.<sup>4,156,160,165,169,172,180-185</sup> Eine weitere Möglichkeit, um die Fluoreszenz zeitlich und räumlich zu steuern, wurde durch die Verwendung eines photoaktivierbaren GFPs beschrieben.<sup>184</sup> Eine Weiterentwicklung der proteinbasierten Sonden stellt die RNA-abhängige Generierung eines Fluoreszenzsignals dar, welche im nächsten Kapitel beschrieben wird.

### 1.2.2.2. RNA-Detektion mittels Fluoreszenzkomplementierung

Die Detektion von RNA mittels proteinbasierter Sonden und einem einschaltbaren Fluoreszenzsignal wurde durch die Verwendung der Proteinfragmentkomplementierung (*protein fragment complementation*, PC) ermöglicht. Die Komplementierung eines geteilten Proteins wurde erstmals bei der spontanen  $\alpha$ -Komplementierung gespaltener  $\beta$ -Galaktosidase beobachtet.<sup>186</sup> Eine, durch Protein-Interaktionen gesteuerte, Proteinkomplementierung wurde aber zum ersten Mal anhand des Ubiquitins demonstriert<sup>187</sup> und seitdem auf eine Vielzahl anderer Proteine, wie zum Beispiel  $\beta$ -Galaktosidase,  $\beta$ -Lactamase oder TEV-Protease angewandt.<sup>188-192</sup> Im Jahr 2000 setzten Ghosh *et al.* die Komplementierung erstmals ein, um ein Fluoreszenzsignal einzuschalten.<sup>193</sup> Sie fusionierten zwei Hälften des GFPs an Peptide, welche miteinander agierten und eine antiparallele *coiled coil* Struktur ausbildeten. Durch diese Interaktion konnte sich das GFP zusammenlagern und ein Fluoreszenzsignal wurde ausgelöst.<sup>193</sup> Die Entstehung eines Fluoreszenzsignals durch Proteinfragmentkomplementierung, welche auch Fluoreszenzkomplementierung (FC) genannt wird, wurde im Anschluss auch für fluoreszierende Proteine oder Enzyme, wie zum Beispiel Luciferasen etabliert.<sup>190,194,195</sup>

Vier Jahre nach der Entwicklung der RNA-unabhängigen bimolekularen Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) wurde von Rackham *et al.* erstmals die trimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TriFC) genutzt, um RNA in Säugerzellen nachzuweisen.<sup>196</sup> Dafür wurde das MS2-CP in Kombination mit anderen RNA-bindenden Proteinen (FMRP, IMP1) verwendet, um Protein-RNA Interaktionen in Abhängigkeit bestimmter Sequenzelemente (IRE,  $\beta$ -Aktin *zip code*, G-Quartett) nachzuweisen. Diese Detektorproteine wurden jeweils mit einer Hälfte des geteilten Venus-Proteins fusioniert. Durch die Interaktion der Proteine mit der RNA konnten sich die zwei Hälften des Venus-Proteins zusammenlagern und ein Fluoreszenzsignal wurde generiert (siehe Abbildung 1.2 A).<sup>196</sup> Die Bezeichnung als TriFC leitet sich von der Beteiligung der zwei Fusionsproteine sowie der RNA zur Proteinfragmentkomplementierung ab. Basierend auf der Entwicklung der TriFC konnten Schmidt *et al.* 2006 die RNA-abhängige Interaktion der Proteine Y14 und NXF1 (TAP) bei der Bildung des *exon junction complexes* (EJC) in Säugerzellen nachweisen.<sup>197</sup> Durch die Spaltung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4A (eIF4A), welcher mit den zwei Hälften eines *split*-EGFP fusioniert wurde, gelang es Valencia-Burton *et al.* im Jahr 2007 in *E. coli* *LacZ* RNA und 5S rRNA nachzuweisen, welche mit dem eIF4A-Aptamer fusioniert waren.<sup>198</sup> In dieser Studie wurde die unterschiedliche Verteilung dieser beiden RNAs beschrieben, welche darauf hindeutet, dass die Bindung des Proteinkomplexes den nativen Transportmechanismus nicht beeinträchtigt. Eine andere Form der Proteinkomplementierung wählten im Jahr 2011 Andou *et al.*, welche die zwei Hälften einer *split*-Luciferase (Rluc, *Renilla luciferase*) über einen BIV-TAT Linker miteinander verknüpften.<sup>199</sup> Dieser Proteinlinker veränderte nach Bindung an das TAR-Aptamer seine Konformation so, dass es zu einer Komplementierung der Luciferase kam und diese ein Fluoreszenzsignal generieren konnte (siehe auch Abbildung 1.2 B).



### Abbildung 1.2 RNA-Detektion mittels Fluoreszenzkomplementierung.

Schematische Darstellung. A: Trimolekulare Fluoreszenzkomplementierung zum Nachweis Aptamer-modifizierter RNA basierend auf *split*-Venus (erstmalig beschrieben von Rackham *et al.*,<sup>196</sup> für weitere Anwendungen siehe Tabelle 1.1); B: Fluoreszenzkomplementierung zum Nachweis Aptamer-verlängerter RNA basierend auf der Bindung eines BIV Tat-Peptidlinkers zwischen zwei Hälften einer *split*-Rluc, Andou *et al.*;<sup>199</sup> C: TriFC zum Nachweis endogener Target-RNA basierend auf Pumilio und *split*-GFP (erstmalig beschrieben von Ozawa *et al.*,<sup>200</sup> für andere Anwendungen siehe Tabelle 1.1).

Kürzlich wurden die beiden Proteine MS2-CP und PP7-CP in direkter Kombination mit *split-Venus* verwendet, um eine Reporter-RNA in Säugerzellen nachzuweisen, welche benachbarte MS2-BS und PP7-Erkennungsstrukturelemente trug.<sup>201</sup>

Mit Hilfe der Fluoreszenzkomplementierung ist es demnach möglich, ein Fluoreszenzsignal durch die Bindung von Proteinen an RNA einzuschalten. Trotz der Erfolge, welche mit dieser Methode erzielt wurden, wird eine Veränderung der Target-RNA bedingt, was einen Eingriff in das natürliche System darstellt. Aus diesem Grund war es ein großer Durchbruch als Ozawa *et al.* 2007 das sequenzspezifisch RNA-bindende Protein Pumilio zur RNA-Detektion mittels TriFC verwendeten (siehe Abbildung 1.2 C).<sup>200</sup> Durch die Verwendung zweier Pumilio-Proteine und einem *split-GFP* war es ihnen möglich, endogene mitochondriale RNA in Säugerzellen nachzuweisen. Da Pumilio-Varianten mit veränderter Sequenzspezifität erzeugt werden können, stellt der Einsatz dieser RNA-bindenden Proteine eine elegante Lösung zur Detektion beliebiger endogener RNA dar (für eine Beschreibung des Proteins und geeigneter Engineering-Methoden siehe Kapitel 1.3).

Analog zu den erwähnten Studien konnte durch die Verwendung verschiedener Kombinationen aus RNA-bindenden Proteinen und Fluoreszenzreportern eine Vielzahl von RNAs in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1.1). Durch die Verwendung von FRAP oder *continuos photobleaching* konnten detailliertere Einblicke in RNA-Protein-Komplexbildungen gewonnen werden<sup>197,200,202</sup> und mittels TIRF (*total internal reflection fluorescence*)-Mikroskopie gelang es Yamada *et al.* 2011 einzelne  $\beta$ -Aktin RNA Moleküle zu visualisieren.<sup>203</sup>

**Tabelle 1.1: Verwendung von TriFC zum RNA-Nachweis.**

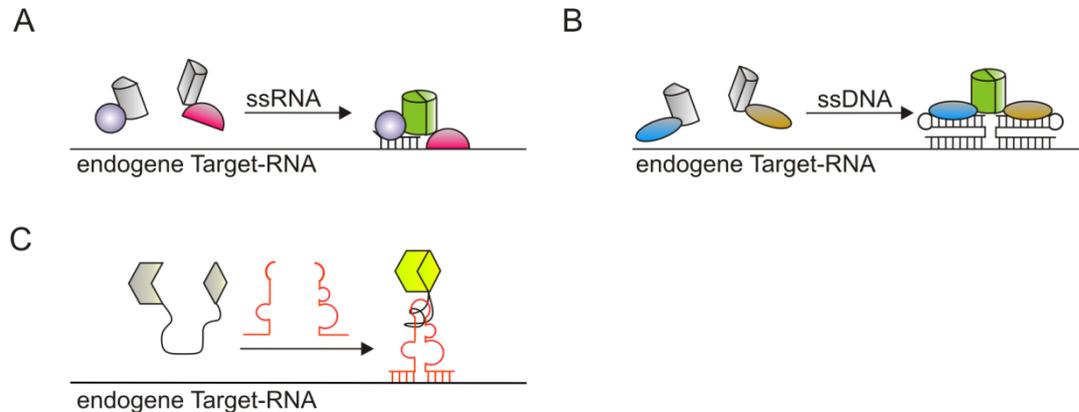
RNA-bindendes Protein	Fluoreszenz-reporter	Target-RNAs	Zellen	Quelle
MS2-CP/IMP1 /FMRP	<i>split-Venus</i>	IRE, $\beta$ -Aktin, G-Quartett	Cos-7	Rackham <i>et al.</i> <sup>196</sup>
Y14 + NXF1 (TAP)	<i>split-YFP</i>	Bildung EJC	MCF7	Schmidt <i>et al.</i> <sup>197</sup>
<i>split-eIF4A</i>	<i>split-EGFP</i>	<i>LacZ</i> , 5S rRNA	<i>E. coli</i>	Valencia-Burton <i>et al.</i> <sup>198</sup>
Pum-HD	<i>split-GFP</i>	ND6 mtRNA	HeLa	Ozawa <i>et al.</i> <sup>200</sup>
Pum-HD	<i>split-mCitrine</i>	TMV RNA	<i>N. benthamiana</i>	Tilsner <i>et al.</i> <sup>204</sup>
<i>split-eIF4A</i>	<i>split-EGFP</i>	Modell-RNA	<i>E. coli</i>	Valencia-Burton <i>et al.</i> <sup>205</sup>
Y14 + NXF1 (TAP)	<i>split-YFP</i>	Bildung EJC	MCF7	Schmidt <i>et al.</i> <sup>202</sup>
MS2-CP + GAG	<i>split-Venus</i>	HIV-1 vRNA	HeLa	Milev <i>et al.</i> <sup>206</sup>
MS2-CP + G3BP1	<i>split-YFP</i>	$\beta$ -F1-ATPase	C4	Ortega <i>et al.</i> <sup>207</sup>
Pum-HD + Ago/TF	<i>split-Fluc</i>	Modell-RNA	<i>in vitro</i>	Furman <i>et al.</i> <sup>208</sup>
Pum-HD	<i>split-EGFP</i>	$\beta$ -Aktin	Cos-7	Yamada <i>et al.</i> <sup>203</sup>
BIV Peptidlinker	Tat- <i>split-Rluc</i>	TAR Aptamer	<i>in vitro</i>	Andou <i>et al.</i> <sup>199</sup>
HTLV-1 Rex+ $\lambda_N$	<i>split-GFP</i>	Modell-RNA	<i>E. coli</i>	Yiu <i>et al.</i> <sup>209</sup>
MS2-CP + PP7-CP	<i>split-Venus</i>	Modell-RNA	U2OS	Wu <i>et al.</i> <sup>201</sup>

IMP1: IGF2 mRNA Bindeprotein, NXF1: *nuclear RNA export factor 1*, G3BP: *GTPase-activating protein-binding protein 1*, Ago: Argonaut, HTLV-1 Rex: *human T-cell leukemia virus type 1 Rex*. IRE: *iron response element*, EJC: *exon junction complex*, ND6: *NADH dehydrogenase subunit 6*, TMV: Tabakmosaikvirus, BIV: *bovine immunodeficiency virus*, Tat: *transactivator*, TAR: *transactivation response RNA*

Mit Hilfe von RNA-bindenden Proteinen kann aber nicht jede beliebige RNA nachgewiesen werden, da nicht immer eine passende Sequenz oder Struktur zur Verfügung steht. Aus diesem Grund befassten sich mehrere Studien mit der Verwendung von Nukleinsäure-*guides*, um die Sequenzspezifität zu verändern. So gelang es Furman *et al.* im Jahr 2010 *in vitro* mit Hilfe einzelsträngiger DNAs, Transkriptionsfaktoren an RNA zu dirigieren, welche an *split-Fluc* (*fire fly luciferase*) fusioniert waren, und durch ihre Bindung eine FC auslösten (Abbildung 1.3 B).<sup>208</sup> Des Weiteren konnten Furman *et al.* mittels einzelsträngiger RNAs das Protein Argonaut (Ago) an die RNA leiten, und in Kombination mit Pumilio und *split-Fluc* für die FC verwenden (Abbildung 1.3 A).<sup>208</sup> Dieser Ansatz wies aber den Nachteil auf, dass beide Ago und Pumilio nicht beliebig kombinierbar waren, und Ago an den einzelsträngigen Überhang der hybridisierten RNA band, und nicht zwischen zwei verschiedenen *guide*-RNAs unterscheiden konnte. Des Weiteren war eine RNA-Detektion *in vivo* noch nicht möglich.<sup>208</sup>

Andou *et al.* konnten unveränderte RNA *in vivo* detektieren, indem sie ein *split-TAR*-Aptamer verwendeten, welches als *guide*-RNA das *split-Fluc* Protein, dessen Hälften über einen BIV Tat-Peptidlinker verbunden waren, an die Target-RNA dirigierte (siehe Abbildung 1.3 C).<sup>199</sup> Um RNA *in vivo* detektieren zu können, wurden aber auch in diesem Fall – analog zu den

fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden – die *guide*-RNAs transfiziert. Da die *guide*-RNAs aber nicht markiert sind, wäre es zumindest theoretisch möglich, sie intrazellulär produzieren zu lassen, wodurch eine Transfektion umgangen würde.



**Abbildung 1.3 RNA-Detektion mittels proteinbasierter Sonden und *guide*-Nucleinsäuren.**

Schematische Darstellung. A: Nachweis endogener Target-RNA mittels TriFC basierend auf Pumilio und Ago, welches über ssRNA zu der Target-RNA dirigiert wird, beschrieben von Furman *et al.*;<sup>208</sup> B: Nachweis unveränderter Target-RNA mittels TriFC basierend auf DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, welche durch ssDNAs zur Target-RNA dirigiert werden, beschrieben von Furman *et al.*;<sup>208</sup> C: Nachweis endogener Target-RNA mittels eines *split*-Aptamers, welches als *guide*-RNA fungiert und ein *split*-Fluc Molekül zur Target-RNA dirigiert, Andou *et al.*<sup>199</sup>

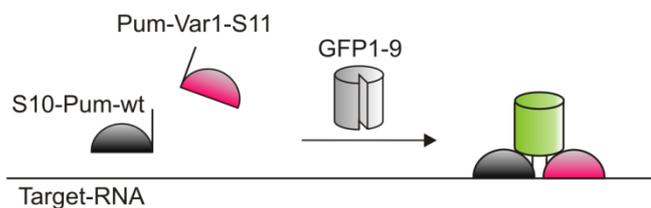
Neben der Anwendung zum RNA-Nachweis wurde TriFC ebenfalls verwendet, um neue Protein-RNA<sup>210,211</sup> sowie Protein-Protein-Interaktionen<sup>212</sup> aufzuklären (siehe Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2 TriFC zur Aufklärung von Protein-RNA- bzw. Protein-Protein-Interaktionen**

Protein	Reporter		Quelle
Pum-HD	<i>split</i> -Fluc	Zellfrei	Porter <i>et al.</i> <sup>211</sup>
MS2-CP und Gag über Adapter Vps22	<i>split</i> -Venus	HeLa Zellen	Ghoujal <i>et al.</i> <sup>212</sup>
Rev bzw. Tat und RNA-bindendes Protein	<i>split</i> -mCherry	MDCK Zellen	Yin <i>et al.</i> <sup>210</sup>

Die TriFC stellt einen Meilenstein in der Entwicklung proteinbasierter Sonden zur RNA-Detektion dar, weist aber einige Nachteile auf. Durch die spontane Zusammenlagerung der *split*-Fluoreszenzproteine, wie sie bei der BiFC beobachtet wurde,<sup>213,214</sup> kann eine hohe Hintergrundfluoreszenz verursacht werden. Die spontane Zusammenlagerung konnte für die BiFC bereits durch das Einführen bestimmter Mutationen in die *split*-FPs umgangen werden, welche bis jetzt aber nur für andere fluoreszierende Proteine oder noch nicht in Kombination mit TriFC eingesetzt wurden.<sup>194,213,215</sup> Des Weiteren könnte das Fusionieren der RNA-bindenden Proteine mit den Reportern dazu führen, dass diese unlöslich produziert werden oder aggregieren. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Probleme lieferten im Jahr 2013

Kellermann *et al.* mit der Entwicklung der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung (TetFC), welche eine Erweiterung des Systems von Ozawa *et al.* darstellte (siehe Abbildung 1.4).<sup>216</sup> Zwei Pumilio-Proteine wurden verwendet, welche an die Target-RNA binden. Diese Proteine waren aber nicht mit zwei Hälften des GFP fusioniert, sondern jeweils nur mit einem  $\beta$ -Faltblatt des gesamten GFPs (S10 bzw. S11). Nach Zugabe des GFP-Detektors, welcher die restlichen  $\beta$ -Faltblätter 1-9 umfasste, konnte sich das vollständige Protein zusammenlagern und ein RNA-abhängiges Fluoreszenzsignal wurde *in vitro* generiert.<sup>216</sup> Dieses dreigeteilte *split*-GFP wurde ursprünglich von Cabantous *et al.* anhand des *superfolder*-GFPs entworfen und zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt.<sup>217</sup> Kellermann *et al.* konnten die optimale Distanz von 5 nt zwischen beiden Pumilio-Bindemotiven bestimmen und Target-RNA *in vitro* sequenzspezifisch ab einer Konzentration von 16 nM detektieren.



**Abbildung 1.4 Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung.**

Schematische Darstellung. Bindung der Proteine S10-Pum-wt und Pum-Var1-S11 im 5 nt Abstand an die Target-RNA führt dazu, dass die beiden  $\beta$ -Faltblätter S10 und S11 des GFPs in räumliche Nähe gebracht werden. Nach Zugabe des GFP1-9-Detektors kann eine Fluoreszenzkomplementierung stattfinden. Nach Kellermann *et al.*<sup>216</sup>

## 1.3. Das RNA-bindende Protein Pumilio

### 1.3.1. Biologische Funktionen der PUF-Proteine

Das RNA-bindende Protein Pumilio gehört zur Klasse der PUF-Proteine, welche in Eukaryoten vorkommen und typischerweise die Translation von Target-RNAs regulieren, welche in der Kontrolle der Entwicklung und Differenzierung involviert sind.<sup>218,219</sup> Die Klasse der PUF-Proteine wurde nach den Proteinen Pumilio aus *D. melanogaster* und FBF (*fem-3 mRNA binding factor*) aus *C. elegans* benannt.<sup>220-223</sup> PUF-Proteine sind in Genomen aller sequenzierten Eukaryoten zu finden, oft in mehrfachen Kopien. Eine SMART (*simple modular architecture research tool*)<sup>224,225</sup> Suche nach der Pumilio-Domäne in dem Proteom komplett sequenzierter Genome liefert 4328 Pumilio-Domänen in 649 eukaryotischen Proteinen (Stand: Februar 2014). Dies spiegelt die Bedeutung und Häufigkeit der PUF-Proteine in Eukaryoten wider. In *Drosophila* sowie in Menschen und Maus finden sich beispielsweise je zwei Vertreter der PUF-Familie, in Hefe sechs, in *C. elegans* 12 und in *Arabidopsis* sogar 26.<sup>218,219,226</sup>

PUF-Proteine binden an bestimmte Erkennungsmotive in den 3'-UTRs von mRNAs, um deren Stabilität und Translation zu regulieren.<sup>219,227</sup> Eine nähere Erläuterung zu der sequenzspezifischen Bindung der PUF-Proteine findet sich in Kapitel 1.3.2.

Zu den Funktionen der PUF-Proteine in verschiedenen Organismen gehören die Regulation der Differenzierung und Entwicklung,<sup>222,223,228-232</sup> der Keimbahnfunktionen,<sup>233-239</sup> neuronaler Funktionen und des Gedächtnisses.<sup>47,240-246</sup> Aber auch an der Regulation des Zellzyklusses<sup>247,248</sup> und der mitochondrialen Biogenese sind PUF-Proteine beteiligt.<sup>249-251</sup> Kürzlich wurde ein Set an PUF-mRNA-Targets in *Drosophila*, *C. elegans* und Menschen identifiziert, welche in der Stammzellkontrolle fungieren.<sup>252</sup> Es wird vermutet, dass die ursprüngliche Funktion der PUF-Proteine in der Regulation der Aufrechterhaltung des mitotischen Potentials der Stammzellen lag, und sich die weiteren Funktionen dieser Proteinklasse im Laufe der Evolution entwickelt haben.<sup>219</sup>

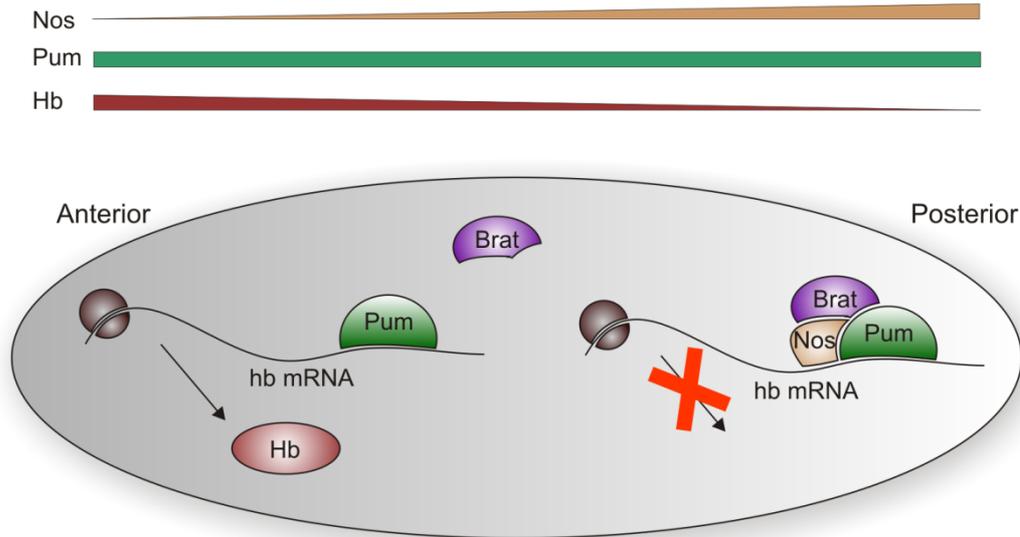
PUF-Proteine üben ihre Funktionen üblicherweise als posttranskriptionale Repressoren aus (zusammengefasst in <sup>219,227</sup>). Beobachtungen in verschiedenen Organismen lassen aber vermuten, dass PUF-Proteine auch zur Aktivierung der mRNA-Translation <sup>253-256</sup> oder zur subzellulären Lokalisation bestimmter mRNAs beitragen.<sup>47,52,245,250,251,257,258</sup>

Der konservierte und vorherrschende Mechanismus der PUF-abhängigen Regulation von mRNAs wird durch die Rekrutierung von mRNA-Deadenylierungs- und *decapping*-Enzymen ausgelöst (zusammengefasst in <sup>259</sup>). Die PUF-proteine Puf3, Puf4 und Puf5 sowie DmPum, *C. elegans* FBF und HsPum1 interagieren mit dem mRNA-Deadenylase-Komplex Ccr4-Pop2-NOT über Interaktionen mit Pop2.<sup>254,260-262</sup> Durch Deadenylierung der mRNA wird deren Stabilität

und die Translation beeinflusst<sup>263-266</sup> Das *decapping* der mRNA wird dabei über die Rekrutierung des Deadenylase-Komplexes durch PUF-Proteine induziert, kann aber auch auf unabhängigem Wege stattfinden.<sup>260,267-270</sup> Neben der Deadenylierung vermitteln aber auch andere Mechanismen eine Unterdrückung der Translation, welche sowohl in Kombination mit der Deadenylierung als auch alleine auftreten können. Diese Mechanismen umfassen die direkte oder indirekte Inhibierung von Translationsinitiationsfaktoren durch PUF-Proteine,<sup>52,230,271,272</sup> Änderungen der RNA-Struktur<sup>262</sup> oder Rekrutierung anderer Translationsrepressoren.<sup>230,259</sup> Ein weiterer Mechanismus wurde in *C. elegans* und humanen Zellen beobachtet, wo PUF-Proteine miRNA-vermitteltes Stilllegen aktivieren.<sup>273,274</sup> Ein Modell postuliert dabei, dass die Bindung von Pumilio an die Target-RNA zu RNA-Strukturveränderungen führt, wodurch die Bindestelle für die miRNA frei wird.<sup>273</sup> Bei einer vergleichenden Analyse von PUF-Targets in menschlichen Zellen waren die PUF-Bindestellen oft in der Nähe von miRNA-Target-Sequenzen zu finden, was darauf hindeutet, dass das Zusammenspiel von PUF und miRNAs weit verbreitet ist.<sup>275</sup>

Ein Beispiel für die Regulation der mRNA durch Deadenylierung und Rekrutierung der Translationsinitiationsinhibitoren stellt die Regulierung der *hunchback* mRNA im *Drosophila* Embryo durch DmPum (*D. melanogaster* Pumilio) dar.<sup>228,230</sup> Die Unterdrückung der Translation der mütterlichen *hunchback* (*Hb*) mRNA am posterioren Ende des Embryos führt zur Ausbildung eines anterior-posterior Gradienten des Hb Proteins (siehe Abbildung 1.5).<sup>276</sup> Die Regulierung der Translation erfolgt durch Pumilio in Kombination mit dem Protein Nanos (Nos), welches durch zwei CCHC-Zinkfinger charakterisiert ist.<sup>277-279</sup> Pumilio bindet an das sogenannte *nanos response element* (NRE) im 3'-UTR dieser RNA.<sup>222,223</sup> Da Pumilio im gesamten Embryo gleichmäßig verteilt ist, wird die räumliche Regulation durch Nos kontrolliert, das nur im posterioren Ende zu finden ist.<sup>278,280,281</sup> Durch die Bildung eines ternären Komplexes aus RNA, Pumilio und Nos wird wiederum das Protein Brat (*brain tumor*) rekrutiert, welches zur NHL Proteinfamilie gehört.<sup>231</sup> Durch dessen Interaktion mit d4EHP, einem *cap*-bindenden Protein, wird die Translation unterdrückt.<sup>230</sup>

Dieser Regulationsmechanismus illustriert sehr gut die komplexen Interaktionen von Pumilio mit RNA und anderen Proteinen, welche eine Inhibierung der Translation zur Folge haben.



**Abbildung 1.5 Verteilung der Proteine Nos, Pum und Hunchback im *Drosophila* Embryo.**

Schematische Darstellung. Durch die Interaktion von Nos mit Pumilio (Pum), welches an RNA gebunden hat, im posterioren Ende des Embryos wird Brat an die *hunchback* mRNA rekrutiert. Durch Unterdrückung der Translation wird ein Anterior-Posterior Gradient des Hunchback (Hb)-Proteins geschaffen.<sup>230,231,276,278,280,281</sup>

Das Zusammenspiel von Pum mit Nos zur Regulation der Translation ist aber nicht nur in *Drosophila*, sondern auch in anderen Organismen zu finden. So interagiert in *C. elegans* das PUF-Protein FBF mit NOS-3 und die Proteine NOS-1 und NOS-2 mit anderen PUF-Proteinen.<sup>282</sup> Auch in *Xenopus* ist ein Nos-Homolog Nanos1 (Xcat-2) zu finden, welches als Translationsrepressor fungiert.<sup>283,284</sup> Auch im Menschen wurden zusätzlich zu den zwei Pumilio-Proteinen auch drei Nos-Proteine identifiziert.<sup>285,286</sup> Es konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion von Pumilio mit anderen Proteinen, wie Nos und Brat die RNA-bindende Domäne der PUF-Proteine ausreichend ist,<sup>222,282,287,288</sup> auch wenn die Interaktion von DmPum und FBF mit den jeweiligen Nos-Proteinen an verschiedenen Stellen innerhalb dieser Domäne stattfindet.<sup>222,282</sup>

Die verschiedenen Pum-Nos-Paare unterscheiden sich in der RNA-Abhängigkeit der Interaktion. Für die Pum-Nos-Paare aus *C. elegans* und *Xenopus* wurde eine RNA-unabhängige Interaktion *in vitro* nachgewiesen,<sup>282,283</sup> die Interaktion von DmPum und DmNos findet, laut Studien von Sonoda *et al.*, jedoch nur in Anwesenheit einer Target-RNA statt.<sup>222</sup>

### 1.3.2. RNA-Bindung von PUF-Proteinen

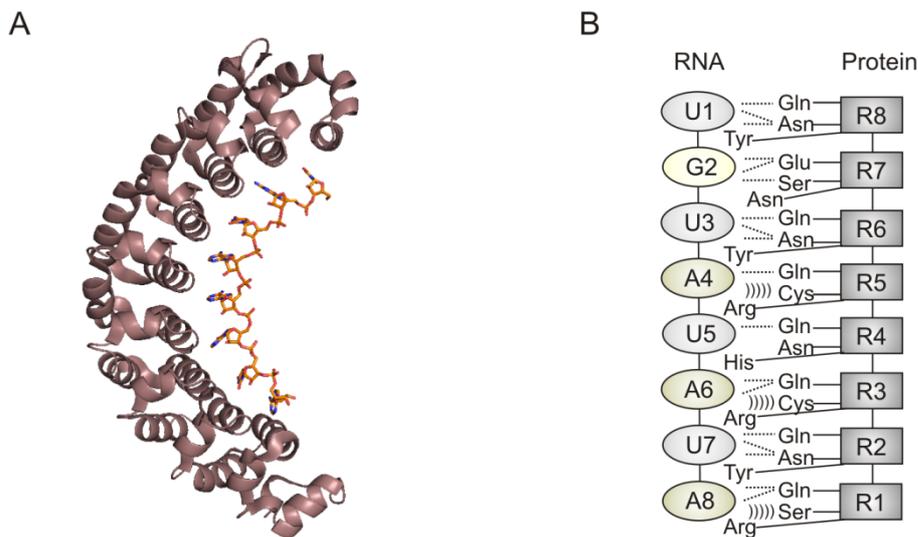
*D. melanogaster* Pumilio ist das am besten charakterisierte PUF-Protein. Es steuert einen Gradienten des Hunchback Proteins im entwickelnden Embryo durch Bindung an die mütterliche *hunchback* mRNA und Rekrutierung der Proteine Brat und Nanos, welche zur Unterdrückung der Translation führen (siehe vorheriges Kapitel).

Innerhalb des 1533 Aminosäure umfassenden Pumilio-Proteins ist eine ca. 40 kDa große C-terminale Domäne für die RNA-Bindung verantwortlich.<sup>221</sup> Diese Domäne besteht aus acht sich wiederholenden Einheiten, sogenannten PUF-Repeats und wird PUF- oder Pumilio-Homologie-Domäne (Pum-HD) genannt.<sup>221</sup> Kristallstrukturen der Pum-HD des *Drosophila* Pumilios und des humanen PUM-1 zeigten, dass jeder dieser Repeats aus drei  $\alpha$ -Helices besteht, welche insgesamt 36 Aminosäuren umfassen <sup>288-290</sup> Zusätzlich zu diesen acht Repeats enthält die Pum-HD zwei sogenannte Pseudo-Repeats, die aus zwei  $\alpha$ -Helices bestehen.<sup>221,288-290</sup> Solche „capping“ Repeats sind typisch für Repeat-Proteine, da die einzelnen Repeats durch hydrophobe Interaktionen mit den benachbarten Repeats stabilisiert werden, wie es bereits für das Protein Ankyrin gezeigt wurde.<sup>291-293</sup> Die Pum-HD nimmt eine sichelförmige Struktur an, wobei die Interaktion mit der RNA an der konkaven Oberfläche stattfindet und antiparallel erfolgt (Pumilio N->C, RNA 3'->5').<sup>288,290</sup> Die Interaktion mit anderen Proteinen findet hingegen an der konvexen Seite der Pum-HD statt.<sup>288,290</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Pum-HD ausreichend für die Interaktion des PUF-Proteins mit anderen Proteinen und die Funktion *in vivo* ist.<sup>222,260,282,287,288</sup>

PUF-Proteine binden an einzelsträngige RNA mit Bindeaffinitäten im subnanomolaren Bereich und hohen Spezifitäten.<sup>294</sup> Das 8 nt Bindemotiv besteht aus einem konservierten UGUR (R=Purin) gefolgt von weiteren vier Nukleotiden, welche weniger konserviert sind.<sup>219-221,275,288-290,295-299</sup> Das Bindemotiv des humanen Pumilio-Proteins ist UGUANAUA.<sup>289</sup> Die Kristallstruktur der humanen PUM-1-HD in Komplex mit der *hunchback* mRNA zeigte, dass die Bindung des Proteins modular erfolgt, was bedeutet, dass jeder Repeat an eine einzelne Base bindet.<sup>289</sup> Für die Bindung an die Base sind pro Repeat drei Aminosäuren innerhalb der zweiten  $\alpha$ -Helix verantwortlich. Die zwei Aminosäuren an Position 12 und 16 dieser Helix interagieren mittels Wasserstoffbrückenbindungen und/oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen direkt mit der jeweiligen Base und eine dritte Aminosäure an Position 13 stabilisiert die Bindung durch Stapelwechselwirkungen (Stacking).<sup>289</sup> Dieses Schema trifft auf alle Repeats mit Ausnahme von Repeat 7 zu, welcher keine Stapelwechselwirkungen ausbildet, da die Aminosäure an Position 13 ein Asparagin ist. Diese spezielle Natur des Repeats 7 trägt eventuell zu der hohen Konservierung des UGU-Triplets in Target-Sequenzen der PUF-Proteine bei.<sup>294</sup>

Anhand der Kristallstruktur und Bindungsstudien konnte bestimmt werden, dass die Erkennung der RNA basenspezifisch ist, so binden Cystein und Glutamin die Base Adenin, Asparagin und

Glutamin Uracil und Serin zusammen mit Glutamat binden Guanin.<sup>289,294</sup> Pumilio-Repeats, die Cytosin binden wurden in der Natur bis jetzt noch nicht gefunden, es war aber gleich zwei Gruppen möglich mittels gerichteter Evolution Varianten mit einer Affinität für Cytosin innerhalb der Konsensus-Sequenz herzustellen (siehe nächstes Kapitel).<sup>300,301</sup> Es gelang diesen Gruppen, zu bestimmen, dass Arginin zusammen mit einer Aminosäure mit einer kurzen (Glycin/Alanin) oder einer nukleophilen Seitenkette (Serin/Threonin/Cystein), vorzugsweise Serin, für eine Bindung an Cytosin verantwortlich ist. Die Aminosäuren Tyrosin, Histidin oder Arginin kommen dabei als Stacking-Partner in Frage.<sup>300,301</sup> Dieser sogenannte Erkennungscode von Pumilio ermöglichte es mehreren Gruppen mittels Protein-Engineering Varianten mit neuer Sequenzspezifität herzustellen (siehe Kapitel 1.3.3).



**Abbildung 1.6 Sequenzspezifische RNA-Bindung der humanen Pum-HD.**

A: Kristallstruktur der humanen Pum-HD mit der p38-alpha NREa RNA (PDB: 3Q0L<sup>302</sup>); B: Schematische Darstellung der Interaktion der Pum-HD mit der Target-RNA (UGUAUAUA); Protein-Repeats sind als Quadrate angegeben, RNA-Basen als Ovale, gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrücken dar, Klammern Van-der-Waals-Interaktionen; nach<sup>300</sup>.

Strukturaufklärungen und Untersuchungen der Bindespezifitäten verschiedenen PUF-Homologie Domänen zeigten aber auch einige Abweichungen von diesem Erkennungsschema auf. Für das PUF-Protein FBF wurde zum Beispiel gezeigt, dass nicht nur die direkt interagierenden Aminosäuren, sondern auch die Stapelwechselwirkungen sowohl die Affinität als auch Basenspezifität beeinflussen.<sup>303</sup> Es wird davon ausgegangen, dass diese Erkenntnisse auch auf andere PUF-Proteine übertragbar sind.<sup>303</sup> Außerdem zeigte die Charakterisierung der *C. elegans* Proteine FBF und Puf-8, dass diese PUF-Proteine Insertionen sowohl in den Repeats als auch in der Target-RNA tolerierten.<sup>298</sup>

Das FBF-2-Protein (*fem-3 binding factor-2*) aus *C. elegans* bindet außerdem bevorzugt an Bindemotive mit neun Nukleotiden. Die FBF-2-Erkennungssequenzen enthalten somit ein zusätzliches zentrales Nukleotid im Vergleich zur bekannten Konsensus-Sequenz der HsPum1-

HD und anderer PUF-Proteine.<sup>298,304,305</sup> Dieses zusätzliche Nukleotid ist nach Proteinbindung dem umgebenden Milieu zugewandt, während die benachbarten Nukleotide nach dem typischen Bindemodus gebunden werden.<sup>305</sup> Es wird davon ausgegangen, dass diese zusätzliche Base durch eine lokal flache Struktur der RNA-bindenden Oberfläche der FBF-2-HD bedingt wird.<sup>303,305</sup> Diese „herausgeklappte“ Base wurde ebenfalls in dem Hefeprotein Puf4p und dem HsPum1 nach Bindung an RNA mit einem veränderten Bindemotiv beobachtet.<sup>304,306</sup> Auch in Studien, die sich mit dem Bindemodus des HsPum1 an die Position 5 der RNA beschäftigen haben (UGUANAUA), wurde dieses Phänomen beobachtet. Es wurde hierbei gezeigt, dass in Abhängigkeit der vorhandenen Base drei verschiedene Bindemodi des HsPum1 auftreten.<sup>302</sup> In Anwesenheit eines Adenin oder Guanin an Position 5 der RNA nimmt das Nukleotid eine C2'-*endo* Konformation ein, welche dazu führt, dass das Nukleotid Hoogsteen-Interaktionen mit einem Glutaminrest in Repeat 4 eingeht. Dieser Bindemodus wurde 1:1 C2'-*endo* genannt. Findet sich in Position 5 der RNA aber ein Uracil, verbleibt die Ribose in der C3'-*endo* Konformation und erlaubt Watson-Crick-Interaktionen. Dieser Modus wurde 1:1 C3'-*endo* genannt. Ein dritter Modus trat auf, wenn Cytosin an Position 5 der RNA vorlag. Die Base Cytosin bildet direkt Stapelwechselwirkungen mit Nukleotid A4 aus und interagiert nicht mit Repeat 4 des Proteins. Dieser Modus wurde *base omission mode* genannt. In einer weiteren Kristallstruktur von HsPum1 wurde an dieser Position aber auch eine 1:1 C3'-*endo* Konformation beobachtet. Das Protein weist gleiche Affinitäten zu allen RNAs auf und die Protein-RNA-Komplexe sind gleich stabil.<sup>302</sup> Die Form der Komplexe änderte sich aber in Abhängigkeit des Bindemodus, was zu der Vermutung führte, dass durch die verschiedenen Konformationen andere Proteine rekrutiert werden, und somit unterschiedliche RNAs mittels des gleichen Pumilios unabhängig voneinander reguliert werden können.<sup>307</sup>

Auch die Proteine PUF-5 und PUF-6 aus *C. elegans* weichen vom 1:1 Bindemodus ab, da sie jeweils 10 nt mit nur 8 Repeats erkennen.<sup>299</sup> Eine weitere Abweichung stellt das Hefeprotein Puf3p dar, das eine spezifische Bindetasche für ein zusätzliches Cytosin aufweist, welches zwei Nukleotide *upstream* der Konsensus-Sequenz liegt und sogar die Affinität der Puf3p Bindung beeinflusst.<sup>308</sup> Die folgenden Reste weisen die gleichen Kontakte wie das HsPum1 auf. Die unterschiedliche Bindung der beiden Hefeproteine Puf3p und Puf4p spiegelt sehr gut wider, wie spezifisch und unabhängig das jeweilige Protein seine Target-RNAs reguliert.<sup>308</sup>

### 1.3.3. Engineering von PUF-Proteinen

Mit der Bestimmung der Kristallstruktur der Pum-HD im Komplex mit RNA, wurden die Grundlagen zum Engineering von Pumilio gelegt. Basierend auf Erkenntnissen aus der Kristallstruktur veränderten Wang *et al.* als erstes erfolgreich die Basenspezifität des Repeats 6 in HsPum1-HD von U zu G, indem sie die drei Aminosäuren, welche an der RNA-Bindung beteiligt sind, substituierten.<sup>289</sup> Vier Jahre später versuchten Cheong *et al.* die Spezifität von

Repeat 7 von G zu U zu verändern, indem sie ebenfalls die drei entsprechenden Aminosäuren substituierten. Sie stellten aber fest, dass diese Proteinvariante nicht löslich war. Indem sie die Aminosäure unberührt ließen, welche die Stapelwechselwirkungen eingeht, konnten sie erfolgreich lösliches Protein mit der gewünschten Spezifität produzieren.<sup>294</sup> Sie zeigten damit, dass die Sequenzspezifität von Pumilio allein durch den Austausch der zwei direkt interagierenden Aminosäuren gesteuert werden kann. Anhand dieses Prinzips war es ihnen ebenfalls möglich, die Spezifitäten einzelner Repeats auch von A zu G und A zu U zu verändern.<sup>294</sup> Die Entschlüsselung des Erkennungs-codes und dessen Umprogrammierbarkeit war Grundlage vieler anderer Studien, welche Pumilio mittels ortsgerichteter Mutagenese umprogrammierten.<sup>179,200,203,204,294,305,309</sup> In Tabelle 1.3 sind die Aminosäuresubstitutionen der HsPum1-HD dargestellt, welche zur Veränderung der Sequenzspezifität eingesetzt wurden.

**Tabelle 1.3 Modulierbare Sequenzspezifität der HsPum1-HD.**

RNA-Base	Protein-Repeat	Basen-spezifität	Aminosäure-substitutionen	Quelle
2	7	G → U	S1079N, E1083Q	Cheong <i>et al.</i> , Choudhury <i>et al.</i> <sup>294,309</sup>
3	6	U → G	N1043S, Q1047E, (Y1044N)	Cheong <i>et al.</i> , Choudhury <i>et al.</i> , Wang <i>et al.</i> <sup>289,294,309</sup>
		U → A	N1043C, Y1044N	Ozawa <i>et al.</i> , Tilsner <i>et al.</i> <sup>200,204</sup>
4	5	A → U	C1007N	Ozawa <i>et al.</i> <sup>200</sup>
		A → G	C1007S, Q1011E	Wang <i>et al.</i> , Yamada <i>et al.</i> , Yoshimura <i>et al.</i> <sup>179,203,310</sup>
5	4	U → G	Q975S	Ozawa <i>et al.</i> <sup>200</sup>
6	3	A → G	Q939E, C935S	Cheong <i>et al.</i> , Choudhury <i>et al.</i> , Ozawa <i>et al.</i> , Wang <i>et al.</i> , Yamada <i>et al.</i> , Yoshimura <i>et al.</i> <sup>179,200,203,294,305,309</sup>
		A → U	C935N	Cheong <i>et al.</i> , Yoshimura <i>et al.</i> <sup>179,294</sup>
7	2	U → G	N899S, Q903E	Yamada <i>et al.</i> , Yoshimura <i>et al.</i> <sup>179,203</sup>
8	1	A → G	Q867E	Yoshimura <i>et al.</i> , Wang <i>et al.</i> , Cheong <i>et al.</i> <sup>179,294,305</sup>
		A → U	S863N	Ozawa <i>et al.</i> , Tilsner <i>et al.</i> , Yamada <i>et al.</i> , Yoshimura <i>et al.</i> <sup>179,200,203,204</sup>

Zur Charakterisierung der Pumilio-Varianten wurden unter Anderem *in vitro* Bindungsstudien mittels Gel-Shift oder Fluoreszenzpolarisation mit radioaktiv- bzw. fluoreszenzmarkierter RNA durchgeführt.<sup>294,304</sup> Zur Selektion neuer Pumilio-Varianten mit bestimmten Bindungseigenschaften wurde von vielen Gruppen das Hefe-drei-Hybrid (*yeast-three-hybrid*)-System verwendet. Dieses System wurde im Jahr 1996 von SenGupta *et al.* entwickelt und beruht auf der Transkriptionsaktivierung von Reportergenen durch die RNA-abhängige Interaktion zweier Proteine.<sup>311</sup> Hierbei wird das MS2-CP an eine DNA-Bindedomäne fusioniert, welche zum Beispiel das Regulationselement LexA auf DNA-Ebene erkennt. Die zu

untersuchende RNA wird dann mit den Bindestellen für das MS2-CP versehen. Mit Hilfe des MS2-CP kann demnach die RNA an die DNA immobilisiert werden. Nach Bindung des zu untersuchenden RNA-bindenden Proteins an die RNA, wird die Transkription des Reportergens initiiert, wenn das Protein mit der GAL4-Aktivator-domäne fusioniert ist. Als Reportergene dienen zumeist *LacZ* und *HIS3*, welche eine Quantifizierung (*LacZ*) und *life-death*-Selektion (*HIS3*) erlauben.<sup>311</sup> Anhand des Reportergens *HIS3* lässt sich ebenfalls eine Aussage über die Stärke der Interaktion treffen, wodurch  $K_D$ -Werte direkt aus den Reporteraktivitäten extrapoliert werden können.<sup>295,312</sup> Einen Vorteil dieses Hefe-drei-Hybrid-Systems stellt die direkte Charakterisierung der Protein-Varianten *in vivo* dar. Dadurch wird vermieden, dass jedes Protein gereinigt und mittels *in vitro* Bindungsstudien untersucht werden muss, was einen hohen Durchsatz erlaubt. Da die Protein-RNA-Bindung aber mittels Transkriptionsaktivierung charakterisiert wird, müssen beide Interaktionspartner im Nukleus lokalisiert sein. Da einige Proteine nicht in den Kern lokalisierbar sind und die Umgebung dort möglicherweise auch nicht den natürlichen Bedingungen entspricht, stellt dies einen Nachteil dieser Methode dar. Des Weiteren tritt oft eine sogenannte Auto-Aktivierung auf, welche zu falsch-positiven Signalen führen kann.<sup>312,313</sup>

Das Engineering der Pum-HD wurde aber nicht nur genutzt, um Varianten mit neuen Binde-spezifitäten zu generieren, sondern auch, um Einblick in die Bindungseigenschaften und Funktionen von PUF-Proteinen zu erhalten. So charakterisierten Oppermann *et al.* beispielsweise mittels Protein-Engineering und dem Hefe-drei-Hybrid-System den oben erwähnten *base omission mode* der PUF-Proteine.<sup>298</sup> Des Weiteren war es ihnen durch das Herstellen einer Chimäre aus FBF und PUF-8 möglich, ein PUF-Protein mit Spezifität für eine 9 nt Zielsequenz zu erhalten.<sup>298</sup> Wie für PUF-Proteine typisch, konnte die Sequenzspezifität dieses Proteins durch das Verändern der jeweiligen Proteinelemente reguliert werden. Im Gegensatz dazu gelang es Lu *et al.* aus dem PUF-4 Protein, welches eine 9 nt Sequenz bindet mittels gerichteter Mutagenese ein Protein herzustellen, welches eine 8 nt Sequenz bevorzugt.<sup>314</sup>

Koh *et al.* nutzten das Hefe-drei-Hybrid System, um den Einfluss der Aminosäure Arginin an Position 13 der Helix 2 in Repeat 3 des FBF-2 Proteins zu untersuchen.<sup>303</sup> Auch das Screening zur Identifizierung Cytosin-bindender PUF-Repeats erfolgte mit Hilfe von Hefe-drei-Hybrid-Systemen. Filipovska *et al.* konnten so zeigen, dass Arginin an Position 16 und kleine oder nukleophile AS an Position 12 (Gly/Ala/Ser/Thr/Cys) der zweiten  $\alpha$ -Helix des jeweiligen Repeats für die Bindung an Cytosin verantwortlich sind.<sup>301</sup> Anhand des Screenings konnten sie Varianten bestimmen, die Cytosin an jeder Position des Bindemotivs mit höherer Affinität als das Wildtyp-Protein binden. Auch Dong *et al.* konnten mittels des Hefe-drei-Hybrid-Systems zeigen, dass Serin und Arginin eine Spezifität für Cytosin innerhalb der Konsensus-Sequenz ermöglichen.<sup>300</sup> Des Weiteren konnten Dong *et al.* bestimmen, dass für die Stacking-Interaktion

an Position 13 Tyrosin, Histidin und insbesondere Arginin bevorzugt wurden. Anhand von Kristallstrukturen wurde gezeigt, dass Cytosin sich von der Bindefläche des Proteins wegdreht, wodurch Raum für die Argininseitenkette entsteht.<sup>300</sup>

Die programmierbare Sequenzspezifität der PUF-Proteine eröffnete weitere Anwendungsmöglichkeiten. Filipovska *et al.* entwickelten ein Pumilio mit 16 Repeats, welches eine 16 nt RNA sequenzspezifisch erkannte und im Hefe-drei-Hybrid-System die Transkription der Reportergene effizient anschaltete.<sup>301</sup> Dadurch konnten sie zeigen, dass es möglich ist, die Pumilio-Erkennungssequenz beliebig zu erweitern, was besonders für eine RNA-Bindung in Eukaryoten mit komplexen Transkriptomen interessant ist. Durch das Fusionieren von PUF-Proteinen mit Fluoreszenzreportern war es möglich, RNA in lebenden Zellen mit Einzelmolekülsensitivität zu detektieren und zu verfolgen (siehe Kapitel 1.2.2).<sup>179,200,203,204</sup> Es war ebenfalls möglich, verschiedene Proteine an PUF-Proteine zu fusionieren, um gewünschte Funktionen auszulösen. Die programmierbare RNA-Bindeeigenschaft von Pumilio wurde von Cooke *et al.* genutzt, um die Translation bestimmter Proteine zu steuern. Sie fusionierten Translationsaktivatoren bzw. -repressoren an die PUF-Domäne und konnten in *Xenopus* Oozyten gezielt mRNAs ansteuern und die Translation der entsprechenden Proteine regulieren.<sup>315</sup> Einen Durchbruch im Bereich des *in vivo gene silencing* erreichten im Jahr 2012 Choudhury *et al.*, als sie durch Fusionierung einer Pumilio-Domäne mit der PIN-Domäne der RNase SMG6 sequenzspezifisch RNAs in *E. coli* sowie in Mitochondrien von Säugerzellen abbauen konnten.<sup>309</sup> Eine weitere Methode wurde von Wang *et al.* auf Basis von Pumilio etabliert, indem sie eine PUF-Domäne mit Spleiß-Aktivatoren oder -Repressoren fusionierten.<sup>305</sup> Sie konnten so Spleißfaktoren entwickeln, die gewünschte Sequenzspezifitäten und Aktivitäten aufwiesen. Mit Hilfe dieser ESFs (*engineered splicing factors*) war es ihnen möglich alternatives Spleißen einer endogenen humanen RNA in Zellen zu modulieren.<sup>305</sup> Eine ähnliche Strategie nutzten Dong *et al.*, indem sie eine Pumilio-Variante, welche die *VEGF-A* mRNA erkannte, mit Spleiß-Faktoren fusionierten und dadurch die spezifische Modulation des alternativen Spleißens dieser mRNA demonstrierten.<sup>300</sup>

Trotz der vielen Erfolge, die auf Grundlage des Pumilio-Engineerings erreicht wurden, weist diese Methode einige Herausforderungen und Einschränkungen auf. So konnte unter Anderem gezeigt werden, dass nicht alle Repeats in gleichem Maße zur Bindungsenergie beitragen.<sup>221,294</sup> Bei dem Design neuer Varianten muss daher beachtet werden, dass nicht für alle Repeats Spezifitäten in der gleichen Größenordnung erhalten werden können.<sup>301</sup>

Des Weiteren wurde beobachtet, dass Designer-PUF-Proteine oft nicht die gleichen Affinitäten für ihre spezifischen RNAs aufweisen, wie die Wildtyp-Proteine für ihre RNA. Aus diesem Grund sollten maßgeschneiderte Pumilios nicht nur auf ihre Spezifität sondern auch auf ihre Affinität

untersucht werden. Auch die Löslichkeit der entwickelten Proteine stellt oftmals eine Herausforderung dar.<sup>294</sup> Seit der Entdeckung des Erkennungscode von Pumilio durch Cheong *et al.* 2006 ist es üblich, nur die beiden Aminosäuren zu verändern, welche direkte Interaktionen mit der Base eingehen, um neue Sequenzspezifitäten zu generieren. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Stacking-Aminosäuren oftmals einen großen Einfluss auf die Löslichkeit, Affinität und sogar Spezifität ausüben,<sup>294,303</sup> wodurch das Design neuer Varianten erschwert wird. Mehrere Studien zeigten auch, dass PUF-Proteine mehr als nur den ursprünglich gezeigten Bindecode annehmen können, was das Engineering anhand von rationalem Design ebenfalls erschwert.<sup>302,316</sup> Die konservierte Präferenz des Pumilios für das UGU Triplet, welche möglicherweise durch die spezielle Natur des Repeats 7 bedingt wird, stellt eine weitere Herausforderung für das Design maßgeschneiderter Pumilios dar.<sup>294</sup>



## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein genetisch kodierbares RNA-Detektionssystem zu entwickeln, welches in Zukunft zum spezifischen Nachweis endogener RNA beliebiger Sequenz *in vivo* genutzt werden kann. Dieses System sollte es auch ermöglichen, RNAs nicht nur zu detektieren, sondern auch deren Strukturveränderung oder Prozessierung zu verfolgen.

Um solch ein System zu entwickeln, sollte im Rahmen dieser Arbeit zuerst die Produktion und Reinigung der Homologie-Domäne des RNA-bindenden Proteins Pumilio etabliert werden. Im Anschluss sollte die RNA-Detektionsmethode der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung (TetFC), welche auf dem Pumilio-Protein basiert, auf eine mögliche Anwendung *in vivo* untersucht werden. Dazu sollte deren Temperaturabhängigkeit sowie der Einfluss kompetierender RNA untersucht werden.

Des Weiteren sollte die TetFC verwendet werden, um RNA-Strukturveränderungen nachzuweisen. Dazu sollten geeignete RNA-Sequenzen entworfen und deren Strukturveränderungen, in Abhängigkeit der Temperatur, verschiedener Metabolite oder intramolekularer Wechselwirkungen, mittels TetFC untersucht werden.

Da die Anzahl zugänglicher Target-RNAs für die TetFC durch die Sequenzspezifität des Pumilio-Proteins limitiert ist, sollte die Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung entwickelt werden. Durch die Verwendung kurzer, einzelsträngiger *guide*-RNAs sollte es dabei ermöglicht werden, RNAs zu detektieren, die nur ein oder kein Pumilio-Bindemotiv enthalten. Zur Detektion der mRNA des Zelladhäsionsmoleküls L1 sollte eine sequenzspezifische Pumilio-Variante entworfen und in Kombination mit der RNP-FC eingesetzt werden. Des Weiteren sollten unter Verwendung der RNP-FC die gespleißte und ungespleißte HIV-RNA *in vitro* detektiert und voneinander unterschieden werden.

Um die Sequenzspezifität des Pumilios zu erweitern, sollte ebenfalls ein Screening-System für Pumilio-Proteine basierend auf der Interaktion von Pumilio und dem Protein Nos entwickelt werden. Dazu sollte deren RNA-abhängige Wechselwirkung mittels Fluoreszenzpolarisation verfolgt werden.



### 3. Ergebnisse

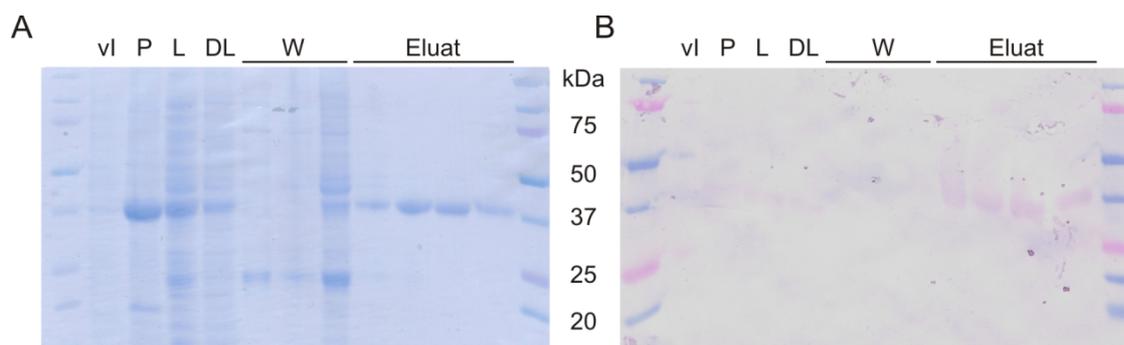
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Homologiedomäne des RNA-bindenden Proteins Pumilio rekombinant produziert, gereinigt und charakterisiert. Die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC, etabliert von S. Kellermann), welche auf dem Pumilio basiert, wurde in dieser Arbeit auf eine mögliche Anwendung *in vivo* charakterisiert und zur Untersuchung von RNA-Strukturveränderungen eingesetzt. Des Weiteren wurde die TetFC weiterentwickelt, um alle möglichen RNA-Zielsequenzen unabhängig von der Sequenzspezifität der Pumilio Proteine mittels Fluoreszenzkomplementierung zugänglich zu machen. Außerdem wurde versucht, eine neue Pumilio-Screening-Strategie zu etablieren.

#### 3.1. Klonierung, Reinigung und Charakterisierung von Pumilio

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Homologie-Domäne des *H. sapiens* Pumilio1-Proteins (HsPum1HD), im Folgenden als Pumilio-wt (oder Pum-wt) bezeichnet, rekombinant produziert, gereinigt und charakterisiert werden. Pum-wt wurde sowohl für die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung als auch zur Etablierung der Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung verwendet. Des Weiteren wurde dieses Protein für die Etablierung einer neuen Screening-Methode genutzt.

##### 3.1.1. Klonierung und Reinigung des Pumilio-wt Proteins

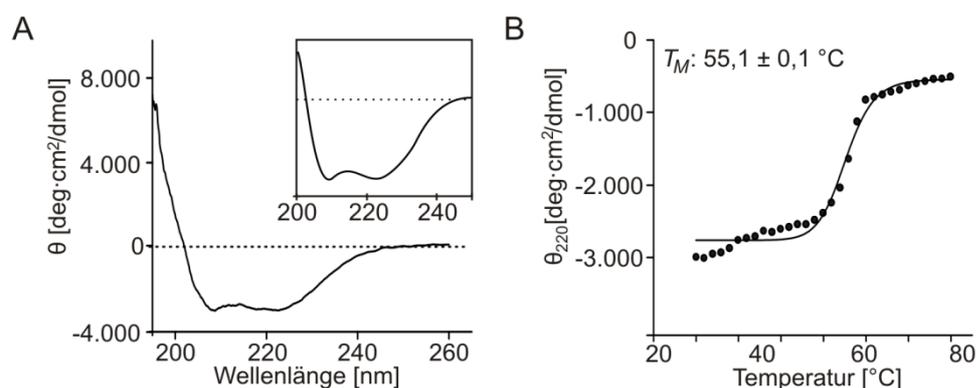
Das Gen codierend für Pumilio-wt (Pum-wt) wurde von T. Hall (NIH, NC, USA) in dem pTYB3 Vektor zur Verfügung gestellt, welcher zur Produktion eines CBD (Chitin-Binde-Domäne)-Pumilio Fusionsproteins führen sollte. Die rekombinante Produktion dieses Fusionsproteins verlief allerdings nicht erfolgreich, so dass das Pumilio-wt Gen in das pET22b+ Plasmid kloniert wurde. Die Klonierung erfolgte mittels PCR und den Primern Pumilio\_NdeI\_fwd und HsPumHD\_BamHI\_rev. Die rekombinante Produktion des Pum-wt Proteins mit C-terminalem His-Tag erfolgte nach Induktion mit 0,1 mM IPTG für 3 h bei 37 °C in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Die Reinigung des 40 kDa Proteins wurde im Anschluss mittels Affinitätschromatographie über eine HisTrap™ Säule und das ÄKTApurifier System durchgeführt. Die Elution erfolgte hierbei mit ca. 150 mM Imidazol (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1 Reinigung des Pumilio-wt Proteins.**

Analyse der Fraktionen der Reinigung des Pumilio-wt Proteins mittels Affinitätschromatographie. A: 10 %-SDS-PAA-Gel nach Coomassie-Färbung; Bio-Rad *Dual Color Precision Plus Protein™ Prestained Standard*. B: Western-Blot mit Anti-His Antikörper. vl: vor Induktion mit 0,1 mM IPTG. P: Bakterienpellet nach Zellyse, L: Überstand nach Zellyse, DL: Durchlauf der HisTrap™ Säule, W: Waschfraktion mit 20 mM Imidazol, Eluat: Eluat mit 150 mM Imidazol.

Mit dieser Produktions- und Reinigungsmethode konnten ca. 30 mg Protein pro Liter Expressionskultur erhalten werden. Nach erfolgreicher Reinigung des Pumilio-wt Proteins wurde dessen Struktur mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht. Es wurde die Differenz der Absorption des links und rechts zirkular polarisierten Lichts bei einer Wellenlänge von 180 bis 260 nm gemessen. In dem CD-Spektrum wird dann die molare Elliptizität  $\theta$  pro Aminosäure aufgetragen. Das CD-Spektrum des Pumilio-wt Proteins (Abbildung 3.2, A) ist typisch für  $\alpha$ -helikale Proteine. Diese Proteine zeichnen sich durch zwei Minima bei ca. 205 und 225 nm sowie ein lokales Maximum bei ca. 215 nm aus, welche auch für Pum-wt deutlich zu erkennen sind. Der Vergleich mit einem CD-Spektrum der Homologie-Domäne des Pumilio-Proteins von Edwards *et al.* (Abbildung 3.2, A Einschub)<sup>290</sup> lässt darauf schließen, dass korrekt gefaltetes Protein erhalten werden konnte. Um die Schmelztemperatur des Proteins zu bestimmen, wurde die Elliptizität bei einer Wellenlänge von 220 nm gemessen, während das Protein mit 1 °C/min von 20 auf 90 °C erhitzt wurde. Aus dem Wendepunkt dieser Kurve wurde die Schmelztemperatur des Proteins von  $55,1 \pm 0,1$  °C ermittelt (berechnet aus zwei unabhängigen Experimenten).



**Abbildung 3.2 Strukturanalyse von Pum-wt mittels CD-Spektroskopie.**

A: CD-Spektrum der Pum-wt Homologie-Domäne. Aufgetragen ist die molare Elliptizität pro Aminosäure. Im Vergleich dazu ist ein Abbild des CD-Spektrums des HsPumHD Proteins von Edwards *et al.*<sup>290</sup> dargestellt (Einschub). B: Schmelzkurve des Pum-wt Proteins. Elliptizität gemessen bei 220 nm über einen Temperaturbereich von 20-90 °C. Die Kurven stellen Einzelmessungen dar, der  $T_M$ -Wert berechnete sich aus zwei unabhängigen Messungen.

Die erhaltenen Daten zeigen, dass eine Produktions- und Reinigungsstrategie für das Pumilio-Protein etabliert werden konnte. Auf Basis dieser Ergebnisse konnten im Folgenden auch alle weiteren verwendeten Pumilio-Varianten produziert und gereinigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei die Varianten MUT3-2 und Pum-Var1 (MUT6-2/7-2) kloniert, produziert und gereinigt. Die Fusionsproteine S10-Pum-wt und Pum-Var1-S11 wurden nach erfolgreicher Klonierung basierend auf dem hier etablierten Protokoll von Stefanie Kellermann produziert und gereinigt.<sup>317</sup>

### 3.1.2. Charakterisierung von Pumilio-wt

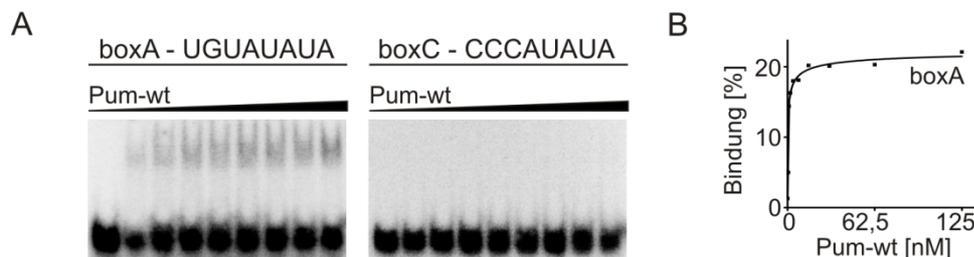
Nach erfolgreicher Reinigung des korrekt gefalteten Pum-wt Proteins sollte dessen Interaktion mit RNA genauer charakterisiert werden. Hierfür wurde zunächst ein Assay zur Untersuchung der Protein-RNA-Interaktionen etabliert. Dieser wurde verwendet, um die Sequenzspezifität von Pumilio-Proteinen für verschiedene RNAs sowie den Einfluss von Puffern und RNA-Modifikationen auf die Bindung zu charakterisieren.

#### 3.1.2.1. Spezifische Bindung von Pum-wt an Target-RNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gel-Shifts zur Analyse von Pumilio-RNA-Interaktionen etabliert und optimiert. Dabei nutzt man, dass RNA-Protein-Komplexe aufgrund ihres höheren Molekulargewichts eine geringere elektrophoretische Mobilität als freie RNA in nativen Gelen aufweisen. Da die RNA im Vergleich zum Protein im deutlichen Unterschuss eingesetzt wird, kann anhand der Bestimmung der gebundenen RNA-Menge die Affinitätskonstante bestimmt werden. Die Detektion der zuvor radioaktiv markierten RNA erfolgt dabei autoradiographisch.

Um die Bindung des gereinigten Pum-wt Proteins an seine Target-RNA zu analysieren, wurde die boxA RNA verwendet, welche das NRE (*nanos response element*), ein natürliches Pumilio-

Bindemotiv aus der *hunchback* mRNA, enthält (siehe Einleitung). Als Kontrolle wurde die boxC RNA verwendet, welche der boxA RNA entspricht, jedoch die Punktmutationen U1C, G2C und U3C enthält. Diese Mutationen sollen die Interaktion des Pumilio-Proteins mit der RNA verhindern.



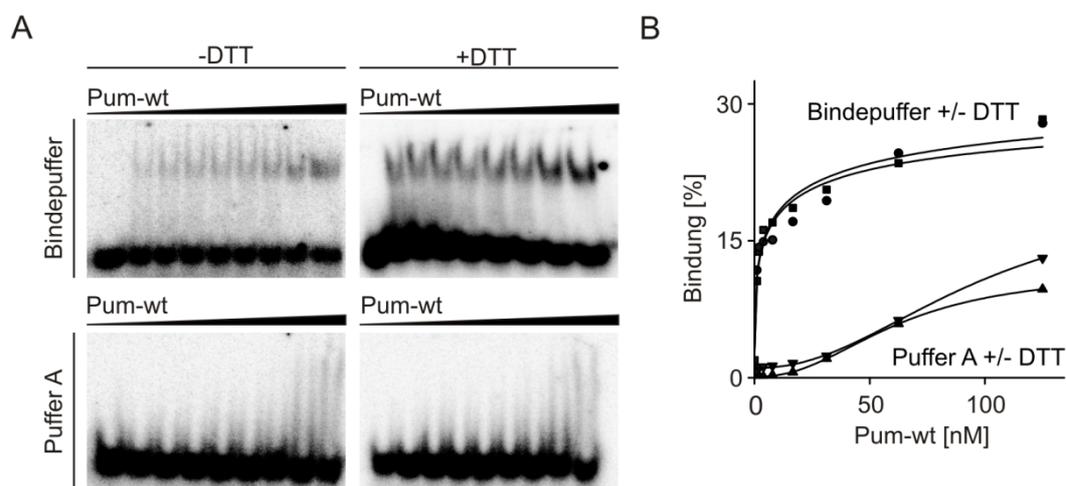
**Abbildung 3.3 Spezifische Bindung von Pumilio-wt an boxA RNA.**

A: Gel-Shifts der boxA und boxC RNA mit dem Pum-wt Protein (0-125 nM); Gel-Shift-PAA-Gel und Autoradiographie. B: Auswertung des Gel-Shifts von Abb. A von Pum-wt mit boxA. Der  $K_D$ -Wert ( $2 \pm 2$  nM) ergab sich aus 7 unabhängigen Experimenten.

Es wurde ein  $K_D$  Wert von  $2 \pm 2$  nM für das Pum-wt Protein mit der boxA RNA bestimmt. In der Literatur findet sich ein Wert von  $0,48 \pm 0,21$  nM für diese RNA.<sup>294</sup> Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass in der zitierten Studie vor den Bindungsstudien die nicht-aggregierte und somit funktionale Proteinmenge in der Lösung bestimmt wurde. Demnach ist der  $K_D$  Wert, welcher in dieser Arbeit gemessen wurde höher, weil vermutlich ein Teil des eingesetzten Proteins aggregiert und nicht funktional ist. Diese Gel-Shifts zeigen, dass Pum-wt, wie erwartet mit boxA aber nicht boxC interagiert.

### 3.1.2.2. Bindungsstudien von Pum-wt in verschiedenen Puffern

Die Bindung des Proteins Pum-wt an die RNA boxA sollte in verschiedenen Puffern untersucht werden. Für die spätere Etablierung einer Screening-Methode für Pumilio, sollte ebenfalls bestimmt werden, ob die Bindung des Proteins von der Anwesenheit reduzierender Substanzen, wie DTT, abhängig ist. Diese Screening-Methode war von der Fluoreszenzmarkierung des Pum-Interaktionspartners Nos abhängig, welche durch DTT gestört wird (siehe Kapitel 3.5). Der Einfluss des DTTs sowie des Bindepuffers und Pum-Puffer A auf die Interaktion mit RNA wurde mittels Gel-Shift untersucht (Abbildung 3.4).



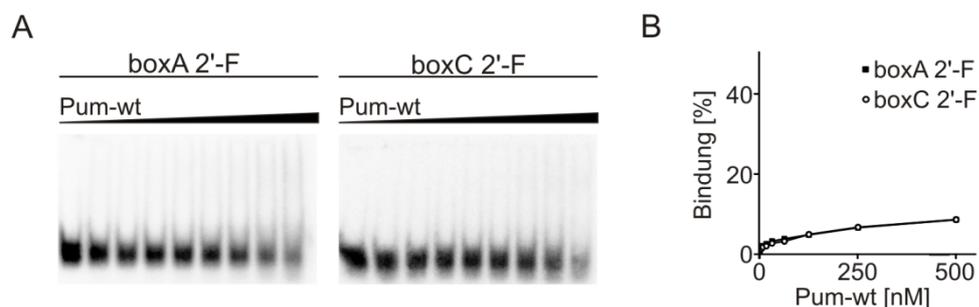
**Abbildung 3.4 Einfluss verschiedener Puffer auf die Bindung von Pum-wt.**

A. Gel-Shifts von boxA mit Pum-wt (0-125 nM) in Bindepuffer oder Pum-Puffer A in An- oder Abwesenheit von 1 mM DTT; Gel-Shift-PAA-Gel und Autoradiographie. B: Analyse der in Abb. A gezeigten Gel-Shifts auf gebundene RNA in Abhängigkeit zur Proteinmenge.

Es wurde gezeigt, dass die Bindung von Pumilio nicht von der Anwesenheit reduzierender Substanzen in dem Bindepuffer abhängig ist. Im Gegensatz dazu kann gezeigt werden, dass die Bindung von Pum-wt sehr stark von dem Puffer abhängt. So wird Bindung des Pum-wt Proteins an die boxA RNA durch die Verwendung von dem Tris-basierten Pum-Puffer A stark verringert, welcher im Gegensatz zu dem HEPES-basierten Bindepuffer weder EDTA noch BSA oder Detergenzien enthält.

### 3.1.2.3. Bindung an 2'-Desoxy-2'-fluor-modifizierte RNA

Für *in vitro* Bindungsstudien von Pumilio an RNA in Lysat, wäre es von Vorteil, wenn das Protein hydrolysestabilisierte RNA bindet. Die 2'-Desoxy-2'-fluor (2'-F)-Modifikation von RNA erhöht deren Stabilität in Lysat, da die RNA nicht mehr als Substrat für RNasen fungieren kann.<sup>318</sup> Um zu überprüfen, ob diese modifizierten RNAs gleiche Bindungsspezifitäten wie nicht-modifizierte RNAs aufweisen, wurden boxA und boxC RNAs unter Verwendung von 2'-Desoxy-2'-fluorpyrimidintriphosphaten hergestellt. Die Bindung des Pumilio-wt Proteins an diese 2'-F-modifizierten RNAs wurde mittels Gel-Shift analysiert (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5 Bindungsstudien von Pumilio-wt mit 2'-Desoxy-2'-fluorpyrimidin-RNA.**

A: Gel-Shifts von Pum-wt (0-500 nM) mit 2'-F-modifizierter boxA und boxC RNA; Gel-Shift-PAA-Gel und Autoradiographie. B: Analyse der Gel-Shifts aus A auf RNA-Bindung in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration.

Der Vergleich der 2'-F-modifizierten boxA und boxC RNAs zeigt deutlich, dass die Bindung des Proteins an die RNA durch deren Modifikation verhindert wird, da für beide RNAs keine signifikante Bindung beobachtet werden konnte. Obwohl die Interaktion von Pumilio mit der RNA über die Basen erfolgt, scheint die Modifikation eine strukturelle Veränderung der RNA zur Folge zu haben, welche eine Bindung verhindert. Diese Ergebnisse schließen eine Verwendung von 2'-Desoxy-2'-fluorpyrimidin-RNA für die Etablierung eines Screening-Methoden in Lysat aus.

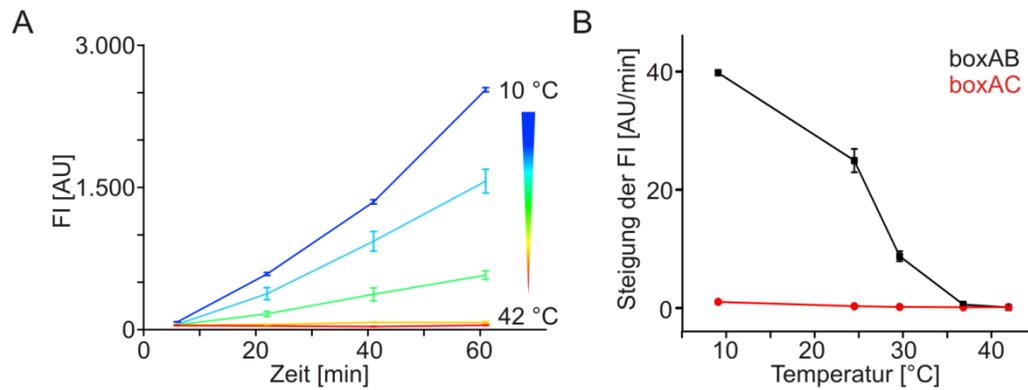
## 3.2. Charakterisierung der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung

Aufbauend auf den Ergebnissen zur Reinigung und Charakterisierung von Pumilio und den Varianten wurde von Stefanie Kellermann im Rahmen ihrer Masterarbeit die Methode der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung (TetFC) entwickelt (siehe Einleitung).<sup>216,317</sup> TetFC stellt eine Methode zur sequenzspezifischen Detektion von RNA *in vitro* dar, bei der eine Proteinkomplementierung des grün fluoreszierenden Proteins durch die Bindung zweier Pumilio-Proteine an die Target-RNA ausgelöst wird. Für diese Methode wurden die beiden  $\beta$ -Faltblätter S10 und S11 aus dem GFP mit den Pumilio-Proteinen Pum-wt sowie Pum-Var1 fusioniert, welche die Bindemotive boxA (UGUAUAUA) beziehungsweise boxB (UUGUAUAUA) binden.<sup>216,294,317</sup> Die Bindung der beiden Pumilios an die Target-RNA boxAB induzierte die Komplementierung der S10 und S11 Faltblätter mit dem GFP-Detektor, welcher die restlichen  $\beta$ -Faltblätter 1-9 beinhaltet. Im Rahmen ihrer Masterarbeit zeigte Stefanie Kellermann, dass die TetFC genutzt werden kann, um RNA sequenzspezifisch zu detektieren. Es wurde ein 75-facher Signalanstieg im Vergleich zur Kontroll-RNA gemessen, eine optimale Linkerlänge von 5 nt zwischen den beiden Pumilio-Bindemotiven und ein Detektionslimit in Puffer von 16 nM RNA bestimmt. Des Weiteren war eine Differenzierung zwischen der boxAB RNA und der Negativkontrolle boxAC bereits nach 20 min möglich.<sup>216,317</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte TetFC charakterisiert werden, um Aussagen über eine potentielle Anwendung *in vivo* treffen zu können. Hierzu wurden die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzkomplementierung (FC), sowie deren Durchführbarkeit in Anwesenheit kompetierender RNAs analysiert.

### 3.2.1. Temperaturabhängigkeit der TetFC

In bisherigen Arbeiten wurde die TetFC bei Raumtemperatur (RT) eingesetzt, um RNA *in vitro* zu detektieren.<sup>216,317</sup> In Zukunft soll diese Methode ebenfalls *in vivo* zum Nachweis endogener RNA verwendet werden, weshalb sie auch bei höheren Temperaturen durchführbar sein sollte. Des Weiteren soll die TetFC im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden, um temperaturinduzierte Strukturveränderungen von RNA zu analysieren. Daher war es notwendig, die Temperaturabhängigkeit der TetFC zu untersuchen. Zur Durchführung einer boxAB-abhängigen Komplementierung wurde die boxAB RNA mit den S10-Pum-wt und Pum-Var1-S11 Proteinen versetzt, bei der jeweiligen Temperatur vor inkubiert und der temperierte GFP1-9 Detektor hinzugefügt. Die Proben wurden bei Temperaturen von 10, 25, 30, 37 sowie 42 °C inkubiert und die Fluoreszenzkomplementierung über einen Zeitraum von 1 h verfolgt. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Detektors, wurde gemessen und die Steigung bestimmt (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6 Temperaturabhängigkeit der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung.**

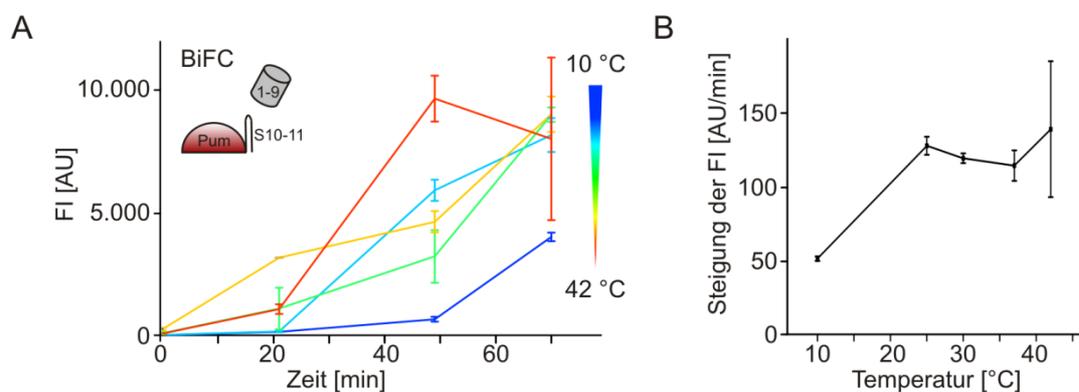
A: Der Anstieg der Fluoreszenzintensität (FI) in Abhängigkeit von boxAB RNA, S10-Pum-wt, Pum-Var1-S11 und GFP1-9 wurde bei verschiedenen Temperaturen (10 °C (dunkelblau), 25 °C (hellblau), 30 °C (grün), 37 °C (gelb) und 42 °C (rot)) über 1 h vermessen; Doppelbestimmung. B: Steigung der Fluoreszenzintensitäten der TetFC in Abhängigkeit von RNA boxAB (schwarz) und boxAC (rot) bei verschiedenen Temperaturen.

In Abbildung 3.6 A ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität (FI) des rekonstituierten GFPs gegen die Zeit aufgetragen. Es ist erkennbar, dass die FI mit höherer Temperatur weniger stark ansteigt. Während die FI bei einer Inkubationstemperatur von 10 °C nach 1 h bereits bei ca. 2.500 AU liegt, ist bei 37 und 42 °C kein Fluoreszenzanstieg im Vergleich zum Anfangszeitpunkt detektierbar. In Abbildung 3.6 B ist die Steigung der FI innerhalb der ersten Stunde in AU/min für die verschiedenen Temperaturen dargestellt. Diese Abbildung verdeutlicht die Temperaturabhängigkeit der TetFC. Es ist zu erkennen, dass die FI mit zunehmender Temperatur langsamer ansteigt und ab 37 °C kein Fluoreszenzanstieg mehr detektierbar ist. Der Vergleich mit der Kontroll-RNA boxAC (rote Punkte) zeigt, dass die Steigung der FI für boxAB bei 37 °C dem Anstieg der FI für boxAC bei 10 °C entspricht und demnach Hintergrundsignal ist. Da das Pumilio-Protein aus *H. sapiens* stammt, wo eine Durchschnittstemperatur von 37 °C vorliegt und die Fluoreszenzkomplementierung dieses GFPs bereits erfolgreich *in vivo* bei 37 °C eingesetzt wurde (siehe Kapitel 1.2.2) entspricht diese Beobachtung nicht den Erwartungen. Die Integrität der RNA im Verlauf der Messung wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und schließt eine Kontamination mit RNasen als Ursache für die fehlende Fluoreszenzkomplementierung bei 37 °C und 42 °C aus. Um zu bestimmen, ob die Temperaturabhängigkeit durch die Proteinzusammenlagerung der S10- und S11- $\beta$ -Faltblätter mit dem GFP1-9-Detektor bedingt wird, wurde im Folgenden die Temperaturabhängigkeit der Proteinkomplementierung ohne Abhängigkeit von RNA gemessen.

### 3.2.1.1. Temperaturabhängigkeit der Proteinkomplementierung

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Zusammenlagerung des GFP1-9-Detektors mit dem S10/S11-Fragment wurde das Protein Pum-wt-S10-S11 verwendet, welches bereits beide  $\beta$ -Faltblätter in richtiger Orientierung trägt (S. Kellermann, unveröffentlichte Daten). Das

Protein wurde bei Temperaturen von 10 °C bis 42 °C mit dem GFP1-9-Detektor inkubiert und der Anstieg der Fluoreszenzintensität über eine Dauer von 70 min gemessen (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7 Temperaturabhängigkeit der Proteinkomplementierung.**

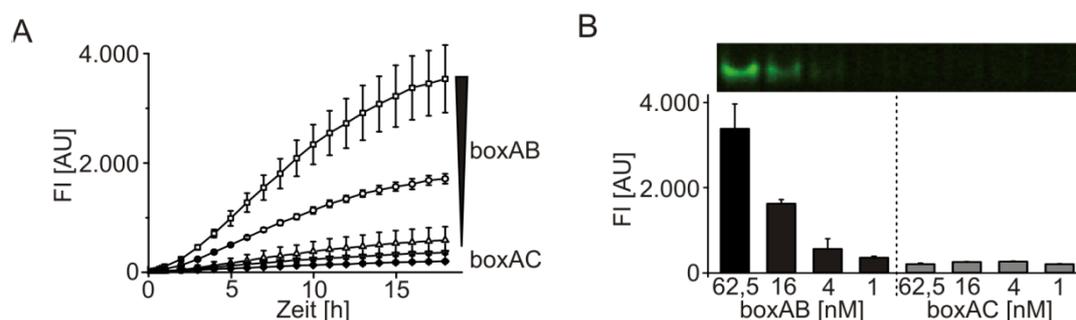
A: Die FI der Komplementierung von Pum-wt-S10-S11 und GFP1-9 wurde bei verschiedenen Temperaturen (10 °C (dunkelblau), 25 °C (hellblau), 30 °C (grün), 37 °C (gelb) und 42 °C (rot)) über 70 min vermessen; Doppelbestimmung. B: Die Steigungen der FI der Proteinkomplementierung aus Abb. A bei verschiedenen Temperaturen.

Die Abbildung 3.7 A zeigt, dass die Fluoreszenzintensität für die Zwei-Komponentenzusammenlagerung sehr schnell ansteigt aber nicht linear verläuft. Die Betrachtung der Steigung der FI (Abbildung 3.7 B) zeigt deutlich, dass die Fluoreszenzkomplementierung bei 10 °C am wenigsten steil ansteigt. Temperaturen von 25-42 °C scheinen die Fluoreszenzkomplementierung im gleichen Maße zu begünstigen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Zusammenlagerung mit dem GFP1-9-Detektor durch höhere Temperaturen nicht negativ beeinflusst wird. Aus diesem Grund scheint die negative Abhängigkeit der TetFC von der Temperatur entweder durch die Interaktion der Pumilio-Proteine mit der RNA oder der beiden  $\beta$ -Faltblätter S10 und S11 miteinander beeinträchtigt zu werden. Diese Beobachtungen sind besonders wichtig für die Messung *in vivo*. Um eine Komplementierung zu gewährleisten, sollten die Bakterien oder Zellen bei höchstens 30 °C kultiviert werden, da bei dieser Temperatur noch ein Signalanstieg zu detektieren war. Für die Entwicklung einer Strategie zur späteren Anwendung der TetFC zur Analyse temperaturinduzierter Strukturveränderungen *in vitro* mussten diese Ergebnisse ebenfalls in Betracht gezogen werden.

### 3.2.2. Messung der TetFC in Anwesenheit kompetierender RNA

Um eine Detektion von RNA in zukünftigen Experimenten *in vivo* zu erlauben, muss neben der passenden Temperatur auch gewährleistet sein, dass die TetFC in Anwesenheit anderer RNA-Spezies erfolgreich und spezifisch verläuft. Aus diesem Grund wurde, in Zusammenarbeit mit Marina Mutas, die TetFC verwendet, um die boxAB Target-RNA in Anwesenheit von kompetierender RNA sequenzspezifisch zu detektieren. Dazu wurden 10  $\mu$ g bakterielle Total-

RNA verwendet, welche zuvor aus *E. coli* Zellen isoliert wurde, und mit verschiedenen Konzentrationen der Target-RNA versetzt, bevor die TetFC durchgeführt wurde. Die Messung der FI über 18 h zeigt, dass die sequenzspezifische Detektion der boxAB RNA auch in Gegenwart kompetierender RNAs noch möglich ist (Abbildung 3.8 A). Das Fluoreszenzsignal mit boxAB ist nach 18 h 17-fach höher als für die Kontroll-RNA boxAC. Die Auftragung der Werte nach 18 h zeigt, dass das Fluoreszenzsignal zwar proportional zur Konzentration der Target-RNA abnimmt, die Target-RNA aber noch bis zu einer Konzentration von 16 nM nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.8 B).



**Abbildung 3.8 Spezifische RNA-Detektion in Anwesenheit kompetierender RNA.**

A: Anstieg der FI über 18 h induziert durch boxAB (62,5 nM-1 nM) oder boxAC (62,5 nM) RNA in Anwesenheit von 10  $\mu$ g Total-RNA; Doppelbestimmung. B: oben: 10 % natives Protein-PAA-Gel, Fluoreszenzmessung bei 530 nm; unten: FI Endwerte der TetFC-Messungen, welche in Abb. A dargestellt sind, ausgelöst durch verschiedene Konzentrationen boxAB oder boxAC RNA, inklusive der Werte für 16-1 nM für boxAC. Diese Messung wurde in Zusammenarbeit mit Marina Mutas im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.<sup>319</sup>

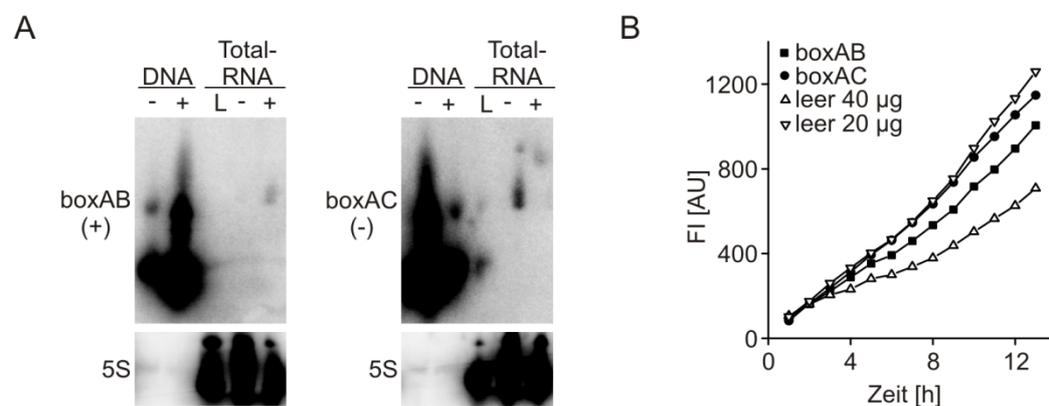
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Detektion von RNA mittels TetFC auch in Anwesenheit anderer RNA-Spezies sequenzspezifisch und sensitiv ist. Auch in Anwesenheit bakterieller Total-RNA konnte RNA bis zu einer Konzentration von 16 nM nachgewiesen werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für eine zukünftige RNA-Detektion *in vivo*. In anderen Experimenten konnte gezeigt werden, dass TetFC mit *in vitro* hergestellter RNA ebenfalls in *E. coli* Zellysat angewendet werden konnte, um RNA spezifisch zu detektieren.<sup>216</sup> Durch die Anwesenheit des Zellysat wurde das Signal für die boxAB RNA dabei zwar um ca. die Hälfte reduziert, war aber immer noch etwa dreimal so hoch wie für die Negativkontrolle boxAC. Diese Ergebnisse in Kombination mit der Annahme, dass alle TetFC-Komponenten in Zellen produziert werden könnten, erlauben die Behauptung, dass TetFC *in vivo* möglich sein sollte.

### 3.2.3. TetFC zum Nachweis *in vivo* produzierter RNA

Nach der erfolgreichen Detektion *in vitro* produzierter RNA in Anwesenheit kompetierender RNA (siehe vorheriges Kapitel), sollte getestet werden, ob es auch möglich ist, *in vivo* hergestellte RNA mittels TetFC nachzuweisen. Dazu wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit den Plasmiden pSK17-boxAB oder pSK17-boxAC transformiert, die RNA wurde produziert und im

Anschluss als Teil der Total-RNA isoliert. Die Integrität der RNA wurde mittels Northern-Blot aus PAA-Gelen und komplementärer Sonden nachgewiesen (Abbildung 3.9 A). Beide RNAs wurden dabei in der jeweiligen Total-RNA nachgewiesen, jedoch nicht in Total-RNA ohne Target-RNA-Überexpression vom Plasmid (L). Der Vergleich mit der 5S rRNA Sonde zeigte, dass gleiche Mengen an Total-RNA verwendet wurden. Als Kontrollen für den Northern-Blot dienten boxAB (+) und boxAC (-) DNAs, welche ebenfalls ein Signal mit der entsprechenden Sonde gaben, aber auch von der jeweils anderen Sonde gebunden wurden. Diese unspezifische Bindung der Sonde lässt sich dadurch erklären, dass beide DNAs/RNAs sich nur durch drei Basen unterscheiden. Im Vergleich der Signale der RNAs mit der Kontroll-DNA wurden Konzentration von ca. 193 nM der boxAB und 126 nM der boxAC RNA in der Total-RNA Lösung abgeschätzt. Nachdem die RNA mittels Northern-Blot nachgewiesen wurde, sollte sie auch mit Hilfe der TetFC detektiert werden.

Für die TetFC wurden je 40 µg der Total-RNA eingesetzt, was ungefähr 23 nM für boxAB und 15 nM für boxAC entsprach. Von der Kontroll-Total-RNA ohne Target wurden sowohl 40 µg als auch 20 µg eingesetzt. Die Messung über 13 h zeigt, dass die Fluoreszenzintensitäten für alle Proben gleich ansteigen, das Signal somit nicht spezifisch ist (Abbildung 3.9 B). Die boxAB RNA lässt sich nicht von der boxAC unterscheiden, und die 20 µg Probe der Kontroll-Total-RNA weist ebenfalls die gleiche FI auf.



**Abbildung 3.9 Nachweis *in vivo* produzierter boxAB RNA mittels TetFC.**

A: Northern-Blot zur Detektion der *in vivo* produzierten boxAB (+) und boxAC (-) RNA in Total-RNA. Als Kontrollen dienen boxAB (+) und boxAC (-) DNA, sowie Total-RNA ohne Target-RNA (L); Northern-Blot aus PAA-Gel mit boxAB (links) und boxAC (rechts) Sonde, sowie 5S rRNA Sonde (unten); Autoradiographie B: Anstieg der FI ausgelöst durch 40 µg Total-RNA, welche boxAB (~23 nM) oder boxAC (~15 nM) RNA enthält. Als Kontrolle dienen 20 und 40 µg Total-RNA ohne Target-RNA („leer“). Einzelmessung.

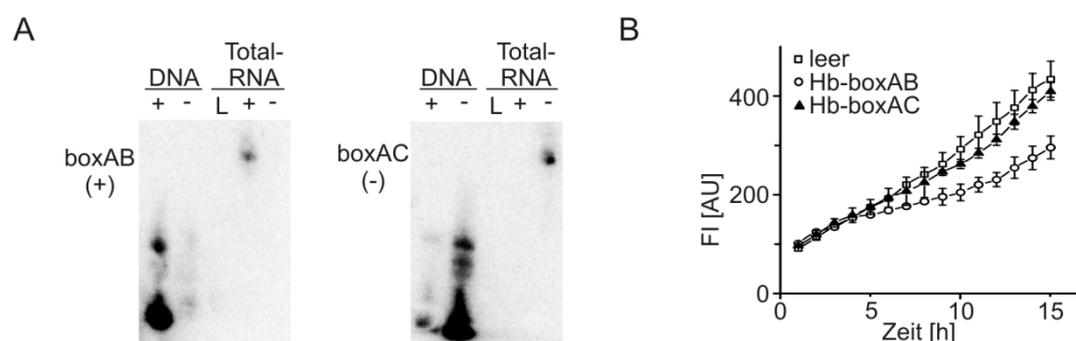
Die spezifische Detektion der *in vivo* produzierten boxAB RNA war nicht möglich. Dies lässt sich eventuell dadurch erklären, dass die Menge an Target-RNA innerhalb der Total-RNA zu gering ist, um nachgewiesen zu werden. Die *in vitro* produzierte RNA konnte mit einer Konzentration von 16 nM in 10 µg Total-RNA detektiert werden. Von der *in vivo* produzierten RNA waren

lediglich 23 nM in 40 µg Total-RNA vorhanden. Zusätzlich dazu, dass das Target-RNA:Total-RNA Verhältnis ca. 3-mal kleiner ist, wurde der Einfluss von 40 µg Total-RNA auf die Komplementierung noch nicht getestet.

Um die Halbwertszeit der Target-RNA zu verlängern, wurde diese von ca. 40 nt auf ca. 120 nt verlängert. Dazu wurden, in Zusammenarbeit mit Julia Sandberg-Meinhardt, die Plasmide pSK17-Hb-boxAB und pSK17-Hb-boxAC kloniert. Diese Plasmide kodieren für die boxAB und boxAC RNA, welche am 5'-Ende durch die natürliche Sequenz der *hunchback* mRNA verlängert wurden. Nach Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit den Plasmiden wurde die RNA Produktion induziert und nach 60 min die Total-RNA isoliert.

Die Produktion der RNA wurde mittels Northern-Blot und sequenzspezifischen Sonden kontrolliert (Abbildung 3.10 A). Als Kontrollen dienten Hb-boxAB und Hb-boxAC DNAs, welche – wie bereits für die boxAB und boxAC DNA beobachtet – ein schwaches Cross-Signal gaben. Die Konzentrationen der Target-RNAs in der Total-RNA wurden im Vergleich mit den DNA-Kontrollen abgeschätzt und betragen ca. 1 µM für Hb-boxAB und 0,55 µM für Hb-boxAC RNA. Diese Konzentrationen zeigten, dass die Menge an Target-RNA durch die Verlängerung der RNA erhöht werden konnte. Dies führte dazu, dass deutlich weniger Total-RNA für die TetFC-Messung verwendet werden musste.

Von den jeweiligen Total-RNAs wurden 20 µg für die TetFC Messung eingesetzt, was einer finalen Konzentration von 68 nM für Hb-boxAB und 17 nM für Hb-boxAC entsprach. Der Anstieg der FI wurde über 15 h verfolgt und mit 20 µg Kontroll-Total-RNA verglichen (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10 Nachweis *in vivo* produzierter Hb-boxAB RNA mittels TetFC.**

A: Northern-Blot aus PAA-Gel zur Detektion der *in vivo* produzierten Hb-boxAB (+) und Hb-boxAC (-) RNA aus Total-RNA. Als Kontrollen dienen Hb-boxAB (+) und Hb-boxAC (-) DNA, sowie Total-RNA ohne Target-RNA (L); Northern-Blot mit boxAB-(links) und boxAC-(rechts) Sonde; Autoradiographie. B: Anstieg der FI ausgelöst durch 20 µg Total-RNA, welche Hb-boxAB (~68 nM) oder Hb-boxAC (~17 nM) RNA enthielt. Als Kontrolle dienen 20 µg Total-RNA ohne Target-RNA („leer“). Doppelbestimmung.

Es ist zu sehen, dass die FI für alle drei Proben weniger stark ansteigt, als in der vorherigen Messung. Dies wird möglicherweise dadurch bedingt, dass nur 20 µg anstelle von 40 µg Total-RNA eingesetzt wurden. Eine Differenzierung der Hb-boxAB RNA und der Hb-boxAC Probe ist

jedoch nicht möglich. Die Hb-boxAB RNA überschreitet die Hintergrundfluoreszenz der Kontrollen nicht und wurde demnach nicht detektiert.

Eine mögliche Ursache dafür könnte die Anwesenheit von 20 µg Total-RNA sein. In Vorversuchen zur Detektion *in vitro* produzierter RNA wurden nur 10 µg Total-RNA verwendet. Es ist möglich, dass die 20 µg Total-RNA die Komplexbildung aus Target-RNA und den Pumilio-Proteinen sowie die Proteinkomplementierung behindert. In weiteren Versuchen könnte die Menge an Total-RNA auf 10 µg reduziert werden, um die nun enthaltenen 34 nM Hb-boxAB RNA zu detektieren. Eventuell hat die Verlängerung der RNA auch zu einer strukturellen Veränderung geführt, welche eine Bindung der Pumilio-Proteine verhindert. Auch könnte es möglich sein, dass trotz der Isolation von Total-RNA mittels heißer Phenol-Chloroform-Extraktion noch Proteine in der Lösung vorliegen, welche an die RNA binden und so die Interaktion stören. Um den Abbau der Target-RNA durch RNasen zu verringern und das Signal der TetFC zu verstärken, könnte die Messung in zukünftigen Experimenten anstatt bei RT bei 4-10 °C durchgeführt werden.

### 3.3. TetFC zur Strukturanalyse

Die Methode der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung wurde entwickelt, um RNA sequenzspezifisch zu detektieren. Für die erfolgreiche Detektion war es erforderlich, dass zwei Pumilio-Bindemotive in der richtigen Orientierung zu einander vorlagen und optimaler Weise im Abstand von 5 nt aufeinanderfolgen. Schon eine Verkürzung oder Verlängerung dieser Linkerregion um 2 nt hatte eine Reduktion der Fluoreszenzintensität um 83 bzw. 69 % zur Folge.<sup>216,317</sup> Diese Abhängigkeit der TetFC von der Distanz der beiden Pumilio-Proteine zu einander deutet darauf hin, dass diese Methode potentiell auch verwendet werden könnte, um strukturelle Veränderungen von RNA zu beobachten.

Strukturelle Veränderungen von RNA spielen eine große Rolle in der Regulation der Genexpression. So regulieren Prokaryoten die Genexpression vieler Transkripte über RNA-Strukturelemente, so genannte Riboswitches, welche die Translation, Transkription oder die Spaltung von RNA steuern können.<sup>320-322</sup> Auch in Eukaryoten spielen RNA-Strukturveränderungen eine große Rolle, so durchlaufen zum Beispiel die RNAs im Spleißosom und im Ribosom mehrere Strukturveränderungen.<sup>323,324</sup>

In dieser Arbeit wurde daher versucht, die TetFC zu nutzen, um verschiedene strukturelle Veränderungen von RNA zu untersuchen. Zum einen wurde die Ausbildung einer Stamm-Schleife-Struktur detektiert, welche einer prokaryotischen Transkriptions-Terminations-Struktur nachgebildet wurde. Neben der Detektion dieser Struktur, welche durch die Ausbildung von Basenpaaren induziert wird, sollten Strukturveränderungen untersucht werden, welche durch Temperaturveränderungen oder Zugabe von Metaboliten induziert werden.

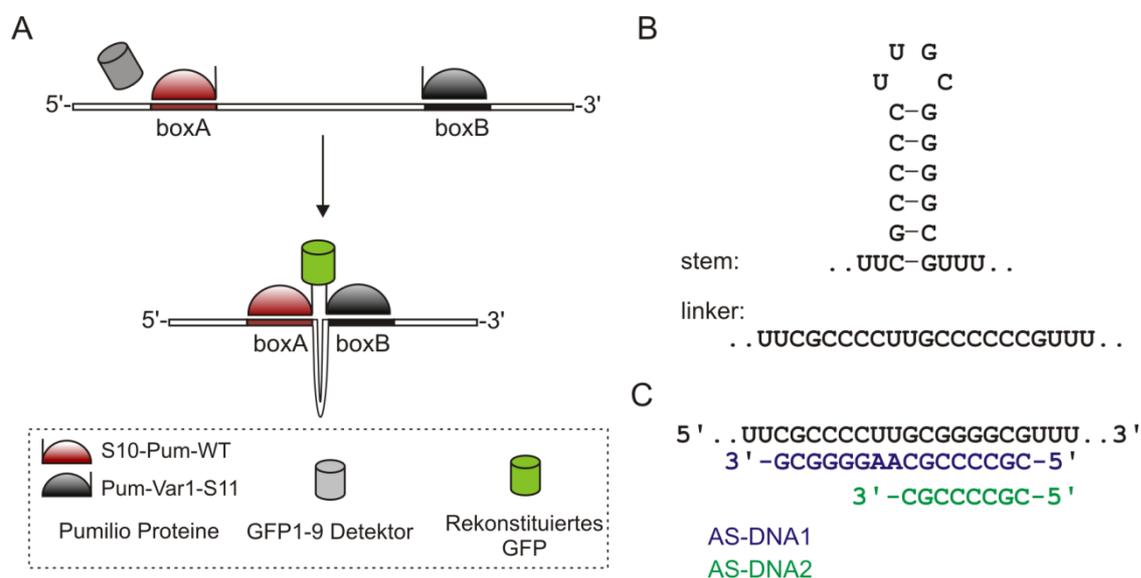
#### 3.3.1. TetFC zum Nachweis eines Transkriptions-Terminators

Die Stamm-Schleife-Struktur stellt ein bekanntes RNA-Sekundärstrukturelement dar. Während der intrinsischen, Rho-unabhängigen Transkriptions-Termination bildet die neu synthetisierte RNA nach dem Stoppcodon eine GC-reiche Stamm-Schleife-Struktur aus, auf die eine U-haltige Sequenz folgt.<sup>325</sup> Diese Struktur hat zur Folge, dass das DNA/RNA-Hybrid verkürzt und der Komplex destabilisiert wird. Es folgt die Freisetzung der RNA und die Beendigung der Transkription.<sup>326</sup>

Um die Ausbildung einer Terminations-Struktur zu detektieren, wurde eine RNA-Sequenz entworfen, welche die beiden Pumilio Motive boxA und boxB trägt, die mit einer 21 nt langen Region verknüpft sind (boxAstemB). Diese Region ist besonders GC-reich und ähnelt bakterieller Transkriptions-Terminations-Sequenzen (Abbildung 3.11).

Nach Ausbildung einer Stamm-Schleife-Struktur sollten sich die beiden Bindemotive in einem Abstand von etwa 5 nt befinden, was eine Komplementierung des GFPs erlauben sollte (Abbildung 3.11). Um beweisen zu können, dass die strukturelle Veränderung der RNA die FC

zur Folge hat, wurde eine Kontroll-RNA designt, welche eine 21 nt lange Linkerregion trägt, die keine Stamm-Schleife-Struktur ausbilden kann (boxAlinkerB).



**Abbildung 3.11 Schema des Nachweises einer Stamm-Schleife-Struktur.**

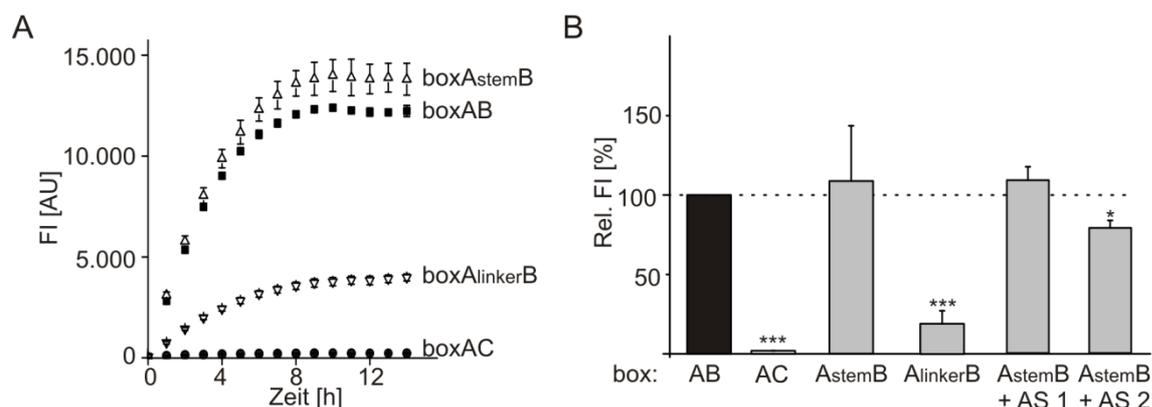
A: Illustration der TetFC zum Nachweis einer Stamm-Schleife-Struktur. Bindung der Proteine S10-Pum-wt und Pum-Var1-S11 an die Pumilio-Bindemotive boxA und boxB sollte nach Ausbildung der Stamm-Struktur zur Fluoreszenzkomplementierung mit GFP1-9. B: Sequenz der Stamm-Schleife-Struktur (stem) bzw. der Linkerregion (linker), welche zwischen beiden Pumilio-Bindemotiven eingefügt wurde. C: Sequenzen der Antisense (AS)-DNAs 1 und 2 in Orientierung zur Stamm-Schleife-Sequenz der boxAstemB RNA.

Die beiden RNAs boxAstemB und boxAlinkerB wurden mit den TetFC Proteinen inkubiert und der Anstieg der Fluoreszenz über 14 h verfolgt (Abbildung 3.12 A). Zum Vergleich der FI wurden die beiden RNAs boxAB und boxAC ebenfalls gemessen.

Anhand von Abbildung 3.12 A ist zu erkennen, dass der Anstieg der Fluoreszenz, ausgelöst durch die boxAstemB RNA, analog zu boxAB verläuft. Die Geschwindigkeiten der Fluoreszenzkomplementierungen innerhalb der ersten 2 h sind nahezu identisch (23 bzw. 25 AU/min) und die maximale Fluoreszenzintensität liegt in beiden Fällen bei ca. 12.000-14.000 AU. Im Vergleich dazu liegt die Fluoreszenz für die boxAC RNA bei 241 AU und für die boxAlinkerB RNA bei ca. 4.000 AU. Um genauere Aussagen über die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten treffen zu können, wurden die Ergebnisse aus sechs Messungen verglichen und relativ zu der Fluoreszenz der boxAB RNA aufgetragen (Abbildung 3.12 B). Es wird deutlich, dass sich die FI, ausgelöst durch boxAstemB, nicht von der boxAB RNA unterscheiden lässt (relative FI 108 %). Im Vergleich mit der FI in Gegenwart der Kontroll-RNA boxAlinkerB (relative FI von 25 %) verdeutlicht dies, dass die Ausbildung der Stamm-Schleife-Struktur zur Ausbildung einer RNA führt, welche die FC auslöst. Trotzdem ist eine FI von 25 % der boxAlinkerB RNA weit über der Negativkontrolle (boxAC rel. FI 3 %) und lässt vermuten, dass längere Linkerlängen ausreichen, um einen gewissen Anteil an FC zu erlauben. Dies

entspricht auch den Beobachtungen für die TetFC mit einer Linkerlänge von 7 nt, welche ein 31 %iges Signal auslöst.<sup>216,317</sup>

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass es keinen Einfluss auf die Fluoreszenzkomplementierung hat, ob die Faltung der boxAlinkerB RNA nach Denaturierung durch langsames oder schnelles Abkühlen auf RT erfolgt.



**Abbildung 3.12 Nachweis der Ausbildung einer Stamm-Schleife-Struktur mittels TetFC.**

A: Anstieg der FI bei 530 nm über 14 h für boxAB, boxAstemB, boxAlinkerB und boxAC RNA mit S10-Pumwt, Pum-Var1-S11 und GFP1-9; Doppelbestimmung. B: Relative FI der TetFC induziert durch boxAB, boxAstemB, boxAlinkerB und boxAC RNAs nach 8 h Inkubation. Die FI in Abhängigkeit von boxAB wurde auf 100 % gesetzt. Mittelwerte aus mindestens 4 Messungen. Die Werte nach Inkubation mit den Antisense DNAs AS 1 und AS 2 entsprechen je einer Doppelbestimmung. AS 2 wurde im dreifachen Überschuss zur boxAstemB RNA eingesetzt.

Um einen weiteren Beweis dafür zu erbringen, dass die Ausbildung der Stamm-Schleife-Struktur die FC auslöst, sollte diese Faltung verhindert werden. Dafür wurden zwei Antisense (AS)-DNAs verwendet, welche komplementär zu der gesamten Stamm-Sequenz (AS 1-DNA) oder der halben Stamm-Sequenz (AS 2-DNA) waren (siehe Abbildung 3.11 C). Durch Inkubation der boxAstemB RNA mit diesen Antisense-DNAs sollte die Ausbildung der Stamm-Schleife-Struktur und die folgende FC verhindert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Inkubation mit der AS 1-DNA keine Auswirkung auf die FI hatte (Abbildung 3.12 B). Die FI betrug nach 8 h ebenfalls 108 % der boxAB Fluoreszenz, was nicht unterscheidbar war von der boxAstemB Fluoreszenz (108 %). Demnach war es nicht möglich die Ausbildung der Stamm-Schleife-Struktur zu verhindern. Um eine Hybridisierung der AS 1-DNAs untereinander sowie eine intramolekulare Ausbildung einer Stamm-Schleife-Struktur zu umgehen, wurde die AS 2-DNA verwendet. Ein 3-facher Überschuss an AS 2-DNA führte zu einer leichten Reduzierung des Fluoreszenzsignals (78 % im Vergleich zu boxAB). Demnach konnte die Ausbildung der Stamm-Schleife-Struktur nur bei einem Teil der RNAs verhindert werden. Dies weist auf starke Wechselwirkungen innerhalb des RNA-Moleküls hin, welche den intermolekularen Wechselwirkungen vorgezogen werden, welche aufgrund der RNA-DNA-Hybridisierung eigentlich begünstigt werden müssten.

Eine mögliche Theorie zur Erklärung dieses Phänomens wäre, dass die beiden RNA-Stränge mit dem DNA-Strang eine Tripelhelix ausbilden, und diese dazu führt, dass die Bindemotive wieder in die korrekte Position gebracht werden. Tripelhelices entstehen typischerweise aus der Anlagerung eines pyrimidinhaltigen Oligonukleotidstranges an den purinhaltigen Strang einer Doppelhelix.<sup>327</sup> Da in dieser Arbeit eine RNA-Doppelhelix vorliegt, welche aus zwei Strängen besteht, die hauptsächlich purin- bzw. pyrimidinhaltig sind (siehe Abbildung 3.11 B), liegt die Vermutung nahe, dass diese eine Tripelhelix mit dem pyrimidinhaltigen DNA-Strang ausbildet. Diese Theorie erscheint aber aufgrund der Beobachtungen von Han *et al.* unwahrscheinlich, da diese zeigten, dass Tripelhelices aus doppelsträngiger RNA und einzelsträngiger pyrimidinhaltiger DNA sehr instabil sind.<sup>327</sup> Um Sicherheit zu erlangen, könnte die Ausbildung einer Tripelhelix mittels Titrationsexperimenten, NMR oder Röntgenstrukturanalysen untersucht werden.

### 3.3.2. TetFC zum Nachweis eines RNA-Thermometers

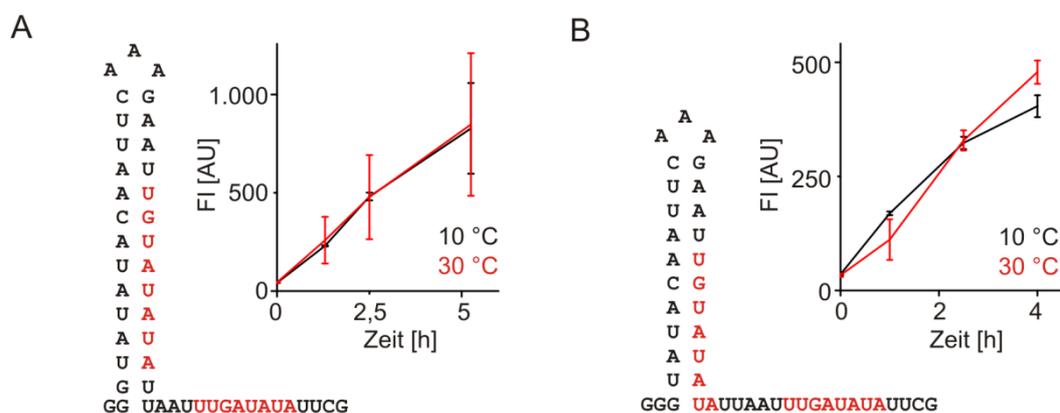
RNA-Thermometer sind spezialisierte Formen von Riboswitches, welche eine Möglichkeit von Mikroorganismen darstellen, auf globale Änderungen zu reagieren. Diese RNA-Sensoren ändern ihre Sekundärstruktur in Abhängigkeit der Temperatur. In einem typischen RNA-Thermometer ist die Shine-Dalgarno-Sequenz, welche sich in den 5'-untranslatierten Regionen (UTR) prokaryotischer mRNAs befindet, in ein Sekundärstrukturelement eingebunden, wodurch die Bindung der Ribosomen verhindert wird. Erst die Destabilisierung der doppelsträngigen Bereiche innerhalb dieser Struktur durch höhere Temperaturen macht die Sequenz frei zugänglich und erlaubt eine Bindung der Ribosomen. Mit Hilfe von RNA-Thermometern regulieren Bakterien die Genexpression als Antwort auf Hitze- oder Kälteschock bzw. Phageninfektion.<sup>328</sup>

RNA-Thermometer ähneln der – zuvor vermessenen – Stamm-Schleife-Struktur und zeichnen sich durch thermale Regulierbarkeit aus. Daher sollten RNA-Thermometer in dieser Arbeit genutzt werden, um die Ausbildung einer Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Temperatur mittels TetFC zu verfolgen.

In vorherigen Experimenten konnte aber gezeigt werden, dass die TetFC nur in einem Rahmen von 10-30 °C erfolgreich durchzuführen ist und bei höheren Temperaturen keine Fluoreszenzkomplementierung zu beobachten ist. Diese Einschränkung erschwerte das Design eines RNA-Thermometers. So konnten keine Thermometer verwendet werden, welche die beiden Pumilio-Bindemotive durch eine Stamm-Struktur miteinander verbinden, die bei höheren Temperaturen aufschmelzen. Das Prinzip dieses Thermometers wäre, dass das Ausbleiben des Fluoreszenzsignals aufgrund der räumlichen Trennung der beiden Pumilio Proteine auftritt. Da aber gezeigt wurde, dass die TetFC bei höheren Temperaturen auch ohne das Thermometer ein schwächeres Signal auslöst, wäre es unmöglich, die Abnahme der FC einer

strukturellen Veränderung zuzuordnen. Aus diesem Grund wurden RNA-Thermometer entworfen, welche beide Pumilio-Bindemotive im Abstand von 5 nt tragen, jedoch eine Verlängerung am 5'-Ende der RNA aufweisen, die zur Ausbildung eines doppelsträngigen Bereichs führen sollte. Diese Stamm-Struktur sollte das boxA Bindemotiv umfassen und demnach die TetFC verhindern (Abbildung 3.13). Erst das Destabilisieren der Stamm-Struktur bei höheren Temperaturen sollte die Bindung beider Pumilios und die Ausbildung der TetFC ermöglichen. Die temperaturbedingte Veränderung der Struktur sollte mittels Detektion des Fluoreszenzsignals verfolgt werden. Die erschwerte FC bei höheren Temperaturen würde in diesem Fall zwar auch die Signalstärke reduzieren, aber eine Zuordnung zur strukturellen Veränderung nicht verhindern.

Es wurden zwei RNAs entworfen, welche sich in der Länge des doppelsträngigen Bereiches und der damit einhergehenden Schmelztemperatur unterschieden. Die Sequenzen sowie die – mit Mfold <sup>329</sup> vorhergesagten – Sekundärstrukturen der RNAs sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Die RNA, welche in A dargestellt ist, sollte einen Schmelzpunkt von 28 °C und die RNA in B von 24 °C haben (berechnet mit OligoCalc <sup>330</sup>). Beide RNAs wurden denaturiert und auf 10 °C sowie 30 °C abgekühlt, um anschließend als Templat für die TetFC zu dienen. Die Entwicklung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur wurde über 4-5 h verfolgt (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13 Nachweis temperaturinduzierter RNA-Strukturveränderungen.**

Vorhergesagte Struktur der entworfenen RNA-Thermometer (nach Mfold <sup>329</sup>) und Anstieg der FI über 4-5 h bei 10 °C und 30 °C, Doppelbestimmung. A: 28 °C RNA-Thermometer. B: 24 °C RNA-Thermometer.

Es ist zu erkennen, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensitäten für beide RNAs keinen Unterschied bei 10 oder 30 °C aufweist (Abbildung 3.13 A, B). Die Fluoreszenzintensitäten liegen für das 28 °C-RNA-Thermometer nach 1 h bei ca. 250 AU und für das 24 °C-RNA-Thermometer bei ca. 125 AU. Das entspricht den Werten der boxAB RNA bei 30 °C (500 AU, Kapitel 3.2.1) oder der Negativkontrolle boxAC bei einer optimalen Temperatur von 10 °C und gleichen Proteinkonzentrationen (100 AU, Kapitel 3.2.1). Im Vergleich dazu lag die FI der Positivkontrolle boxAB nach 1 h bei 10 °C schon bei 2.500 AU (Kapitel 3.2.1).

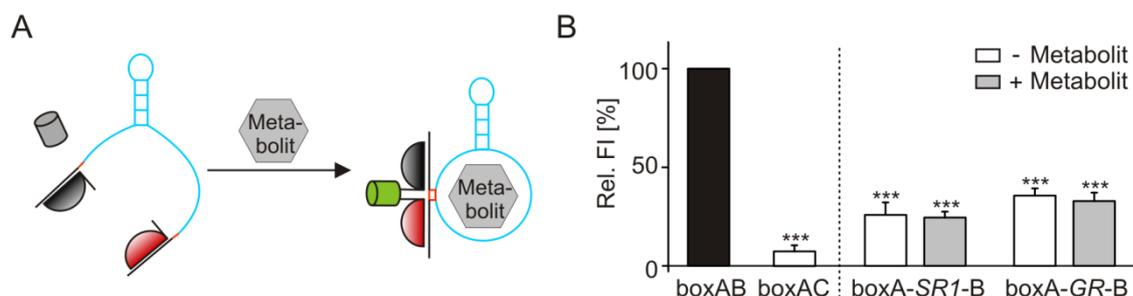
Dies bedeutet, dass entweder kein struktureller Unterschied der RNAs bei beiden Temperaturen vorliegt, oder die FI nach Aufschmelzen der Stamm-Struktur nicht ausreichend ist, um detektiert zu werden. Der erste Fall würde bedeuten, dass die RNAs bei beiden Temperaturen Stamm-Struktur aufweisen, welche die TetFC verhindert, oder dass auch bei 10 °C der doppelsträngige Bereich aufgeschmolzen ist. Dieses würde den berechneten Schmelzpunkten von 24 °C und 28 °C widersprechen. Um Klarheit darüber zu erlangen, ob die RNA einzel- oder doppelsträngig vorliegt könnten Schmelzkurven bestimmt werden.

Es ist ebenfalls möglich, dass beide RNAs die vorhergesagten unterschiedlichen Strukturen aufweisen, die resultierende FC aber durch die Einschränkungen der Methode bei höheren Temperaturen wieder herabgesetzt wird.

### 3.3.3. TetFC zum Nachweis metabolitinduzierter RNA-Strukturveränderungen

Riboswitches sind RNA-Sequenzelemente, welche typischerweise in den 5'-UTRs von prokaryotischen Genen auftreten und Einfluss auf die Transkription oder Translation sowie Spaltung der RNA haben.<sup>320-322</sup> Sie bilden bestimmte Sekundärstrukturen aus und beinhalten eine Aptamerdomäne, eine Translationsplattform und eine *switching*-Sequenz. Durch Bindung eines Liganden, z. B. eines Metabolits, an die Aptamerdomäne des Riboswitches, verändert sich die Sekundärstruktur der RNA, so dass die Bindung eines Liganden zur Aktivierung oder Unterdrückung der Translation oder Transkription führt.<sup>331</sup> Beispiele für Riboswitches, die die Genexpression sowohl auf Ebene der Transkription als auch der Translation regulieren können, sind die SAM (S-Adenosylmethionin)-Riboswitches, von denen in Bakterien drei Klassen vertreten sind (zusammengefasst in <sup>332</sup>).

Da ein Ziel dieser Arbeit der Nachweis struktureller Veränderungen von RNA war, sollte versucht werden, das Anschalten eines Riboswitches durch TetFC nachzuweisen. Hierzu wurden ein SAM-III-Riboswitch sowie ein Guanin-Riboswitch verwendet, welche bereits kristallisiert und charakterisiert wurden.<sup>332,333</sup> Angelehnt an Paige *et al.*<sup>334</sup> wurden zwei RNA-Sequenzen entworfen, welche jeweils die Aptamerdomänen des SAM-Riboswitches oder des Guanin-Riboswitches zwischen den boxA und boxB Pumilio-Bindemotiven trugen. Eine strukturelle Veränderung der RNA durch Bindung der Metabolite sollte dazu führen, dass die Bindemotive in passende räumliche Nähe voneinander gebracht werden, um die TetFC induzieren zu können (Abbildung 3.14 A). Die entworfene boxA-SR1-B RNA (SR: SAM-Riboswitch) wurde mit einem zusätzlichen GC-Paar an den Enden der originalen Aptamerdomäne versehen, welches die Strukturausbildung verstärken sollte.<sup>334</sup> Die boxA-GR-B RNA (GR: Guanin-Riboswitch) hingegen wurde ohne eine solche Verlängerung hergestellt. Beide RNAs wurden mit den jeweiligen Metaboliten inkubiert und im Anschluss für die TetFC verwendet (Abbildung 3.14 B).



**Abbildung 3.14 Nachweis metabolitinduzierter Veränderungen der RNA-Struktur.**

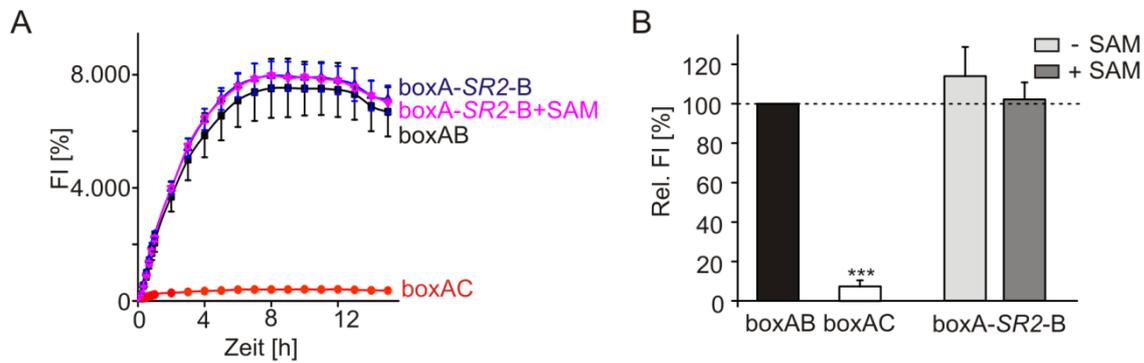
A: Schema der Strukturveränderungen und der resultierenden Fluoreszenzkomplementierung. B: Relative FI der TetFC nach 8 h in Abhängigkeit der RNAs *boxAB*, *boxAC*, *boxA-SR1-B* und *boxA-GR-B* und der Metabolite SAM bzw. GTP. Die berechneten Signifikanzen beziehen sich auf FI der *boxAB* RNA, welche auf 100 % gesetzt wurde. Doppelbestimmung.

Der Vergleich der relativen FI zeigte, dass keine Veränderung der Fluoreszenz durch eine Inkubation mit den Metaboliten SAM beziehungsweise GTP beobachtet werden konnte. Die FI lag für die *boxA-SR1-B* und *boxA-GR-B* RNA bei ca. 25 % und 33 % der Fluoreszenz der Positivkontrolle *boxAB*. Dieser Wert entspricht der Fluoreszenz, die für die *boxAlinkerB* RNA gemessen wurde, welche einen 21 nt langen Linker zwischen den beiden Pumilio-Bindemotiven trägt (3.3.1). Da die *SR1*- und *GR*-Linker eine Länge von 43 bzw. 24 nt haben, kann die Annahme bestätigt werden, dass eine Linkerregion größer als 7 nt zu einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz führt. Es ist möglich, dass eine Flexibilität der Linkerregion darin resultiert, dass die beiden Motive in räumliche Nähe geraten und so die TetFC auslösen können. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass keine Strukturveränderung der RNAs durch Zugabe der Metaboliten ausgelöst wurde. Mögliche Ursachen dafür könnten das fehlerhafte Design der RNA-Sequenzen oder Probleme bei der Inkubation mit den Metaboliten sein.

Die TetFC konnte nicht genutzt werden, um strukturelle Veränderungen der beiden entworfenen Riboswitches zu detektieren. Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der RNA-Sequenz dies begünstigen könnte, wurde im Folgenden eine veränderte *boxA-SR1-B* RNA verwendet.

### 3.3.3.1. Nachweis zweier unterschiedlicher RNA Strukturen mittels TetFC

Um eine SAM-induzierte strukturelle Veränderung der *boxA-SR1-B* RNA zu begünstigen, wurde das zusätzliche GC-Paar angrenzend an die Aptamerregion entfernt. Diese *boxA-SR2-B* RNA wurde mit dem Metabolit SAM inkubiert und im Anschluss mittels TetFC detektiert (Abbildung 3.15).

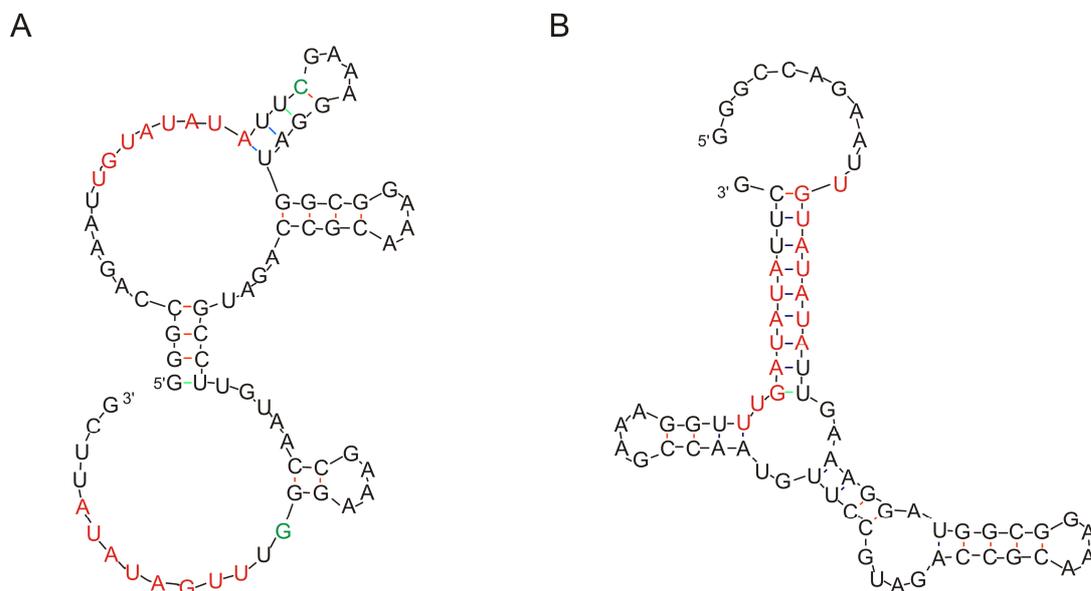


**Abbildung 3.15 Nachweis SAM-induzierter Strukturveränderungen von RNA mittels TetFC.**

A: Anstieg der FI ausgelöst durch boxAB, boxAC bzw. boxA-SR2-B in Abhängigkeit von SAM; Doppelbestimmung. B: Relative FI der RNAs dargestellt in Abb. A nach 8 h. Die Signifikanz bezieht sich auf die FI der boxAB RNA, welche auf 100 % gesetzt wurde. Mittelwerte aus zwei Doppelbestimmungen.

Der Anstieg der FI, welche durch die RNA boxA-SR2-B ausgelöst wird, weist den gleichen Kurvenverlauf auf wie boxAB ist aber unabhängig von der Anwesenheit des Metabolits SAM (Abbildung 3.15 A). Dies deutet darauf hin, dass keine strukturelle Veränderung der RNA durch den Metabolit ausgelöst oder diese durch die Bindung der Pumilio-Proteine verhindert wurde.

Der Vergleich der FI nach 8 h zeigt, dass ein Signal von 102 und 113 % in Bezug auf boxAB erreicht wurde (Abbildung 3.15 B). Im Vergleich zu der boxA-SR1-B RNA ist aber ein ca. 4-fach erhöhtes Signal zu detektieren (Rel. FI boxA-SR1-B: 25 %). Um nachzuvollziehen, wie die Deletion eines einzelnen GC-Paares zu diesem markanten Unterschied führen kann, wurden Sekundärstrukturvorhersagen der beiden RNAs mit Mfold<sup>329</sup> angefertigt (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16 Vorhergesagte Sekundärstrukturen der boxA-SR1-B und boxA-SR2-B RNAs.**

A: boxA-SR1-B; B: boxA-SR2-B. Die Strukturen wurden erstellt mit Mfold.<sup>329</sup> Beide Pumilio-Bindemotive sind in rot dargestellt. Die zusätzlichen Nukleotide sind in Abb. A grün hervorgehoben.

Die Vorhersagen zeigen Strukturen, welche sich sehr voneinander unterscheiden aber vergleichbar stabil sind (initiale  $\Delta G = -19,35$  bzw.  $-22,80$  kcal/mol). Es ist zu sehen, dass in der

boxA-SR1-B RNA beide Pumilio-Bindemotive einzelsträngig aber räumlich voneinander entfernt vorliegen, was das fehlende Fluoreszenzsignal mittels TetFC erklären würde. Die boxA-SR2-B RNA hingegen weist eine Struktur auf, in der beide Pumilio-Bindemotive miteinander hybridisieren. Diese Hybridisierung würde eine Bindung der Pumilio-Proteine verhindern. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass die Proteine diese doppelsträngige Region aufbrechen, welche lediglich eine Schmelztemperatur von 20 °C aufweist (berechnet mit OligoCalc<sup>330</sup>), und die so entstehende Strukturveränderung beide Proteine optimal positioniert. Eine Ausbildung des Proteinkomplexes mit GFP1-9 wäre demnach denkbar und würde die hohe FI erklären.

Auch wenn mit der TetFC Methode keine exakten Strukturvorhersagen erstellt werden können, so konnte doch gezeigt werden, dass die beiden RNAs boxA-SR1-B und boxA-SR2-B strukturell sehr verschieden sind.

Diese Experimente zeigten, dass die TetFC eine geeignete Methode darstellt, um strukturelle Unterschiede oder Veränderungen in RNA-Molekülen nachzuweisen. So konnte eine Veränderung der Sekundärstruktur gezeigt werden, welche einzig durch die Deletion eines Basenpaares ausgelöst wurde. Bereits nach 20 Minuten konnte mit Hilfe dieser Methode zwischen den beiden RNAs unterschieden werden, weshalb diese Methode anderen *probing* oder spektrometrischen Verfahren vorzuziehen ist, welche mit mehr Zeit und/oder Aufwand verbunden sind (ein Vergleich der Methoden wird in Kapitel 4.2.3 diskutiert). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass theoretisch alle Komponenten für die TetFC *in vivo* produziert werden könnten, wodurch die Verfolgung intrazellulärer Strukturveränderungen von RNA möglich wäre. Dies könnte erste Schritte in Richtung Verfolgung der Genregulation in Echtzeit erlauben.

### 3.4. Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung (RNP-FC)

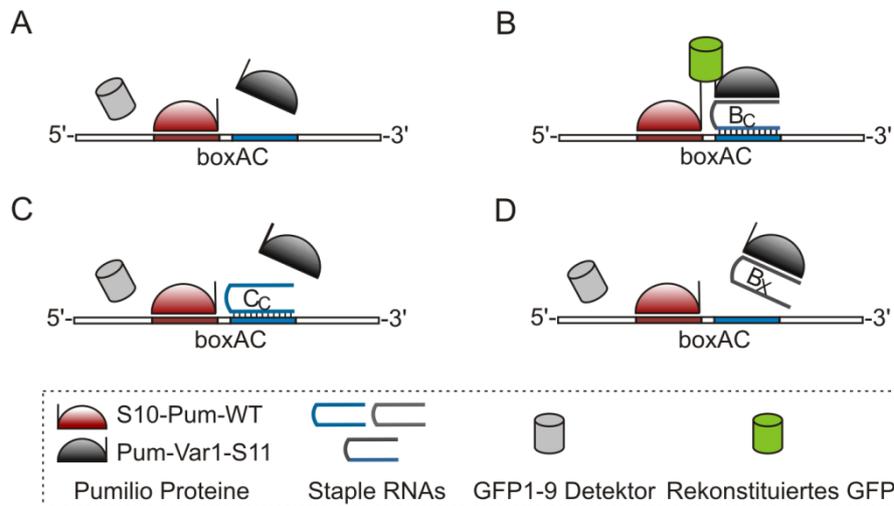
Die Methode der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung beruht auf der Bindung zweier Pumilio-Proteine an eine Target-RNA im Abstand von 5 nt zueinander. Trotz der Erfolge, die mit dieser Methode erzielt werden konnten, weist sie den Nachteil auf, dass sie nur für eine begrenzte Zahl an Target-RNAs eingesetzt werden kann. Die Zahl der Target-RNAs wird durch die Sequenzspezifität natürlich vorkommender oder umprogrammierter Pumilios limitiert. Die Bindungsspezifitäten natürlicher Pumilios sind begrenzt und auch das Design von Pumilio-Varianten mit neuer Sequenzspezifität weist gewisse Limitierungen auf (siehe Kapitel 1.3.3).

In dieser Arbeit sollte eine Detektionsmethode entwickelt werden, welche diese Limitierungen umgeht, indem Pumilio anhand von kurzen, einzelsträngigen *guide*-RNAs an die Target-RNA dirigiert wird. Einzelsträngige Nucleinsäuren wurden bereits von anderen Gruppen als *guides* für die RNA-abhängige Fluoreszenzkomplementierung verwendet (siehe Kapitel 1.2.2.2.,<sup>199,208,335</sup>). Die Ausbildung eines Ribonukleoprotein-Komplexes aus Pumilio und *guide*-RNA sollte eine leicht variierbare Sequenzspezifität liefern. Die RNP-Fluoreszenzkomplementierung (RNP-FC) wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand der boxAC Modell-RNA etabliert und schließlich verwendet, um sequenzspezifisch die L1 RNA in Gegenwart kompetierender RNA zu detektieren und zwischen gespleißter und ungespleißter HIV RNA zu unterscheiden.

#### 3.4.1. Etablierung der RNP-FC zum RNA-Nachweis

Um die RNP-FC zu etablieren, wurde die boxAC RNA verwendet, welche in vorherigen TetFC Experimenten als Negativkontrolle diente. Diese RNA enthält das boxA Bindemotiv, welches von Pum-wt gebunden wird (UGUAUAUA), sowie boxC (CCCAUAUA), welches von keinem bekannten Pumilio gebunden wird (siehe 3.1.2). Es wurde getestet, ob durch Einführung einer kurzen, einzelsträngigen RNA (in Anlehnung an die DNA-Origami-Experimente Staple-RNA genannt<sup>336</sup>) eine Sequenz detektiert werden kann, welche von keinem bisher bekannten Pumilio gebunden wird. Hierzu wurde eine Staple-RNA (B<sub>c</sub>) entworfen, welche mit dem 5'-Ende an das boxC Motiv der Target-RNA hybridisiert und am 3'-Ende das boxB Pumilio-Bindemotiv trägt. Da boxB von Pum-Var1-S11 gebunden wird, sollte ein RNP-Komplex aus der Target- und Staple-RNA sowie dem Pum-Var1-S11 Protein entstehen (Abbildung 3.17). Die Bindung des zweiten Pumilio-Proteins S10-Pum-wt in Anwesenheit des GFP1-9-Detektors sollte zur Komplementierung des GFPs und der Entwicklung eines Fluoreszenzsignals führen. Analog zu Staple B<sub>c</sub> wurden Kontroll-Staples entworfen. Es ist dabei zu beachten, dass die Staples sowohl nach dem Motiv auf der Target-RNA benannt wurden an das sie hybridisieren (tiefgestellt), als auch nach dem Pumilio-Bindemotiv, welches präsentiert wird.

Dementsprechend wurde die Kontroll-Staple-RNA  $C_c$  entworfen, welche am 5'-Ende mit  $boxC$  hybridisiert und am 3'-Ende ebenfalls das Sequenzmotiv  $boxC$  trägt. Trotz der Hybridisierung des Staples  $C_c$  an die Target-RNA sollte eine Fluoreszenzkomplementierung ausbleiben, da keine Ausbildung des RNP-Komplexes stattfindet. Als weitere Kontrolle wurde Staple  $B_x$  generiert. Diese RNA trägt am 3'-Ende  $boxB$ , wird demnach von Pum-Var1-S11 gebunden, kann aber aufgrund des mutierten Motivs X am 5'-Ende nicht an die Target-RNA hybridisieren.

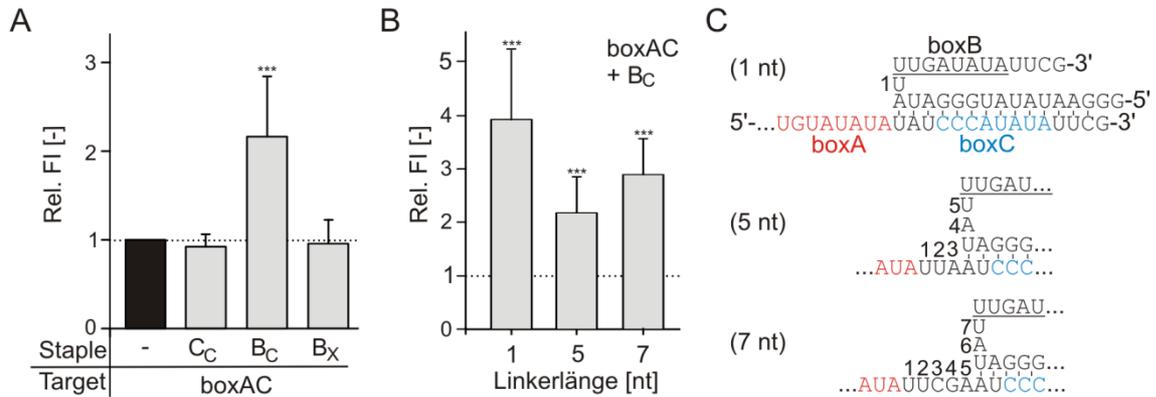


**Abbildung 3.17 Konzept der RNP-FC zur Detektion der  $boxAC$  RNA.**

A: Die Target-RNA  $boxAC$  trägt das Bindemotiv  $boxA$  für S10-Pum-wt, sowie das mutierte Motiv  $boxC$ , welches von keinem bekannten Pumilio-Protein gebunden wird. B: Die Staple-RNA  $B_c$  hybridisiert an  $boxC$  und kann von Pum-Var1-S11 an dem Bindemotiv  $boxB$  gebunden werden. Bindung von S10-Pum-wt an  $boxA$  auf der Target-RNA positioniert die beiden  $\beta$ -Faltblätter S10 und S11 in räumliche Nähe. Die Zugabe des GFP1-9-Detektors führt zur Fluoreszenzkomplementierung. C: Staple  $C_c$  hybridisiert auch an  $boxC$  enthält aber anstatt von  $boxB$  das Motiv  $boxC$ . Da  $boxC$  nicht von Pum-Var1-S11 gebunden wird, bleibt die Fluoreszenzkomplementierung aus. D: Staple  $B_x$  trägt das  $boxB$  Motiv und wird von Pum-Var1-S11 gebunden, kann aber aufgrund der mutierten Hybridisierungssequenz nicht an die Target-RNA binden.

Nach Inkubation der Target-RNA  $boxAC$  für 14 h mit den beiden Pumilio-Proteinen sowie dem GFP1-9-Detektor in Anwesenheit der verschiedenen Staple-RNAs wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt (Abbildung 3.18 A). Die relative Fluoreszenz in Anwesenheit des Staples  $B_c$  war um das 2,2-fache im Vergleich zu  $boxAC$  RNA erhöht. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die FI in Anwesenheit der Staple  $C_c$  oder  $B_x$  nicht vom Signal der  $boxAC$  RNA. Dies deutet darauf hin, dass die Fluoreszenzkomplementierung spezifisch und abhängig von der Ausbildung des RNP-Komplexes verlief. Um das relativ schwache Signal für Staple  $B_c$  zu erhöhen, wurde die Linkerlänge zwischen den beiden Pumilio-Bindemotiven optimiert. Im Gegensatz zu der einfachen TetFC, bei der beide Pumilio-Proteine an dieselbe Target-RNA binden, war hier zu beachten, dass beide Proteine an unterschiedliche RNAs binden. Demnach setzt sich die Linkerlänge aus den ungepaarten Nukleotiden beider RNAs zusammen, welche zwischen den Bindemotiven vorliegen (Abbildung 3.18 C). Es wurden zusätzlich zu der vorher verwendeten Linkerlänge von 5 nt, Längen von 1 und 7 nt analysiert (Abbildung 3.18 B). Eine Linkerlänge von

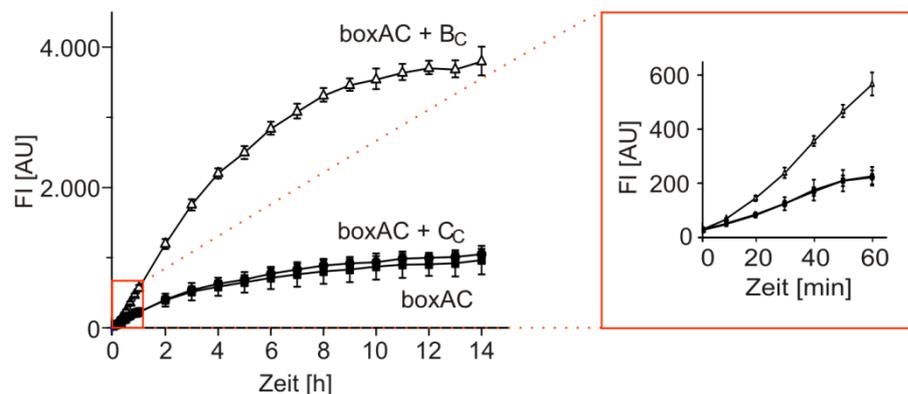
1 nt ergab ein 3,9-fach höheres Signal als die Kontrolle ohne Staple-RNA, die Signalerhöhung mit 5 und 7 nt fiel aber schwächer aus (2,2- bzw. 2,9-fach).



**Abbildung 3.18 Nachweis der boxAC RNA mittels RNP-FC.**

A: Relative FI der Target-RNA boxAC nach 14 h mit verschiedenen Staple-RNAs und den Proteinen S10-Pum-wt, Pum-Var1-S11 und GFP1-9. Die Signifikanz bezieht sich auf die FI der boxAC ohne Staple, welche auf 1 gesetzt wurde. Mittelwerte aus 7 Doppelbestimmungen. B: Einfluss der Linkerlänge zwischen beiden Pumilio-Motiven auf die relative FI von boxAC (nach 14 h) mit Staple B<sub>C</sub>. Signifikanzen beziehen sich auf boxAC ohne Staple, welche auf 1 gesetzt wurde. Mittelwerte aus 4 Doppelbestimmungen. C: Schematische Darstellung der Sequenzen von boxAC mit Staple B<sub>C</sub> und den verschiedenen Linkerlängen.

Der Verlauf der FI über die Zeit zeigte, dass das Signal für boxAC RNA mit Staple B<sub>C</sub> und der optimalen Linkerlänge von 1 nt anstieg und ein Maximum von ca. 4.000 AU nach ca. 10 h erreichte (Abbildung 3.19). Im Gegensatz dazu stieg die FI für boxAC ohne Staple-RNA nur auf ca. 1.000 AU an. Durch die Anwesenheit von C<sub>C</sub> wurde dieser Kurvenverlauf nicht verändert. Das Signal, welches durch Staple B<sub>C</sub> ausgelöst wurde, konnte bereits 20 min nach Zugabe des GFP1-9-Detektors vom Hintergrund unterschieden werden (Abbildung 3.19, Vergrößerung).



**Abbildung 3.19 Zeitabhängigkeit der RNA-Detektion mittels RNP-FC.**

Messung der FI über 14 h mit boxAC Target-RNA und Staple C<sub>C</sub> bzw. B<sub>C</sub> oder alleine; die Vergrößerung zeigt die erste Stunde der Messung. Doppelbestimmung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Target-RNA detektiert werden kann, die nur ein Pumilio-Bindemotiv trägt. Durch die Zugabe einer kurzen einzelsträngigen RNA kann ein zweites

Pumilio-Protein an die Target-RNA dirigiert und die Fluoreszenzkomplementierung des dreigeteilten split-GFPs ausgelöst werden. Diese Erweiterung der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung zur RNP-Komplementierung hat mehrere Vorteile. Zum einen wird das Protein-Engineering zweier Pumilios umgangen und zum anderen kann die Target-RNA mittels sequenzbasiertem RNA-Design angesteuert werden, wodurch die Anzahl möglicher RNA-Targets ansteigt.

### 3.4.2. RNP-FC zur Detektion der L1 mRNA

Basierend auf den Ergebnissen der RNP-FC sollte eine natürlich vorkommende RNA detektiert werden. Hierfür wurde die mRNA des Zelladhäsionsmoleküls L1 gewählt, welches Mitglied der Superfamilie der Immunglobulin-ähnlichen Zellerkennungsmoleküle ist und die Zellmigration sowie das Auswachsen von Neuriten forciert.<sup>337-339</sup> Des Weiteren ist L1 an der Entstehung verschiedenster Erkrankungen, wie geistige Behinderungen, neuropsychiatrische Störungen oder Tumorprogressionen beteiligt und fördert die Metastasierung neuronaler Tumoren.<sup>337,340,341</sup> Da der aktive Transport und die subzelluläre Lokalisation von RNA einen weitverbreiteten Mechanismus in Neuronen darstellt, um die Translation räumlich und zeitlich zu kontrollieren,<sup>342</sup> stellte die Detektion der L1 mRNA ein interessantes Ziel dar.

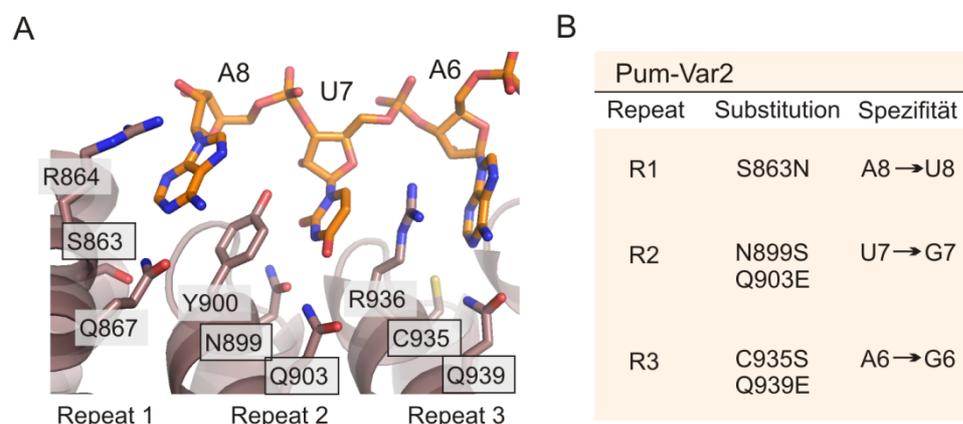
Um die L1 RNA detektieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein passendes Bindemotiv innerhalb der RNA-Sequenz bestimmt und ein Pumilio-Protein für dieses durch rationales Design entwickelt. Abschließend wurde die L1 RNA mit Hilfe der RNP-FC Methode *in vitro* in Anwesenheit kompetierender RNA detektiert.

#### 3.4.2.1. Herstellung einer Pumilio-Variante spezifisch für die L1 mRNA

Um die L1 mRNA mit der RNP-FC detektieren zu können, musste zunächst eine passende Zielsequenz gefunden werden. Innerhalb des offenen Leserahmens (ORF) des murinen L1 Gens wurde eine 8 nt Sequenz ausgewählt, welche der boxA Sequenz ähnelt. Diese Sequenz (5'-UGUAUGGU-3') unterscheidet sich von der boxA (5'-UGUAUAUA-3') nur an den letzten drei Positionen (NCBI-Referenz: NM\_008478.3). Aufgrund dieser Ähnlichkeit zum natürlichen Bindemotiv des Pum-wt Proteins wurde diese Sequenz mit boxL benannt und als Startpunkt für das Protein-Engineering einer neuen Variante gewählt.

Um das Engineering zu erleichtern, wurde von einer Variante ausgegangen (MUT3-2), die bereits eine verbesserte Affinität zu der RNA-Sequenz 5'-UGUAGGUA-3' im Vergleich zum Wildtyp aufwies.<sup>294</sup> In dieser Variante wurden die Aminosäuren C935 und Q939 in PUF-Repeat 3 durch S935 bzw. E939 ersetzt (siehe 1.3.3). Diese Substitutionen erfolgten basierend auf rationalem Design und verbesserten die Affinität zu G anstelle von A an Position 6 der Target-RNA. Um eine Sequenzspezifität für boxL zu erhalten, musste daher nur noch die Spezifität für G an Position 7 und U an Position 8 generiert werden. Anhand der Ergebnisse anderer Studien,

welche A zu U und U zu G Spezifitäten generierten,<sup>179,294</sup> wurden die Aminosäuren S863 in PUF-Repeat 1 sowie N899 und Q903 in PUF-Repeat 2 durch N863, S899 und E903 ersetzt (Abbildung 3.20). Die entsprechenden Mutationen wurden mittels Assemblierungs-PCR und den Mutageneseprimern Pum1-2\_fwd/Pum1-2\_rev und Pum2-1\_fwd/Pum2-1\_rev in das Gen für MUT3-2 eingeführt.

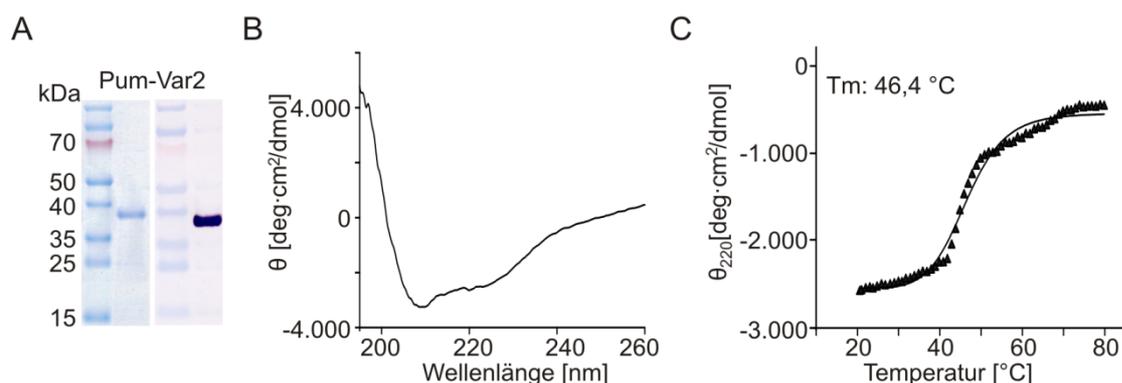


**Abbildung 3.20 Protein-Engineering einer Pumilio-Variante spezifisch für boxL.**

A: Struktur des Pum-wt Proteins mit der boxA RNA (PDB 3Q0L,<sup>302</sup>), Bild dargestellt mit Pymol. Dargestellt sind die PUF-Repeats 1-3 des Proteins sowie die Basen A6-U7-A8 der Target-RNA. Die Aminosäuren, welche mit der RNA interagieren, sind bezeichnet und diese, die beim Protein-Engineering einbezogen wurden, umrahmt. B: Aminosäuresubstitutionen zur Generierung der Pum-Var2 Variante, sowie deren erwarteten Spezifitäten.

Die Variante Pum-Var2 wurde anhand des entwickelten Protokolls rekombinant produziert, gereinigt (Ausbeute ca. 5 mg pro Liter Kultur) und charakterisiert (Abbildung 3.21).

CD-Messungen ergaben, dass für die Variante ebenfalls die  $\alpha$ -helikale Struktur nachgewiesen werden konnte, welche typisch für Pumilio ist (Abbildung 3.21 B). Es fällt aber auf, dass das lokale Minimum bei 225 nm im Vergleich zum Minimum bei 205 nm weniger stark ausgeprägt ist. Dieses Phänomen tritt bei dem Pum-wt Protein nicht auf (Vergleich Abbildung 3.2) und könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Faltung der Pum-Var2 Variante destabilisiert ist. Die Schmelzkurve des Proteins unterstützt diese Annahme, da ein Schmelzpunkt von lediglich 46,4 °C bestimmt wurde (Abbildung 3.21 C). Dieser Schmelzpunkt ist um fast 9 °C reduziert im Vergleich zu dem Wildtyp (55,1 °C), und bestärkt die Vermutung, dass die Aminosäuresubstitutionen einen Stabilitätsverlust zur Folge haben.



**Abbildung 3.21 Reinigung und Charakterisierung der neuen Pumilio-Variante Pum-Var2.**

A: Analyse des gereinigten Pum-Var2 Proteins; 10 %-SDS-PAA-Gel mit Coomassie-Färbung (links) und Western-Blot mit Anti-His Antikörper (rechts); *PageRuler Prestained Protein Ladder*. B: CD-Spektrum des Pum-Var2 Proteins. Aufgetragen ist die molare Elliptizität pro Aminosäure. C: Schmelzkurve des Pum-Var2 Proteins, Elliptizität gemessen bei 220 nm und einem Temperaturbereich von 20-80 °C. Schmelzpunktbestimmung aus Einzelmessung.

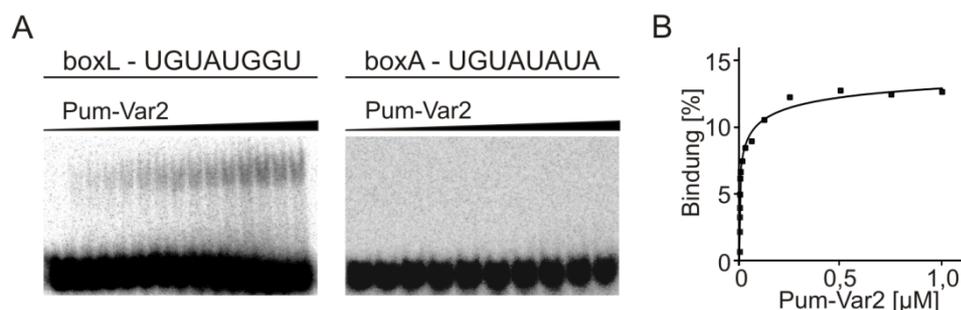
Nach der erfolgreichen Produktion und Reinigung der korrekt gefalteten Pumilio Variante, sollte anhand von Bindungsstudien bestimmt werden, ob die gewünschte Sequenzspezifität generiert werden konnte.

### 3.4.2.2. Bindungsstudien zur Charakterisierung von Pum-Var2

Zur Bestimmung der Sequenzspezifität der Pum-Var2 Variante für die boxL RNA wurden Gel-Shifts durchgeführt. Zunächst wurde die Spezifität der Variante auf boxL im Vergleich zu boxA getestet und im Anschluss wurden Kontrollen durchgeführt, die zeigen sollten, ob die boxL RNA von Pum-wt oder MUT3-2 gebunden werden kann.

#### 3.4.2.2.1. Bindung von Pum-Var2 an boxL

Die Daten aus den Gel-Shift-Experimenten zeigten, dass die neue Variante Pum-Var2 sequenzspezifisch mit einem  $K_D$  von  $15 \pm 6$  nM an die boxL RNA bindet (Abbildung 3.22). Wie erwartet, wies die Variante keine Affinität mehr für das boxA Motiv auf. Die Bindung an boxL liegt in der gleichen Größenordnung wie die Affinität der Pum-Var1 Variante für die boxB RNA ( $5,1 \pm 0,1$  nM)<sup>216</sup> und Pum-wt an boxA ( $2 \pm 2$  nM). Demnach ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, eine neue Variante herzustellen, die sequenzspezifisch und mit hoher Affinität an das boxL Motiv bindet.

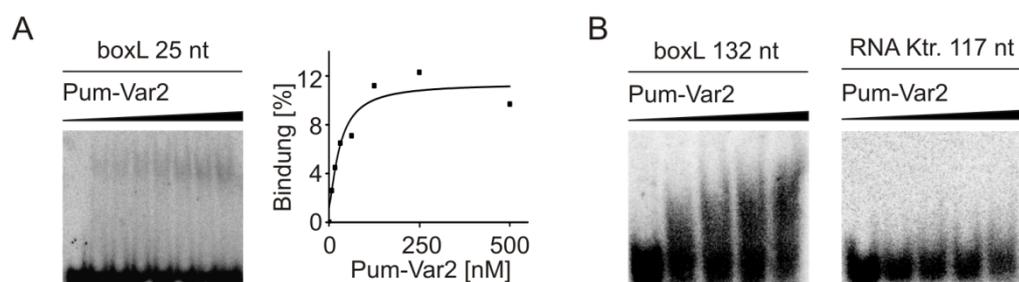


**Abbildung 3.22 Sequenzspezifische Bindung von Pum-Var2 an boxL.**

A: Gel-Shifts der RNAs boxL und boxA mit dem Protein Pum-Var2 (0-1 µM); Gel-Shift-PAA-Gel, Autoradiographie. B: Auswertung des Gel-Shifts von Pum-Var2 mit boxL, welcher in A gezeigt wurde. Aufgetragen wurde der Prozentsatz an gebundener RNA gegen die Proteinkonzentration. Der  $K_D$  Wert von Pum-Var2 mit boxL ( $15 \pm 6$  nM) wurde aus 4 unabhängigen Messungen gemittelt.

Um die Sequenzspezifitäten von Pum-Var2 für boxL und boxA vergleichen zu können, wurde für die Gel-Shift-Experimente eine RNA verwendet, welche das 8 nt Bindemotiv boxL in dem Kontext der boxA RNA trug. Zur zukünftigen Detektion endogener L1 mRNA ist es aber notwendig, dass Pum-Var2 auch an boxL bindet, wenn sich das entsprechende Bindemotiv innerhalb der natürlichen L1 mRNA-Sequenz befindet. Um dieses zu testen, wurden zwei RNAs hergestellt, welche das boxL Motiv beinhalteten und Teil der natürlichen L1 mRNA sind. Diese 25 und 132 nt langen RNAs wurden ebenfalls in Gel-Shift-Experimenten mit Pum-Var2 eingesetzt (Abbildung 3.23).

Es war zu erkennen, dass die Bindung von Pum-Var2 an boxL durch die Verlängerung auf 25 nt und die Veränderung der umliegenden Nukleotide nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 3.23 A,  $K_D = 16$  nM aus Einzelbestimmung). Auch eine sequenzspezifische Bindung von Pum-Var2 an die 132 nt lange boxL RNA konnte beobachtet werden, nicht aber an eine 117 nt langen Kontroll-RNA (Abbildung 3.23 B).



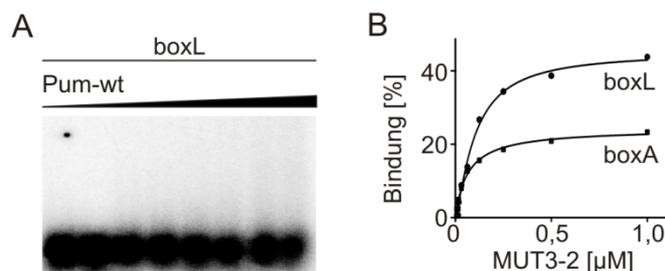
**Abbildung 3.23 Sequenzspezifische Bindung von Pum-Var2 an längere RNAs mit boxL-Motiv.**

A: Gel-Shift von 25 nt langer RNA mit boxL-Motiv und Pum-Var2 (links) sowie korrespondierende Auswertung (rechts),  $K_D = 16$  nM (Einzelbestimmung); Gel-Shift-PAA-Gel, Autoradiographie. B: Gel-Shifts von 132 nt langer RNA mit boxL-Motiv und einer 117 nt langen Kontroll-RNA mit Pum-Var2; Gel-Shift-PAA-Gele, Autoradiographie.

Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass die erhaltene Variante sequenzspezifisch an RNA bindet, die das boxL-Motiv trägt.

### 3.4.2.2. Bindungsstudien weiterer Pumilio-Proteine mit boxL

Es konnte gezeigt werden, dass die Pum-Var2 Variante eine Sequenzspezifität für die boxL RNA aufweist und diese mit hoher Affinität bindet. Um zu überprüfen, ob das durchgeführte Protein-Engineering zu dieser Sequenzspezifität führte, wurde die Bindung der Vorläuferproteine Pum-wt und MUT3-2 an die boxL RNA (im boxA Kontext) mittels Gel-Shift untersucht (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24 Bindungsstudien von Pum-wt und MUT3-2 mit boxL.**

A: Gel-Shift der RNA boxL mit Pum-wt (0-125 nM); Gel-Shift-PAA-Gel, Autoradiographie. B: Auswertung von Gel-Shifts von boxL und boxA mit MUT3-2 (0-1  $\mu$ M); aufgetragen wurde der gebundene Prozentsatz an RNA gegen die Proteinkonzentration. Einzelmessungen.

Es konnte gezeigt werden, dass Pum-wt keine Affinität für boxL aufweist (Abbildung 3.24 A). Dies bedeutet, dass mittels Protein-Engineering die Affinität von boxA zu boxL verändert wurde, so dass Pum-wt und Pum-Var2 spezifisch an boxA beziehungsweise boxL binden.

Bindungsstudien mit MUT3-2, dessen Spezifität nur für Position 6 der RNA verändert wurde, zeigten, dass das Protein Affinität sowohl für boxA als auch boxL aufweist (Abbildung 3.24 B). Dieses deutet darauf hin, dass die Differenzierung zweier RNAs, welche sich in nur einer Position im 3'-Bereich des Bindemotivs unterscheiden, basierend auf der Bindung von Pumilio schwierig sein könnte. Pumilio-Proteine scheinen lediglich eine Mutation in diesem Bereich noch tolerieren zu können, drei hingegen nicht mehr. Dies bestätigt die Beobachtung, dass der 3'-Bereich des Motivs für die Erkennung von Pumilio weniger wichtig ist als der 5'-Bereich.<sup>294</sup>

### 3.4.2.3. Integration der Pum-Var2 in das RNP-FC System

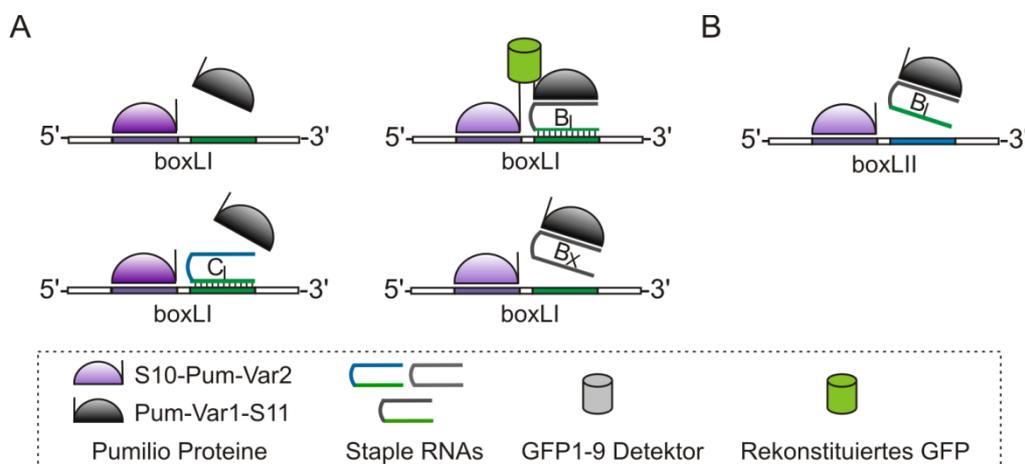
Nachdem gezeigt wurde, dass die neue Variante Pum-Var2 spezifisch an boxL bindet, sollte das Protein für TetFC in Form des RNP-FC Systems genutzt werden. Dazu wurde Pum-Var2 N-terminal mit dem S10-Tag fusioniert und eine 39 nt lange Target-RNA – angelehnt an die L1 mRNA – hergestellt, welche das boxL Bindemotiv trägt. Da im Bereich von 5 nt angrenzend an das boxL-Motiv kein weiteres Pumilio-Bindemotiv zur Verfügung stand, konnte die L1 RNA nicht mittels der einfachen TetFC detektiert werden, weshalb die RNP-FC verwendet wurde.

Um diese RNA mittels RNP-FC nachweisen zu können, wurde der 3'-Bereich nach dem boxL-Motiv verlängert und als Hybridisierungsstelle für eine Staple-RNA ausgewählt. Zur

Unterscheidung dieser 16 nt RNA-Sequenz von einem Pumilio-Bindemotiv wurde ihr die Bezeichnung Motiv I gegeben. Die Target-RNA wurde dementsprechend boxLI genannt (siehe Abbildung 3.25 A). Die Staple-RNA  $B_I$  wurde so entworfen, dass sie an das Motiv I hybridisiert, in ihrem 3'-Bereich allerdings das boxB Bindemotiv trägt, welches von Pum-Var1-S11 gebunden wird. Die Hybridisierung der Staple-RNA an das Motiv I sollte das Protein zur Target-RNA dirigieren und in räumliche Nähe (Abstand 1 nt) zum Pumilio-Bindemotiv boxL bringen. Die Bindung von S10-Pum-Var2 an boxL in Gegenwart der Staple-RNA und Pum-Var1-S11 sollte somit die Proteinkomplementierung mit dem GFP1-9-Detektor und die damit verbundene Detektion eines Fluoreszenzsignals ermöglichen (siehe Abbildung 3.25 A).

Als Kontrollen wurden die Staple-RNAs  $C_I$  und  $B_X$  entworfen. Staple  $C_I$  kann an die Target-RNA binden, trägt aber das boxC Motiv, so dass keine Bindung des Pum-Var1-S11 Proteins erfolgen sollte. Im Gegensatz dazu trägt Staple  $B_X$  das boxB Bindemotiv für Pum-Var1-S11, kann aber aufgrund der mutierten Hybridisierungssequenz nicht mit der Target-RNA hybridisieren.

Eine weitere Kontrolle stellt die boxLII Target-RNA dar, welche das boxL Bindemotiv trägt, aber innerhalb der Hybridisierungsstelle der Staple-RNA mutiert ist, und aus diesem Grund nicht als Target für Staple  $B_I$  dienen kann (siehe Abbildung 3.25 B).

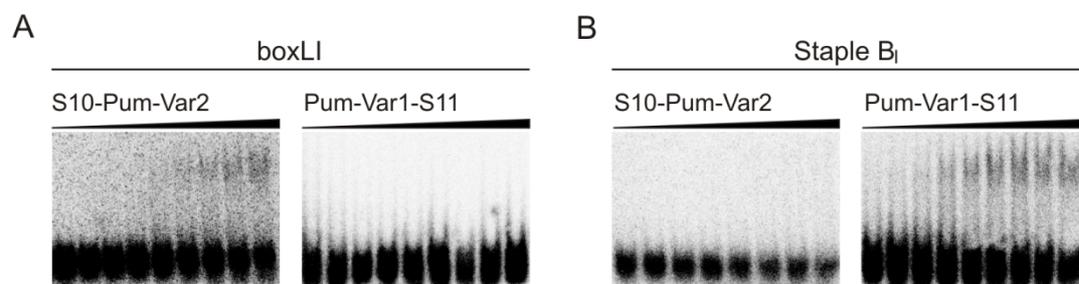


**Abbildung 3.25 Prinzip der RNP-FC zur Detektion der L1 RNA.**

A: Die Target-RNA boxLI trägt das Bindemotiv boxL für S10-Pum-Var2, sowie das Motiv I zur Hybridisierung einer Staple-RNA. Die Staple-RNA  $B_I$  hybridisiert an das Motiv I und wird von Pum-Var1-S11 an dem boxB Bindemotiv gebunden. In Anwesenheit des GFP1-9-Detektors tritt eine Fluoreszenzkomplementierung auf. Im Gegensatz dazu trägt Staple  $C_I$  das boxC Bindemotiv, welches nicht von Pum-Var1-S11 gebunden werden kann. Staple  $B_X$  trägt zwar das boxB Motiv und wird von Pum-Var1-S11 gebunden, kann aber nicht an die Target-RNA hybridisieren. In beiden Fällen sollte keine Fluoreszenzkomplementierung auftreten. B: Die Target-RNA trägt das mutierte Motiv II, welches nicht komplementär zu Staple  $B_I$  ist und sollte deshalb keine Fluoreszenzkomplementierung auslösen.

Um die RNP-FC messen zu können, war es notwendig, zu bestimmen, ob die Fusion des  $\beta$ -Faltblatts S10 an das Protein Pum-Var2, sowie die Insertion der Bindemotive in die neue Target-RNA einen Einfluss auf die RNA-Protein-Interaktion hat. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob S10-Pum-Var2 und Pum-Var1-S11 spezifisch an die jeweilige RNA binden, und keine

unspezifischen Bindungen auftreten. Anhand von Gel-Shift-Experimenten konnte gezeigt werden, dass S10-Pum-Var2 nur an boxLI und nicht an Staple B<sub>I</sub> bindet (Abbildung 3.26). Umgekehrt wurde deutlich, dass Pum-Var1-S11 nur an Staple B<sub>I</sub>, nicht aber an boxLI bindet.



**Abbildung 3.26 Bindungsstudien der Pumilio-Proteine für RNP-FC.**

Gel-Shift der boxLI Target-RNA (A) und B<sub>I</sub> Staple-RNA (B) mit S10-Pum-Var2 und Pum-Var1-S11 (0-1 µM); Gel-Shift-PAA-Gel, Autoradiographie.

Diese Experimente zeigten, dass die Bindung der beiden Pumilio-Proteine sequenzspezifisch erfolgt. Außerdem wurde deutlich, dass die Fusionierung von Pum-Var2 mit S10 die Bindung an die Target-RNA nicht unterbindet. Demnach waren alle Voraussetzungen für den Nachweis der boxLI RNA mittels RNP-FC gegeben.

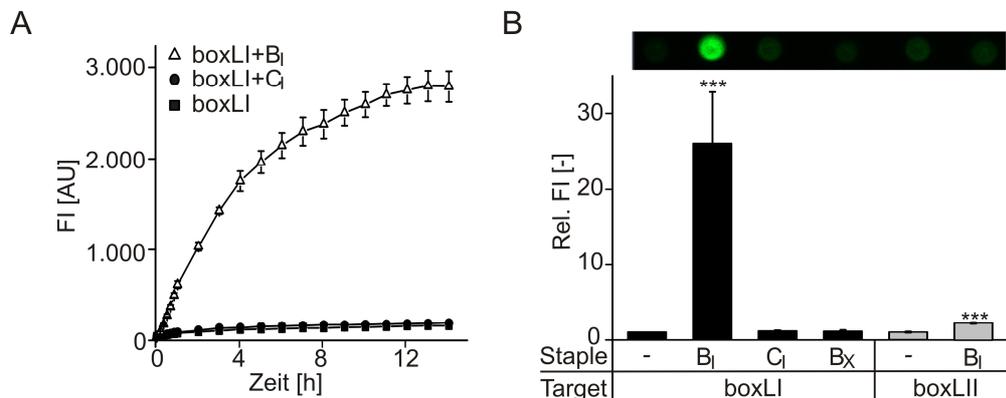
#### 3.4.2.4. Nachweis der boxLI RNA mittels RNP-FC

Nach der Charakterisierung der Pumilio-Proteine sollte nun die boxLI Target-RNA sequenzspezifisch mittels RNP-FC detektiert werden. Die zeitabhängige Messung der RNP-FC mit der boxLI Target-RNA in Anwesenheit der Staple-RNA B<sub>I</sub> zeigte eine steile Zunahme der FI, bis diese nach ca. 12 h ein Maximum von knapp 3.000 AU erreichte (Abbildung 3.27 A). Im Vergleich dazu konnte in Anwesenheit der Staple-RNA C<sub>I</sub> lediglich eine FI von ca. 100 AU detektiert werden, welche dem Wert für die Target-RNA boxLI ohne Staple entspricht. Der Vergleich der relativen FI beider Maximalwerte verdeutlicht, dass in Anwesenheit des Staples B<sub>I</sub> eine ca. 25-fache höhere FI als mit Staple C<sub>I</sub> nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.27 B).

Um die Sequenzspezifität zu testen, wurde die Staple-RNA B<sub>X</sub> eingesetzt, welche mit boxLI zu keinem Anstieg der FI im Vergleich zur Negativkontrolle führte (Abbildung 3.27 B). Da der Austausch der boxLI gegen die boxLII Target-RNA zu einer Reduzierung des Fluoreszenzsignals mit Staple B<sub>I</sub> auf das 2,3-fache führte, konnte die Sequenzspezifität des Systems bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass die Hybridisierung der Staple-RNA an die Target-RNA essentiell für die RNP-FC ist.

Im Vergleich zu der boxAC RNA wurde die Target-RNA boxLI mit einem höheren Signal-Hintergrund-Verhältnis detektiert (3,9- zu 25-fach). Dies lässt sich durch die Nukleotidzusammensetzung und damit einhergehende Schmelztemperatur der Staple-RNAs

erklären (34 °C zu 51 °C). In Zukunft sollte beim Staple-Design für die Detektion anderer RNAs die Schmelztemperatur berücksichtigt werden.

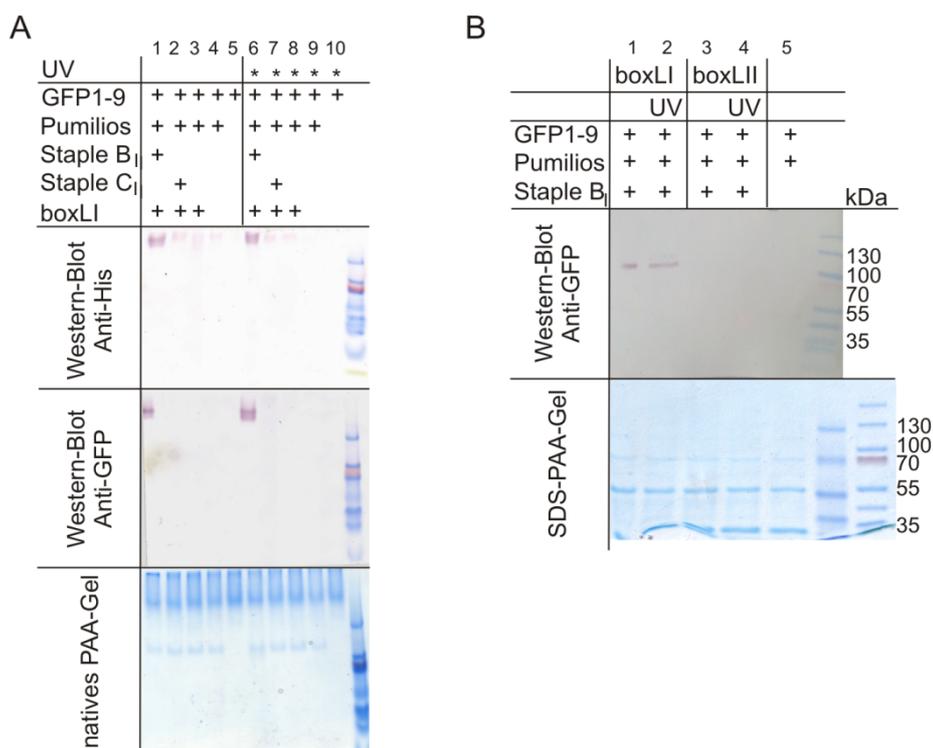


**Abbildung 3.27 Sequenzspezifische Detektion der L1 RNA mittels RNP-FC.**

A: Zeitabhängige Messung der FI ausgelöst durch RNP-FC auf boxLI Target-RNA in Anwesenheit von Staple C<sub>1</sub> oder B<sub>1</sub>. B: Unten: Endpunktwerte der relativen FI der Target-RNAs boxLI und boxLII in Anwesenheit verschiedener Staple-RNAs. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Target-RNAs ohne Staple. Mittelwerte aus mindestens zwei Doppelbestimmungen. Oben: Messung der Fluoreszenz der Proben bei 530 nm auf einer Nylonmembran.

Anhand von Western-Blot-Analysen nach vorheriger nativer PAGE konnten Proteinkomplexe bestehend aus GFP und Pumilio (mit His-Tag) nachgewiesen werden, welche nur nach vorheriger Inkubation mit der boxLI Target- und B<sub>1</sub> Staple-RNA entstanden (Abbildung 3.28A). In Proben mit der boxLII Target-RNA oder der C<sub>1</sub> Staple-RNA konnten nur die Pumilio-Proteine nachgewiesen werden, was auf eine sequenzspezifische Bildung der Proteinkomplexe hindeutet. Diese Proteinkomplexe waren sowohl in nativen PAA-Gelen, als auch in SDS-PAA-Gelen stabil (Abbildung 3.28A+B). In SDS-PAA-Gelen konnte der Proteinkomplex anhand seiner Größe von ca. 110 kDa zwei Pumilio-Proteinen und einem GFP1-9 zugeordnet werden (Pumilio: ca. 44 kDa, GFP1-9 ca. 29 kDa). Nach Bestrahlung der Proben mit UV-Licht konnte mittels Western-Blot sogar eine leicht erhöhte Bande detektiert werden, bei der es sich um ein Crosslinking Produkt aus Proteinen und RNA handeln könnte (Abbildung 3.28B). Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass in Anwesenheit der Target-RNA boxLII kein Komplex gebildet wird (Abbildung 3.28B).

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Anwesenheit eines einzelnen Pumilio-Bindemotivs auf einer RNA ohne Zugabe von Staple-RNA keine Fluoreszenzkomplementierung auslöst. Aus diesem Grund dürfte die Anwesenheit eines Pumilio-Bindemotivs auf einer anderen RNA keinen Einfluss auf die RNA-Detektion mittels RNP-FC haben. Die Ergebnisse bestätigen, dass die RNP-FC zur sequenzspezifischen Detektion von Target-RNA verwendet werden kann.

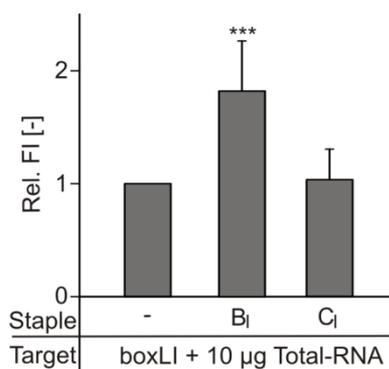


**Abbildung 3.28 Bildung der Proteinkomplexe aus Pumilio und rekonstituiertem GFP.**

A: Analyse der RNP-Komplexe nach Inkubation der Target-RNA boxLI mit den Protein S10-Pum-Var2 und Pum-Var1-S11 und GFP1-9 in Abhängigkeit der Staple RNAs B<sub>I</sub> bzw. C<sub>I</sub> für 12 h bei RT. Komplexe wurden vor (links) oder nach (rechts) Bestrahlung mit UV-Licht analysiert. Native 5 %-PAA-Gele, Western-Blot mit Anti-His<sub>4</sub> oder Anti-GFP Primärantikörper oder Coomassie-Färbung; *Protein Molecular Weight Marker* und *PageRuler Prestained Protein Ladder*. B: Analyse der Protein-Komplexe nach Inkubation der Target-RNAs boxLI oder boxLII mit den Proteinen S10-Pum-Var2 und Pum-Var1-S11 sowie GFP1-9 in Abhängigkeit der Staple RNA B<sub>I</sub> für 12 h. Proteinkomplexe wurden optional mit UV-Licht bestrahlt. 5 %-SDS-PAA-Gele, Western-Blot mit Anti-GFP Primärantikörper oder Coomassie-Färbung; *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

### 3.4.2.5. Nachweis der boxLI RNA in Anwesenheit kompetierender RNA

Zur Anwendung der RNP-FC in einem zellulären Kontext ist es entscheidend, dass die Detektion der Target-RNA auch in Anwesenheit anderer, eventuell verwandter, RNAs sequenzspezifisch und selektiv erfolgt. Aufgrund der Promiskuität von Pumilio (siehe Einleitung) und der Möglichkeit unspezifischer Hybridisierung der Staple-RNAs könnte die sequenzspezifische und selektive Detektion *in vivo* beeinträchtigt sein. Um zu testen, ob ein spezifischer Nachweis der boxLI RNA auch in Anwesenheit von kompetierender RNA erfolgt, wurde die RNP-FC in Anwesenheit bakterieller Total-RNA durchgeführt (Abbildung 3.29). Dafür wurden der Target-RNA vor der RNP-FC je 10 µg Total-RNA zugefügt, welche zuvor aus *E. coli* isoliert wurde. Um ein signifikantes Signal zu erhalten, wurde die Staple-RNA im dreifachen molaren Überschuss zur Target-RNA eingesetzt.



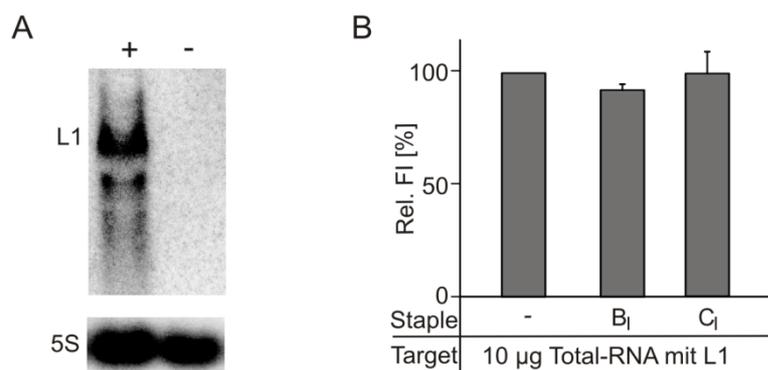
**Abbildung 3.29 Detektion der boxLI RNA in Anwesenheit kompetierender RNA.**

Relative FI induziert durch boxLI RNA mit verschiedenen Staple-RNAs (-, B<sub>I</sub>, C<sub>I</sub>) in Gegenwart von 10 µg bakterieller Total-RNA. Die Signifikanzen beziehen sich auf die FI der boxLI RNA ohne Staple, welche gleich 1 gesetzt wurde. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Die relativen FI zeigten, dass das Signal für boxLI mit Staple B<sub>I</sub> in Anwesenheit von 10 µg bakterieller Total-RNA immer noch signifikant höher (1,8-fach) im Vergleich zum Hintergrund war. Im Gegensatz dazu wurde keine Fluoreszenzkomplementierung mit Staple C<sub>I</sub> beobachtet. Die Anwesenheit der kompetierenden RNA führte demnach zu einer Reduzierung der relativen Fluoreszenzintensität. Dennoch war eine sequenzspezifische Detektion der boxLI RNA möglich.

### 3.4.2.6. Versuch des Nachweises *in vivo* hergestellter L1 mRNA

In zukünftigen Experimenten soll die RNP-FC dazu genutzt werden, endogene RNA *in vivo* nachzuweisen. Daher sollte überprüft werden, ob zellulär produzierte Target-RNA mittels RNP-FC detektiert werden konnte. Dazu wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit dem pCDNA3-L1 Plasmid transformiert, welches als Templat für die murine L1 mRNA diente. Dieses Plasmid wurde von G. Loers (ZMNH, Hamburg, D) erhalten. Vor der Verwendung wurden zunächst zwei Mutationen mittels MEGA-WHOP Mutagenese und den Mutageneseprimern L1\_mut\_fwd/L1\_mut\_rev, L1\_mut\_G\_fwd/L1\_mut\_G\_rev entfernt. Nach der Transformation der Zellen mit dem finalen Konstrukt wurde die mRNA-Produktion induziert und die Total-RNA nach 60 min aus den *E. coli* Zellen isoliert. Die Integrität der L1 mRNA wurde mittels Northern-Blot unter Verwendung einer L1-sequenzspezifischen Sonde nachgewiesen (Abbildung 3.30 A). Im Anschluss wurden 10 µg der Total-RNA mit den Staples B<sub>I</sub> oder C<sub>I</sub> sowie den Proteinen für die RNP-FC inkubiert und die relative Fluoreszenzintensität nach 8 h aufgetragen (Abbildung 3.30 B). Im Vergleich zur FI induziert durch Target-RNA-beinhaltende Total-RNA, konnte für die *in vivo* produzierte L1 RNA kein Signalanstieg nach Zugabe der Staple-RNAs beobachtet werden.



**Abbildung 3.30 Nachweis *in vivo* hergestellter L1 mRNA.**

A. Detektion der L1 mRNA in 10 µg Total-RNA isoliert aus *E. coli* BL21 (DE3) pCDNA3-L1; Northern-Blot aus Agarosegel, L1 Sonde (oben), 5S rRNA Sonde (unten), Autoradiographie. B: RNP-FC Messung zum Nachweis der L1 mRNA in 10 µg Total-RNA; das Fluoreszenzsignal ausgelöst durch Total-RNA ohne Zugabe von Staple-RNA wurde auf 100 % gesetzt. Mittelwerte aus 5 Doppelbestimmungen.

Die *in vivo* produzierte L1 mRNA konnte somit nicht aus Total-RNA detektiert werden. Eine Erklärung hierfür wäre eine zu geringe Konzentration an RNA. Das vorherige Experiment unter Verwendung von *in vitro* hergestellter RNA zeigte, dass das Signal von 250 nM Target-RNA durch die Anwesenheit von 10 µg Total-RNA von einem 25-fachen auf ein 1,8-faches Signal reduziert wurde. Möglicherweise ist die Sensitivität der Methode zu gering, um die *in vivo* produzierte RNA zu detektieren.

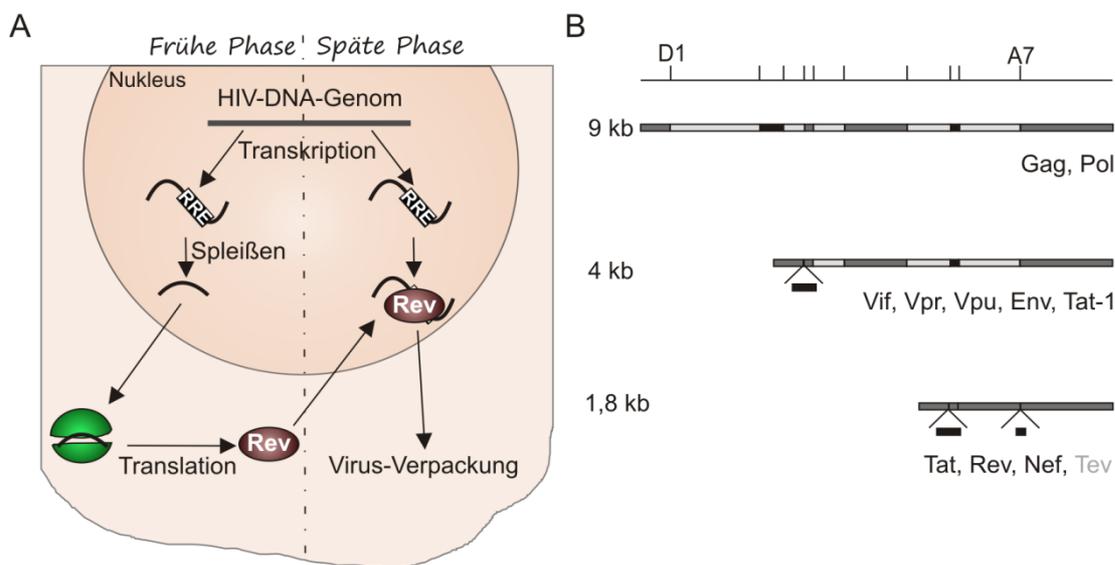
Diese Aussage kann nicht belegt werden, da keine Abschätzung über die Konzentration der L1 mRNA in der Total-RNA vorliegt. Die Signalstärke des Northern-Blots und der Vergleich mit den Experimenten für die Hb-boxAB RNA (3.2.3) lässt aber eine Konzentration im mikromolaren Bereich vermuten. Diese müsste für eine Detektion mittels RNP-FC ausreichen. Dass L1 trotz der (vermutlich) hohen Konzentration in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden konnte, könnte damit begründet werden, dass diese längere Target-RNA Strukturen ausbildet, die einen Nachweis verhindern oder dass trotz Extraktion RNA-bindende Proteine an der RNA vorliegen, welche die Bindung von Pumilio bzw. der Staples verhindern.

### 3.4.3. RNP-FC zur Detektion gespleißter RNA

Mittels der RNP-FC konnte RNA detektiert werden, die nur ein einziges Pumilio-Motiv trägt, indem eine Staple-RNA ein zweites Pumilio-Protein an die richtige Position auf der RNA dirigierte. Somit war es möglich, die Anzahl detektierbarer RNA-Sequenzen zu erhöhen. Es sollte ebenfalls getestet werden, ob es auch möglich ist, mit der RNP-FC RNA zu detektieren, welche kein Pumilio-Bindemotiv trägt. Dies wäre hilfreich, wenn RNA einer bestimmten Sequenz nachgewiesen werden soll.

Soll zum Beispiel die Prozessierung einer RNA untersucht werden, so ist es notwendig die RNA in Abhängigkeit einer bestimmten Sequenz zu detektieren. Eine Art der RNA-Prozessierung

stellt das Spleißen eukaryotischer mRNAs dar, welches zur Reifung der mRNA dient und in Form des alternativen Spleißens die Genexpression reguliert. Der Großteil eukaryotischer Gene unterliegt alternativem Spleißen, einige Studien schätzen sogar, dass im Menschen ca. 95-100 % aller Gene durch alternatives Spleißen reguliert werden.<sup>343-345</sup> Auch bei der Replikation von Retroviren, wie zum Beispiel dem HIV-1, beobachtet man alternatives Spleißen zur Regulation der Genexpression. Das einzelsträngige HIV-1 RNA-Genom wird nach der Infektion einer eukaryotischen Zelle in DNA umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert. Mittels verschiedener Spleißstellen kann die Expression der Genabschnitte durch Virus-eigene Proteine zeitlich reguliert werden. So wird beispielsweise in der frühen Phase der HIV-1-Infektion eine mehrfach gespleißte 1,8 kb RNA hergestellt, welche mittels Translation unter Anderem in das Rev-Protein umgeschrieben wird (siehe Abbildung 3.31.<sup>346-349</sup>). Das Rev-Protein kann an das sogenannte *rev response element* (RRE) innerhalb der ungespleißten oder einfach gespleißten RNA binden und dadurch eine weitere Prozessierung zur 1,8 kb RNA verhindern. In der späten Phase der Infektion liegt demnach vermehrt längere RNA vor (4 kb und 9 kb), die unter anderem für Proteine codiert, welche für die Verpackung der Viruspartikel benötigt werden oder als Genom in die Partikel verpackt wird.<sup>346-349</sup>



**Abbildung 3.31 Vereinfachte Darstellung des HIV-Infektionszyklusses.**

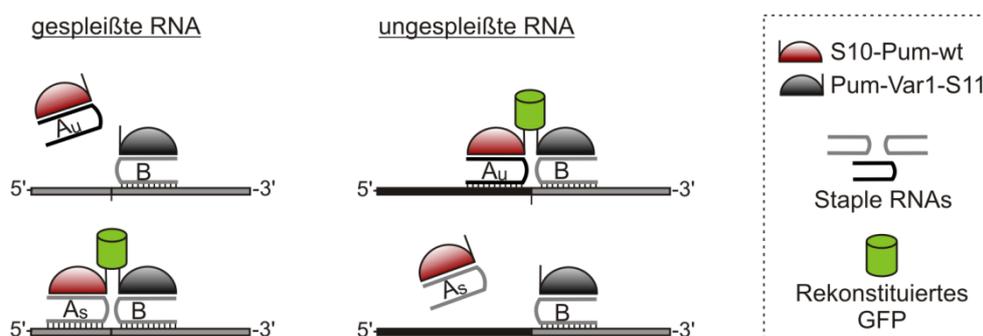
A: Vereinfachte Darstellung der frühen und späten Phase der HIV-Infektion. B: HIV-Genom mit Spleißstellen und die verschiedenen Transkripte vor und nach einmaligem oder mehrfachem Spleißen. In hellgrau sind Bereiche dargestellt, die durch alternatives Spleißen reguliert werden. Zusätzlich sind die entsprechenden Gene dargestellt, welche in dem jeweiligen Transkript aktiv sind.<sup>346-349</sup>

Um die Prozessierung der HIV-RNA und deren Lokalisation verfolgen zu können, wäre es von Nutzen, ein Detektionssystem zu entwickeln, welches in Abhängigkeit vom Spleißen ein Signal gibt und es zusätzlich erlaubt die RNA in der Zelle zu verfolgen.

Aus diesem Grund sollte die TetFC für den Nachweis des Spleißens an der Spleißstelle A7 verwendet werden. Da sich aber im Umfeld dieser Spleißstelle kein geeignetes Pumilio-Bindemotiv finden ließ, wurde die Methode der RNP-FC unter Verwendung von zwei Staple-RNAs angewandt.

### 3.4.3.1. Nachweis gespleißter RNA mittels RNP-FC und zwei Staple-RNAs

Zur Unterscheidung komplett gespleißter und ungespleißter bzw. einfach gespleißter RNA wurden die Staple-RNAs  $A_s$ ,  $A_u$  und B entworfen. Die Nomenklatur der Staple-RNAs wurde analog zu vorherigen Versuchen gewählt. Der Buchstabe A oder B bezeichnet das Pumilio-Bindemotiv, welches repräsentiert wird. Die tiefgestellten Buchstaben  $u$  oder  $s$  stehen dabei für die gespleißte oder ungespleißte Target-RNA. Zum Nachweis der komplett gespleißten RNA wurde die Staple-RNA  $A_s$  verwendet, welche am 5'-Ende das Pumilio-Bindemotiv *boxA* trug und mit dem 3'-Ende komplementär zu der Sequenz war, welche in gespleißter RNA *upstream* der Spleißstelle vorliegt (Abbildung 3.32). Um die ungespleißte RNA detektieren zu können, wurde die Staple-RNA  $A_u$  entworfen, welche ebenfalls das *boxA* Motiv trug, aber komplementär zu der Sequenz *upstream* der Spleißstelle in ungespleißter RNA war (Abbildung 3.32). Die Staple-RNA B trug das Bindemotiv *boxB* für die Bindung durch Pum-Var1-S11 und eine Sequenz komplementär zu der RNA Sequenz *downstream* der A7 Spleißstelle, welche sowohl in gespleißter, als auch ungespleißter RNA vorhanden sein sollte (Abbildung 3.32), weshalb von einem tiefgestellten Buchstaben abgesehen wurde.



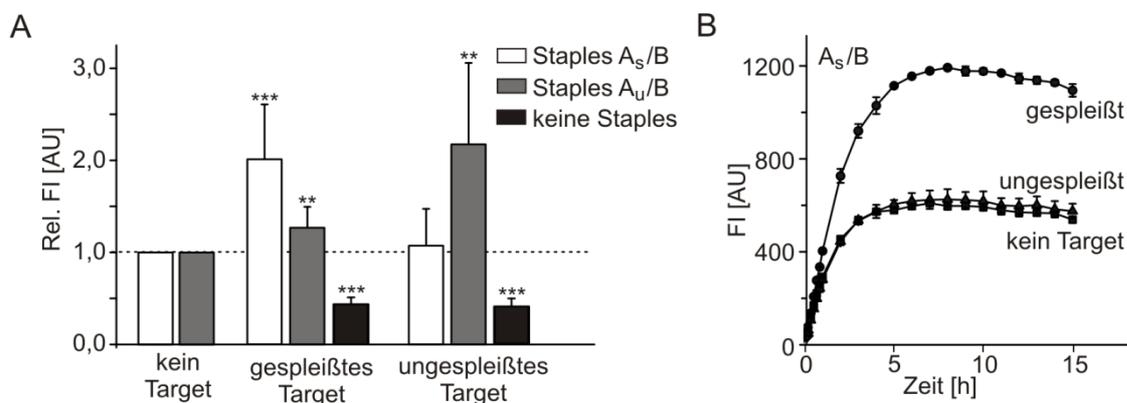
**Abbildung 3.32 Detektion gespleißter und ungespleißter HIV-RNA mittels RNP-FC.**

Schema der Detektion der gespleißten und ungespleißten HIV-Transkripte mittels RNP-FC und zwei Staple-RNAs. Bindung des Staples B und Staple  $A_s$  bzw.  $A_u$  an die gespleißte bzw. ungespleißte Target-RNA dirigiert die Pumilio-Proteine S10-Pum-wt und Pum-Var1-S11 zu den Target-RNAs. Zugabe des GFP1-9-Detektors führt zur Fluoreszenzkomplementierung.

Die Bindung der Staple-RNAs an die Target-RNAs sollte zu der Rekrutierung der Pumilio-Proteine führen und diese so in räumlicher Nähe positionieren, dass eine Proteinkomplementierung des GFPs stattfinden konnte. Dabei sollte das Staple-Paar  $A_s/B$  zu einer Fluoreszenzkomplementierung in Anwesenheit gespleißter RNA führen und das Staple-Paar  $A_u/B$  in Anwesenheit ungespleißter RNA.

Um festzustellen, ob die gespleißten und ungespleißten HIV-RNAs mittels RNP-FC voneinander unterschieden werden können, wurden zwei Target-RNAs entworfen, welche dem 51 bzw. 55 nt umliegenden Bereich der A7 Spleißstelle entsprachen. Die ungespleißte Target-RNA enthielt dabei die Sequenz der 9 und 4 kb HIV-1 Transkripte und die gespleißte Target-RNA die entsprechende Sequenz des 1,8 kb Transkripts (Vergleich Abbildung 3.31 und Abbildung 3.32).

Die Fluoreszenzkomplementierung der Proteine S10-Pum-wt, Pum-Var1-S11 und GFP1-9 wurde für die Target-RNAs HIV ungespleißt und gespleißt in Abhängigkeit der Staple-Paare  $A_S/B$  und  $A_U/B$  untersucht. Es wurden die maximalen Fluoreszenzwerte in Relation zu Proben ohne Target-RNA ermittelt. Wie in Abbildung 3.33 A zu erkennen ist, konnte mittels Staple-Paar  $A_S/B$  ein 2-facher Signalanstieg für die gespleißte RNA im Vergleich zum Hintergrund (keine Target-RNA) gemessen werden. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung des Staple-Paars  $A_U/B$  nur zu einem 1,2-fachen Anstieg der Fluoreszenz. Die ungespleißte Target-RNA konnte – wie erwartet – nur mit Staple-Paar  $A_U/B$  nachgewiesen werden, nicht jedoch mit Staple-Paar  $A_S/B$  (2,2- zu 1,1-facher Signalanstieg). Dies zeigt, dass die RNP-FC zur Unterscheidung von gespleißter und ungespleißter RNA *in vitro* geeignet ist.



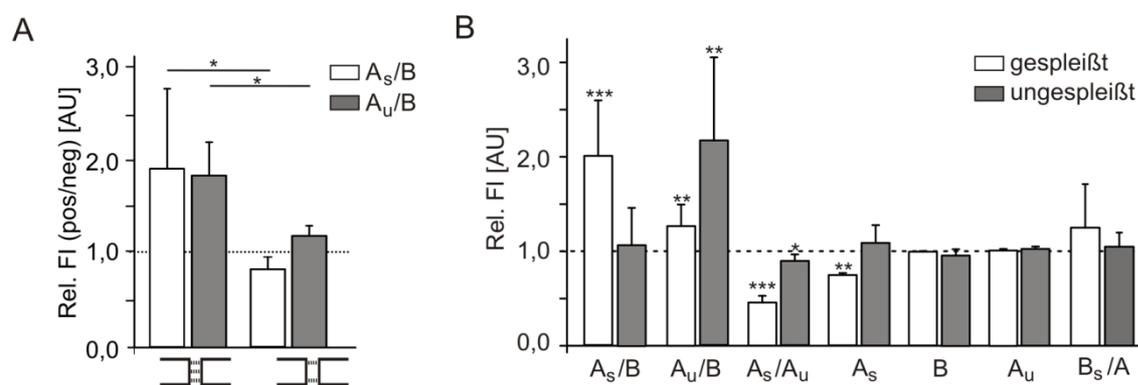
**Abbildung 3.33 Unterscheidung gespleißter und ungespleißter HIV RNA mittels RNP-FC.**

A: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Staple-Paare  $A_S/B$  oder  $A_U/B$  in Anwesenheit gespleißter oder ungespleißter Target-RNA sowie ohne Target-RNA. Maximalwerte nach 5 h. Mittelwerte aus mindestens drei Doppelbestimmungen. Die Signifikanzen beziehen sich auf die FI der jeweiligen Ansätze ohne Target-RNA, welche auf 1 gesetzt wurden. B: Zeitabhängige Vermessung der FI in Abhängigkeit der gespleißten bzw. ungespleißten Target-RNA und Staple-Paar  $A_S/B$  sowie einer Negativkontrolle ohne Target-RNA. Doppelbestimmung eines Experiments.

Die zeitabhängige Messung des Signalanstiegs für Experimente mit beiden Target-RNAs und Staple-Paar  $A_S/B$  sowie einer Negativkontrolle ohne Target über einen Zeitraum von 15 h zeigte, dass die Fluoreszenz bereits nach ca. 5 h ein Maximum erreichte und für weitere 10 h konstant blieb (Abbildung 3.34 A). Im Vergleich zur RNP-FC mit einem Staple sowie der TetFC konnte das maximale Signal ungefähr doppelt so schnell erreicht werden (in beiden Fällen ca. erst nach 10 h). Aufgrund des Anstiegs der Negativkontrollen in der ersten Stunde konnte aber erst nach

ca. 50-60 min anhand der Fluoreszenzintensität zwischen den RNAs unterschieden werden (im Vergleich dazu: TetFC und RNP-FC mit einem Staple nach 20 min).

Es war für beide Target-RNAs ein 5-fach reduziertes Signal zu beobachten, wenn keine Staples zugegeben wurden (Abbildung 3.33 A). Daraus lässt sich schließen, dass die Staple-RNAs auch ohne Target-RNA ein Hintergrundsignal auslösen. Diese Target-RNA-unabhängige Interaktion der beiden Komplexe aus Pumilio und Staple-RNA kann möglicherweise dadurch begründet werden, dass beide Staples aneinander hybridisieren können. Die Staples wurden so entworfen, dass sie in Anwesenheit der Target-RNA über drei GC-Paare miteinander interagieren können (vereinfachte Darstellung siehe Abbildung 3.34 A, untere Skizze). Eine Destabilisierung dieses doppelsträngigen Bereichs durch die Reduzierung auf zwei GC-Paare führte nicht zu einer Abschwächung des Hintergrundsignals. Es war aber zu sehen, dass das Verhältnis von positivem zu Kontroll-Signal durch die Destabilisierung von ca. 2 auf 0,8 bzw. 1,2 reduziert wurde (Abbildung 3.34 A). Dabei wurde für Staple-Paar  $A_S/B$  das Verhältnis des Signals für gespleißter zu ungespleißter RNA berechnet und für Staple-Paar  $A_U/B$  das Verhältnis von ungespleißter zu gespleißter RNA. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in weiteren Versuchen die Staples eingesetzt, welche drei GC-Paare ausbilden.



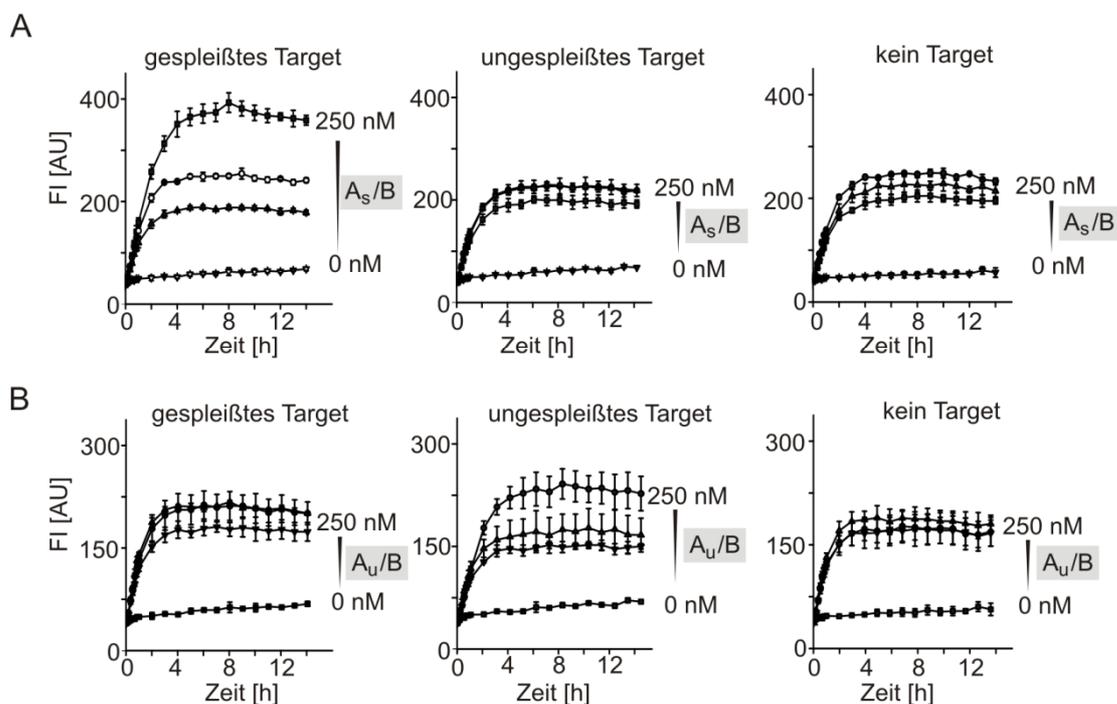
**Abbildung 3.34 Einfluss der Staple RNAs auf die RNP-FC zur Detektion der HIV-RNA.**

A: Vergleich der Staple-Paare  $A_S/B$  und  $A_U/B$  mit drei (links) oder zwei (rechts) GC-Paaren zur sequenzspezifischen RNA-Detektion. Aufgetragen ist für Staple-Paar  $A_S/B$  das Verhältnis für die gespleißte zur ungespleißten RNA und für Staple-Paar  $A_U/B$  das Verhältnis der ungespleißten zur gespleißten RNA. Für das Experiment in wurde Staple-RNAs verwendet, welche mittels *in vitro* Transkription hergestellt wurden. B: Relative FI ausgelöst durch die gespleißte oder ungespleißte Target-RNA in Abhängigkeit der Staple-Paare  $A_S/B$ ,  $A_U/B$  sowie der Kontrollen  $A_S/A_U$ ,  $A_S$ , B,  $A_U$ . Mittelwerte aus mindestens zwei Experimenten. Signifikanzen beziehen sich auf den jeweiligen Ansatz ohne Target-RNA, welcher auf 1 gesetzt wurde und in dieser Abbildung durch die gestrichelte Linie dargestellt wird.

Kontrollmessungen mit verschiedenen Kombinationen der Staple-RNAs ( $A_S/A_U$ ,  $A_S$ ,  $A_U$ , B) zeigten, dass die Detektion der Target-RNAs von der Anwesenheit beider Staple-RNAs abhing und sequenzspezifisch verlief und von der Anwesenheit des korrekten Staple-Paares abhängig war (Abbildung 3.34 B). Die Verwendung des Staple-Paares  $B_S/A$ , welches dem Paar  $A_S/B$  mit vertauschten Pumilio-Bindemotiven (boxA und boxB) entsprach, führte zu einem ca. 1,25-fachen

Signalanstieg in Anwesenheit der gespleißten RNA (Abbildung 3.34 B). Dieses leicht erhöhte Signal im Vergleich zur Fluoreszenz in Anwesenheit der ungespleißten RNA deutet auf eine Flexibilität der Staple- und Target-RNAs hin.

Es wurde gezeigt, dass das unspezifische Hintergrundsignal durch geringere Konzentrationen an Staple-RNAs nicht reduziert werden konnte (Abbildung 3.35).



**Abbildung 3.35 Einfluss der Staple-RNA Konzentration auf die RNP-FC.**

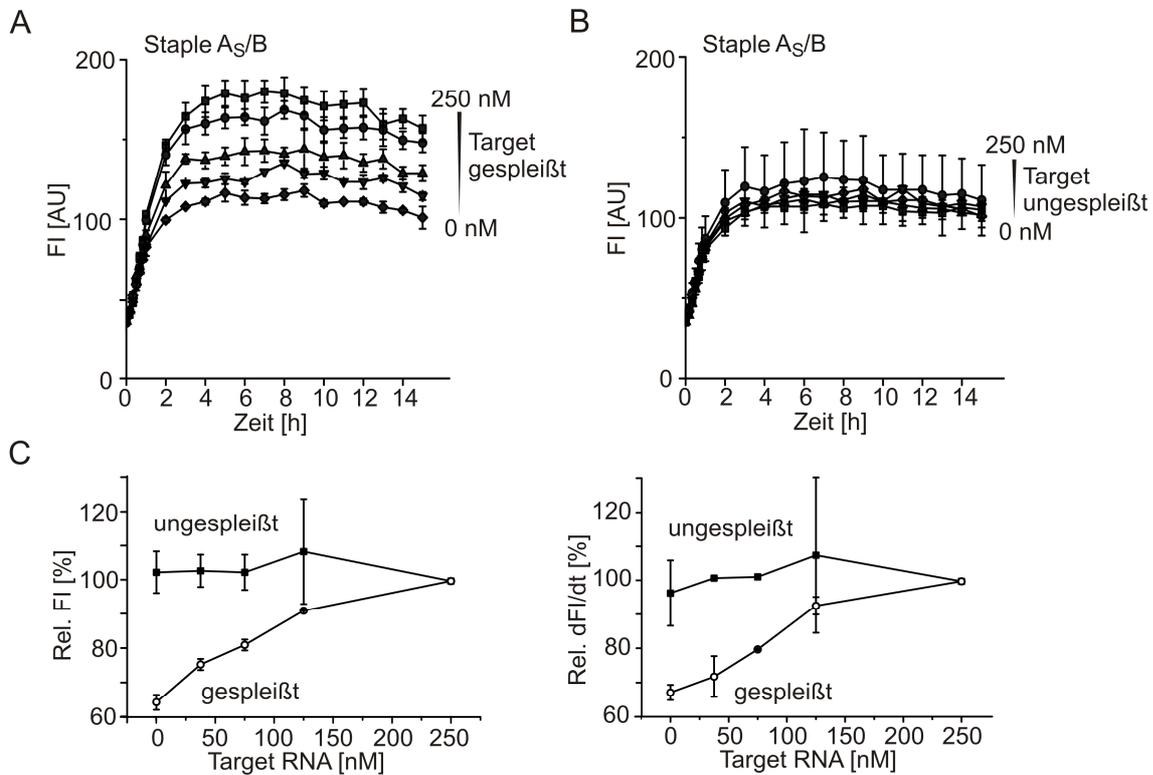
Anstieg der Fluoreszenzintensitäten ausgelöst durch 250 nM gespleißte oder ungespleißte bzw. keine Target-RNA in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen (0 nM, 75 nM, 125 nM und 250 nM) der Staple-Paare  $A_S/B$  (Abb. A) oder  $A_U/B$  (Abb. B).

Es ist zu sehen, dass das Hintergrundsignal durch die Verringerung der Staple-Konzentration nicht reduziert werden konnte, jedoch das Positiv-Signal mit Abnahme der Staple-Konzentration verringert wurde. Dies bedeutet, dass die RNP-FC von der Konzentration der Staple-RNAs abhängig ist und ein äquimolares Verhältnis von Target zu Staple-RNA benötigt wird, um 250 nM Target-RNA nachweisen zu können.

### 3.4.3.2. Einfluss der Target-RNA-Konzentration auf die RNP-FC

Um zu untersuchen, ob das gemessene Fluoreszenzsignal der RNP-FC auch mit der Target-RNA Konzentration korreliert, wurden Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Target-RNA und dem Staple-Paar  $A_S/B$  durchgeführt. In Abbildung 3.36A ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal mit steigender Konzentration der gespleißten Target-RNA zunimmt. Im Gegensatz dazu war keine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration der ungespleißten Target-RNA zu beobachten (Abbildung 3.36B). Die Auftragung der maximalen Fluoreszenzintensitäten gegen die Target-RNA Konzentrationen verdeutlicht diese Beobachtungen (Abbildung 3.36C). Der Vergleich der maximalen Fluoreszenzintensitäten und

der relativen Anfangsgeschwindigkeiten der Fluoreszenzausbildung, welche in Abbildung 3.36C dargestellt sind, zeigt, dass beide Werte gleichermaßen von der Target-RNA Konzentration beeinflusst werden. Demnach ist sowohl die Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenzausbildung als auch die maximale Fluoreszenzintensität geeignet, um als Maß für die RNA-Konzentration zu dienen.



**Abbildung 3.36 Einfluss der Target-RNA Konzentration auf die RNP-FC mit zwei Staples.**

A: Zeitabhängige Messung der FI in Abhängigkeit des Stapel-Paares A<sub>S</sub>/B und verschiedener Konzentrationen der gespleißten Target-RNA (0 nM, 37,5 nM, 75 nM, 125 nM und 250 nM). Doppelbestimmung eines Experiments. B: Zeitabhängige Messung der FI in Abhängigkeit des Stapel-Paares A<sub>S</sub>/B und verschiedener Konzentrationen der ungespleißten Target-RNA (0 nM, 37,5 nM, 75 nM, 125 nM und 250 nM). Doppelbestimmung eines Experiments. C: Relative Fluoreszenzintensitäten (links) und Steigungen (rechts) der Messungen aus Abb. A-B. Die maximale Fluoreszenzintensität bzw. die Steigung innerhalb der ersten Stunde der Probe mit 250 nM Target-RNA wurde auf 100 % gesetzt und die Werte für die Proben mit weniger Target-RNA in Relation zu diesem Wert berechnet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es mittels RNP-FC möglich ist, *in vitro* zwischen zwei RNAs zu unterscheiden. Dabei konnte durch die Anwendung zweier verschiedener Paare an Stapel-RNAs *in vitro* zwischen der gespleißten und ungespleißten HIV-RNA unterschieden werden. Diese Ergebnisse sind erste Schritte dahingehend, RNA-Prozessierung mittels RNP-FC verfolgen zu können.

### 3.5. Versuch der Entwicklung eines Pumilio-Screening-Systems

Das Engineering von nukleinsäurebindenden Proteinen, wie zum Beispiel Pumilio ist von großer Bedeutung zur sequenzspezifischen Bindung und Regulation der Genexpression. Durch das Dirigieren bestimmter Effektorfunktionen an eine Target-Nukleinsäure kann diese detektiert, modifiziert oder degradiert werden.

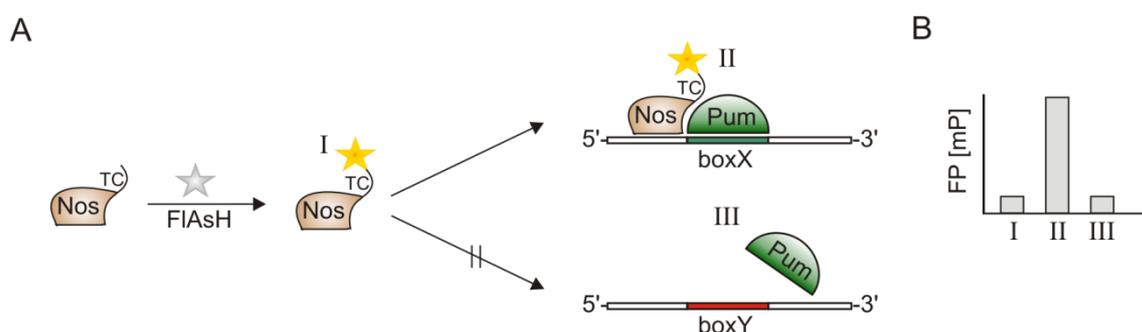
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Homologiedomäne des humanen Pumilio1 Proteins in Kombination mit dem Detektorprotein *split*-GFP zur Detektion von RNA verwendet. Da dem rationalen Design zum Engineering von PUF-Proteinen trotz großer Erfolge aber noch gewisse Herausforderungen gegenüberstehen (siehe Einleitung), ist es notwendig geeignete Screening-Strategien zu etablieren. Die etablierteste Methode zum Selektieren neuer Pumilio-Varianten stellt zurzeit das Hefe-drei-Hybrid-System dar, welches die Interaktion zwischen Pumilio und RNA *in vivo* nachweist. Dies stellt auch zugleich den größten Vorteil des Systems dar. Da anhand des Hefe-drei-Hybrid-Systems aber falsch-positive Signale detektiert werden können und es eine Kultivierung von Hefen bedingt (siehe Einleitung), sollte im Rahmen dieser Arbeit eine neue Screening-Strategie für Pumilio etabliert werden. Dieses System sollte es erlauben, Pumilio schnell und einfach auf die Bindung an eine bestimmte RNA zu screenen ohne das Protein oder die RNA zu modifizieren.

#### 3.5.1. Screening-Strategie basierend auf Fluoreszenzpolarisation

Basis der, in dieser Arbeit entwickelten, Screening-Strategie mittels Fluoreszenzpolarisation (FP) ist die Interaktion von Pumilio mit dem Protein Nanos (Nos). Sonoda *et al.* zeigten, dass das *Drosophila melanogaster* Nos (Nos<sub>288-401</sub>) mit Pumilio (Pumilio-HD) nur in Anwesenheit einer Pumilio Target-RNA interagiert.<sup>222</sup> Es wurde gezeigt, dass Nos an den C-terminalen Teil von Pumilio bindet<sup>222,282,287,288</sup> und gleichzeitig mittels einer Zinkfinger-Domäne mit der RNA interagiert.<sup>279</sup> Eine Interaktion von Nos mit Pumilio oder der Target-RNA alleine wurde durch Sonoda *et al.* nicht beobachtet. Diese selektive Bindung an den Pumilio-RNA-Komplex von Nos bildet die Grundlage der Screening-Strategie mittels FP (Abbildung 3.37). Fluoreszenzpolarisation ist der Effekt, dass Fluorophore, wenn sie mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, in der Regel auch linear polarisiertes Licht emittieren. Die Rotationsgeschwindigkeit des Fluorophors nimmt dabei Einfluss auf die gemessene FP. Mit zwei Analysatoren, welche sich parallel und senkrecht zum Polarisator befinden, werden die parallele und perpendikuläre Emissionsstrahlung gemessen, deren Verhältnis zueinander ein Maß für die Depolarisation darstellen.<sup>350</sup> Befindet sich ein fluoreszierendes Molekül (in diesem Fall fluoreszenzmarkiertes Nos) in der Lösung, das aufgrund seiner Größe schnell rotiert, so ist die Emissionsfluoreszenz depolarisiert, die gemessene FP ist demnach gering (Abbildung 3.37 B, I). Wird aber ein größeres fluoreszierendes Molekül vermessen (in diesem Fall der Nos-Pum-RNA-

Komplex), welcher langsamer rotiert, wird das Licht weniger stark depolarisiert. Die gemessene Fluoreszenzpolarisation ist nun im Vergleich zum kleineren Molekül weniger stark reduziert (Abbildung 3.37 B II).<sup>350</sup> Anhand der FP-Messung kann demnach eine Aussage darüber getroffen werden, ob Nos mit einem Pum-RNA-Komplex interagiert oder nicht. Da die Bindung von Nos von der vorherigen Ausbildung des Pumilio-RNA-Komplexes abhängt, lässt dies wiederum eine Schlussfolgerung zu, ob Pumilio an die RNA gebunden hat.

Für die Etablierung einer entsprechenden Strategie, sollte die Nos<sub>288-401</sub>-Domäne (Nos) mit einem Tetra-Cystein (TC)-Tag versehen werden, welcher eine spezifische Fluoreszenzmarkierung des Proteins mit dem Farbstoff FIAsh (*fluorescein arsenical hairpin binder*) erlauben sollte.<sup>351,352</sup> Im Anschluss sollte dieses fluoreszenzmarkierte Nos in Gegenwart der Target-RNA und einem potentiell bindenden Pumilio inkubiert und die FP bestimmt werden. Bindet Pumilio an die RNA, so kann auch Nos mit dem Komplex interagieren und eine hohe Fluoreszenzpolarisation ist nachweisbar (Abbildung 3.37 A und B II). Ist das vorliegende Pumilio allerdings kein Interaktionspartner der Target-RNA, so findet auch keine Interaktion mit Nos statt und die Fluoreszenzpolarisation im Vergleich zu freiem Nos ändert sich nicht (Abbildung 3.37 A und B III). Mit Hilfe dieser neuen Methode könnten mehrere Pumilio-Varianten auf ihre Bindung an eine bestimmte Target-RNA charakterisiert werden. Dazu müsste lediglich das Nos, nicht aber Pumilio oder die RNA markiert werden. Außerdem müssten die *E. coli* Zellen nur lysiert, das Pumilio-Protein aber nicht gereinigt werden. Dieses Hochdurchsatz-Screening würde es erlauben, Pumilio-Bibliotheken zu untersuchen, welche mit Mutagenesemethoden hergestellt wurden und gegebenenfalls gerichtete Evolution durchzuführen.

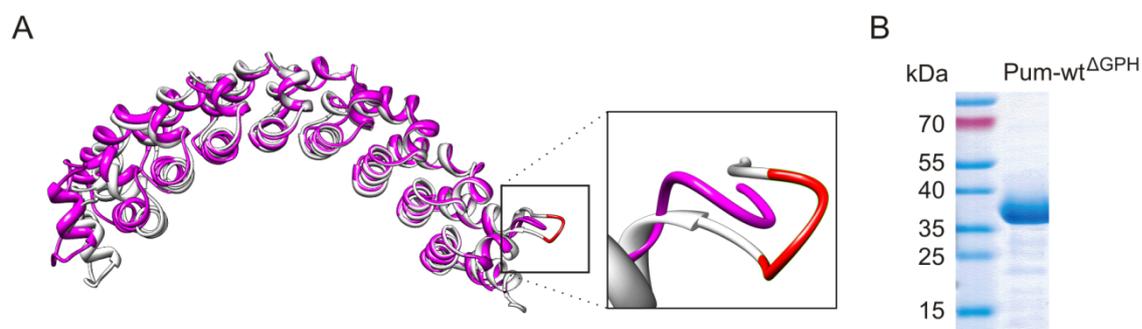


**Abbildung 3.37 Screening-Schema basierend auf Fluoreszenzpolarisation.**

A: Das Protein Nos trägt einen Tetra-Cystein-Tag und wird mittels FIAsh fluoreszenzmarkiert (I). Bindung von Nos findet nur an den Pumilio-RNA-Komplex (II) nicht aber an Pumilio oder RNA (III) alleine statt. B: Bindung von Nos an den Pumilio-RNA-Komplex (II) führt zur Erhöhung der Fluoreszenzpolarisation im Vergleich zu Nos alleine (I). Findet keine Bindung statt (III), so wird die FP nicht erhöht. Auf diese Weise könnten neue Pumilio-Varianten hinsichtlich ihrer Bindung an ein bestimmtes RNA Motiv charakterisiert werden.

### 3.5.2. Herstellung der Pumilio-wt<sup>ΔGPH</sup> Deletionsvariante

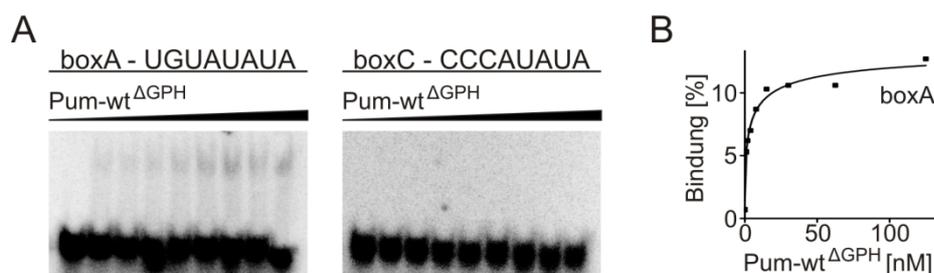
Die RNA-abhängige Interaktion mit Nos wurde für die *Drosophila melanogaster* Pum-HD beschrieben, welche im Vergleich zum *Homo sapiens* Protein eine Deletion von drei Aminosäuren in PUF-Repeat 8 aufweist (Sonoda *et al.*<sup>222</sup>, Abbildung 3.38 A). Sonoda *et al.* zeigten, dass diese drei Aminosäuren (GPH) eine Interaktion des *H. sapiens* Pumilios mit Nos verhindern, da ihre Deletion eine Interaktion des Pum-RNA-Komplexes mit Nos ermöglichte.<sup>222</sup> Für die Etablierung einer Screening-Methode zur Bestimmung RNA-bindender humaner Pum-Varianten, musste somit zunächst die Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> Deletionsvariante hergestellt und gereinigt werden. Die GPH-Deletion wurde mittels Mutagenese über Assemblierungs-PCR und den Mutageneseprimern Pum\_dGPH\_fwd/Pum\_dGPH\_rev in das Plasmid pET22b+Pum-wt eingeführt. Das Protein wurde nach dem Standardprotokoll für Pumilio-Proteine mit einer Ausbeute von 8 mg pro Liter Kultur in *E. coli* produziert und gereinigt (Abbildung 3.38 B).



**Abbildung 3.38 Herstellung der Pumilio-Variante Pum-wt<sup>ΔGPH</sup>.**

A: Überlagerung der Struktur der *H. sapiens* (weiß) und *D. melanogaster* (rosa) Pumilio-Homologie-Domäne. Die Vergrößerung zeigt die Schleife aus PUF-Repeat 8, welche die zusätzlichen Aminosäuren GPH (rot) in der HsPumHD trägt (PDB-ID: 3Q0L<sup>302</sup>, 3H3D<sup>290</sup>); B: Analyse der Reinigung der ~41 kDa großen Variante Pum-wt<sup>ΔGPH</sup>; SDS-PAA-Gel, Coomassie-Färbung; PageRuler Prestained Protein Ladder.

Nachdem die Pumilio Deletionsvariante Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> erfolgreich rekombinant produziert und gereinigt wurde, sollte getestet werden, ob die Bindung an die Target-RNA durch die Deletion der drei Aminosäuren beeinflusst wurde. Dazu wurden Gel-Shifts mit Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> und der boxA sowie boxC RNA durchgeführt (Abbildung 3.39).



**Abbildung 3.39 Bindungsstudien der Variante Pumilio-wt $\Delta$ GPH.**

A: Gel-Shifts der RNAs boxA und boxL mit Pumilio-wt $\Delta$ GPH (0-125 nM); Gel-Shift-PAA-Gel, Autoradiographie. B: Auswertung des Gel-Shifts für Pumilio-wt $\Delta$ GPH mit boxA, welcher in Abb. A dargestellt ist. Aufgetragen wurde der Prozentsatz an gebundener RNA gegen die Proteinkonzentration. Der  $K_D$ -Wert ( $3,8 \pm 0,7$  nM) wurde aus zwei Experimenten gemittelt.

Die Ergebnisse zeigten, dass trotz der Deletion Sequenzspezifität für die boxA Target-RNA vorlag. Die nachgewiesene Bindung von Pumilio-wt $\Delta$ GPH an boxA ist hoch-affin ( $K_D = 3,8 \pm 0,7$  nM vs.  $2 \pm 2$  nM für Pumilio-wt). Demnach konnte gezeigt werden, dass die Deletion keine negative Auswirkung auf die Bindungseigenschaften des Proteins hat.

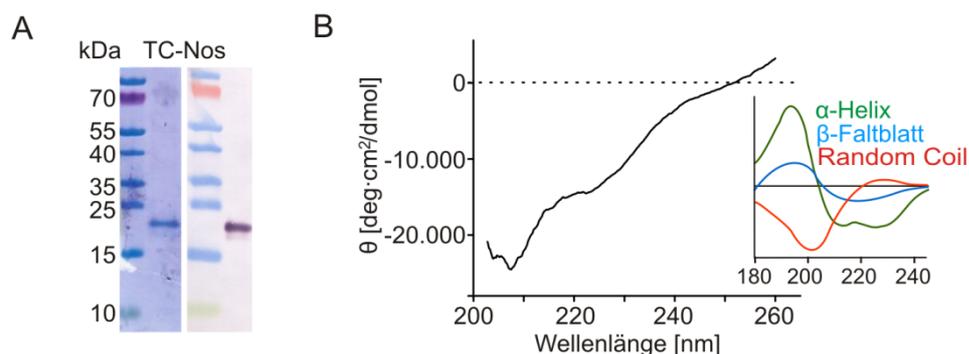
### 3.5.3. Herstellung und Reinigung des Proteins TC-Nos

Das Protein Nanos sollte im Rahmen dieser Arbeit für die Charakterisierung von Interaktionsstudien mit Pumilio verwendet werden. Es sollte hierfür die Nos<sub>288-401</sub>-Domäne (Nos) verwendet werden, welche für die Interaktion mit RNA und Pumilio verantwortlich ist.<sup>222</sup> Für Interaktionsstudien mittels Fluoreszenzpolarisation sollte Nos mit einem Tetra-Cystein-Tag versehen werden, um es nach Produktion und Reinigung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FlAsH markieren zu können. Voraussetzung für den Einsatz von TC-Nos in Interaktionsstudien war die Etablierung einer Reinigungsstrategie für dieses Protein.

#### 3.5.3.1. Reinigung von TC-Nos aus Einschlusskörperchen

Das Gen codierend für Nos<sub>288-401</sub> wurde mit N-terminalem Tetra-Cystein(TC)-Tag käuflich erworben und in den pRSET-A Vektor kloniert. Testexpressionen in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen zeigten, dass das Protein unter den durchgeführten Bedingungen nicht löslich produziert werden konnte. Auch Veränderungen des Mediums (LB, 2xYT, TB), der Produktionstemperaturen (17, 25, 37 °C) und der IPTG-Konzentration (0,1- 2 mM) führten nicht zu löslichem Protein. Aus diesem Grund wurde das Protein aus Einschlusskörperchen isoliert und mit der Methode nach Cabantous *et al.* zurück gefaltet (7.3.6, <sup>353</sup>). Bei dieser Methode wird das Protein nach der Reinigung aus den Einschlusskörperchen denaturiert und durch schnelles Verdünnen in Renaturierungspuffer zurückgefaltet. Gelelektrophoretische Untersuchungen zeigten, dass TC-Nos durch diese Methode mit einer Ausbeute von 2,4 mg pro Liter Kultur aus den Einschlusskörperchen isoliert werden konnte (Abbildung 3.40 A). Um festzustellen, ob das Protein auch korrekt gefaltet war, wurde ein CD-Spektrum aufgenommen (Abbildung 3.40 B). Da

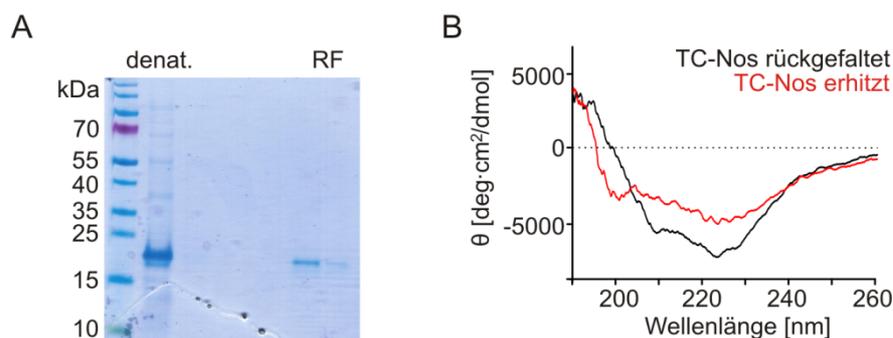
die Kristallstruktur der Zinkfinger-Domäne von Nos vorliegt, ist bekannt, dass dieses Protein  $\alpha$ -helikale und Random Coil-Strukturen aufweist (PDB: 3ALR<sup>354</sup>). Das gemessene Spektrum zeigte allerdings keine der typischen Proteinsekundärstrukturen (zum Vergleich sind Spektren von Proteinen angezeigt, welche diese typischen Strukturen aufweisen), so dass angenommen werden konnte, dass TC-Nos nicht erfolgreich rückgefaltet wurde. Trotz dieser Ergebnisse wurde dieses Protein in späteren Versuchen verwendet, um die Markierung mit FLASh zu optimieren.



**Abbildung 3.40 Reinigung von TC-Nos aus Einschlusskörperchen.**

A: Analyse der Proteinreinigung aus Einschlusskörperchen; 10 %-SDS-PAA-Gel mit Coomassie-Färbung (links) und Western-Blot mit Anti-His Antikörper (rechts); *PageRuler Prestained Protein Ladder*. B: CD-Spektrum des TC-Nos Proteins (aufgetragen ist die molare Elliptizität pro Aminosäure). Zum Vergleich sind die CD-Spektren typischer  $\alpha$ -helikaler, Random Coil und  $\beta$ -Faltblattstrukturen illustriert (nach Whitmore *et al.* <sup>355</sup>).

Da die Methode der Rückfaltung nach Cabantous *et al.* nicht erfolgreich verlief, wurde eine weitere Strategie zur Rückfaltung getestet. Hierfür wurde TC-Nos aus den Einschlusskörperchen isoliert und mittels des N-terminalen His-Tags auf  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix immobilisiert. Durch Spülen der Matrix mit Renaturierungspuffer wurde dem Protein die Möglichkeit gegeben, sich langsam zu falten. Neben dem langsamen Pufferaustausch sollte auch die Immobilisierung des Proteins die Rückfaltung begünstigen. Mittels einer HisTrap<sup>TM</sup> Säule und dem System ÄKTApurifier konnte aber kein Protein eluiert werden. Die Rückfaltung auf  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Beads und manueller Elution hingegen führte dazu, dass TC-Nos mit einer Ausbeute von ca. 1,4 mg pro Liter Kultur erhalten wurde (Abbildung 3.41 A). Das CD-Spektrum dieses Proteins zeigte Minima bei ca. 225 nm und bei ca. 205 nm, sowie ein Maximum bei 210 nm und einen Nulldurchgang bei 200 nm auf, was  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente vermuten lässt (Abbildung 3.41 B). Als Kontrolle wurde das CD-Spektrum des Proteins nach Erhitzen aufgenommen. Es ist zu sehen, dass sich das Spektrum leicht verändert und die lokalen Minima sich weiter Richtung Null verschieben. Dies könnte ein Hinweis auf eine Denaturierung der Struktur sein und erlaubt die Vermutung, dass das Protein zuvor gefaltet vorlag.



**Abbildung 3.41 Rückfaltung von TC-Nos auf Nickel-NTA-Agarose-Beads.**

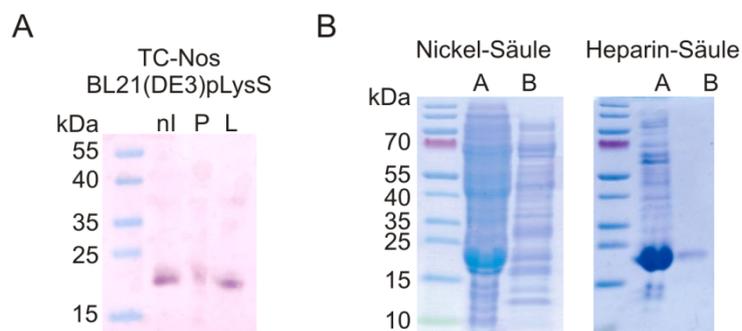
A: Analyse des denaturierten Proteins nach der Reinigung aus den Einschlusskörperchen (denat.) und der Elutionsfraktionen nach der Rückfaltung auf Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads (RF); 10 %-SDS-PAA-Gel, Coomassie-Färbung; *PageRuler Prestained Protein Ladder*. B: CD-Spektrum des rückgefalteten TC-Nos Proteins im Vergleich zu Protein, welches durch Erhitzen denaturiert wurde. Aufgetragen wurde die molare Elliptizität pro Aminosäure.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Protein TC-Nos aus Einschlusskörperchen von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen gereinigt und möglicherweise auf Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarosebeads rückgefaltet werden konnte. Da nur Vermutungen über die korrekte Faltung des Proteins angestellt werden konnten, wurde allerdings eine weitere Reinigungsstrategie etabliert.

### 3.5.3.2. Produktion und Reinigung von löslichem TC-Nos

Da TC-Nos in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen nicht löslich produziert werden konnte, wurden Zellen des Stammes BL21 (DE3) pLysS für die Proteinproduktion verwendet. Diese Zellen tragen das Plasmid für das T7 Lysozym, welches ein natürlicher Inhibitor der T7 RNA-Polymerase ist und somit eine basale Transkription des Gens verhindert, welches unter der Kontrolle des T7 Promotors steht.<sup>356</sup>

Das 18 kDa Protein konnte nach Induktion im Lysat dieser Zellen nachgewiesen werden. Es ließ sich daher vermuten, dass TC-Nos in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS löslich produziert werden konnte (Abbildung 3.42 A). Nach der Reinigung des Proteins über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule (HisTrap™) unter Verwendung des ÄKTApurifiers wurden zwei Protein-Pools A und B erhalten, in welchen das TC-Nos Protein anhand seines N-terminalen His-Tags mittels Western-Blot nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.42 B). Da diese Pools aber auch starke Verunreinigungen mit anderen Proteinen aufwiesen, wurde mit beiden Pools eine zweite Reinigung über eine Heparin-Säule durchgeführt. Nach dieser Kationenaustauschchromatographie konnte aus beiden Pools TC-Nos isoliert werden, wobei das Protein in Pool B einen höheren Reinheitsgrad aufwies (Abbildung 3.42 B).



**Abbildung 3.42 Produktion und Reinigung TC-Nos aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.**

A: Testexpression TC-Nos in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen, nl: nach der Induktion mit 1 mM IPTG, P: Pellet nach der Lyse, L: Zellüberstand nach der Lyse; Western-Blot, Anti-His Antikörper. B: Reinigung von TC-Nos mittels Nickel-NTA-Säule und anschließender Reinigung der Pools A und B über eine Heparin-Säule; 10 %-SDS-PAA-Gel, Coomassie-Färbung; *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Diese Ergebnisse zeigten, dass das Protein TC-Nos in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS löslich produziert und mittels einer zweistufigen Reinigungsstrategie aus Lysat gereinigt werden konnte.

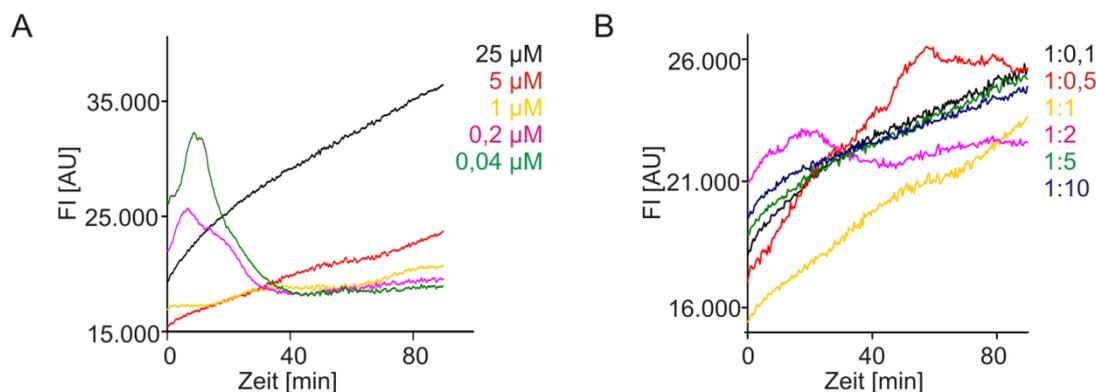
### 3.5.4. Fluoreszenzmarkierung von TC-Nos

Für die Etablierung der Fluoreszenzpolarisations-basierten Screening-Methode für Pumilio (3.5.1), musste zunächst TC-Nos spezifisch fluoreszenzmarkiert werden. Diese Markierung sollte über den Tetra-Cystein-Tag mittels des Fluorescein-Derivats FLAsH erfolgen.<sup>351,352</sup> FLAsH liegt im Komplex mit zwei Molekülen Ethandithiol (EDT) vor und ist in dieser Form nicht fluoreszierend. Erst die Bindung an die Schwefelatome der Cysteine aus dem TC-Tag führt zu einer Fluoreszenzausbildung des Farbstoffs bei 530 nm nach Anregung bei 508 nm.<sup>351,352</sup> Um die Fluoreszenzmarkierung von TC-Nos zu etablieren und charakterisieren, sollte zunächst die minimale Konzentration des Proteins bestimmt werden, welche nach Markierung mit FLAsH in einer Fluoreszenzmessung detektiert werden kann. Außerdem sollte das optimale Verhältnis von FLAsH zu TC-Nos ermittelt werden.

Für die Bestimmung des Detektionslimits wurden verschiedene Konzentrationen TC-Nos (25  $\mu$ M-0,04  $\mu$ M) in einem Verhältnis 1:1 mit FLAsH in MOPS-Puffer inkubiert und die Fluoreszenz bei 530 nm über einen Zeitraum von 90 min gemessen (Abbildung 3.43 A). Vor der Markierung war es notwendig, alle Proteine gegen Puffer ohne DTT zu dialysieren, da beobachtet wurde, dass dieses Reduktionsmittel in Anwesenheit von FLAsH einen unspezifischen Fluoreszenzanstieg auslöste. Für TC-Nos Konzentrationen von 5 und 25  $\mu$ M kann ein nahezu linearer Anstieg der FI mit der Zeit beobachtet werden. Für 25  $\mu$ M nimmt die Fluoreszenz von 20.000 auf ca. 35.000 AU zu. Auch für 5  $\mu$ M TC-Nos kann ein Anstieg der Fluoreszenz mit der Zeit beobachtet werden (von ca. 15.000 auf 24.000 AU), was bedeutet, dass die Markierung mit FLAsH erfolgreich durchgeführt und nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich aber auch, dass Konzentrationen von 1  $\mu$ M oder geringer nicht ausreichend waren, um nach Markierung mit FLAsH detektiert zu werden. Dies ist daran zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität in diesen

Proben mit der Zeit nicht zunimmt. Für Konzentrationen unter 1  $\mu\text{M}$  konnte zudem ein Ausschlag der Kurve in den ersten Minuten der Messung beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass das Limit für die Detektion von fluoreszenzmarkiertem TC-Nos mittels des Plattenlesegeräts bei ca. 5  $\mu\text{M}$  lag.



**Abbildung 3.43 Etablierung der Fluoreszenzmarkierung von TC-Nos mit FIASH.**

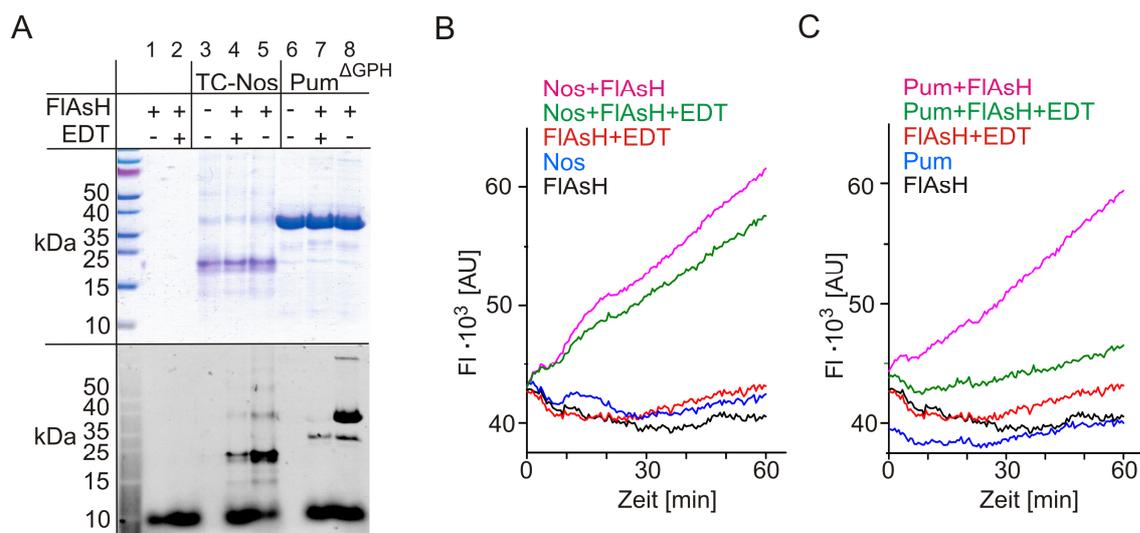
A: Anstieg der Fluoreszenzintensität (FI) unterschiedlicher Mengen TC-Nos (25–0,04  $\mu\text{M}$ ) markiert mit FIASH in einem Verhältnis 1:1 in MOPS-Puffer. B: Anstieg der FI von 5  $\mu\text{M}$  TC-Nos, inkubiert mit verschiedenen Verhältnissen FIASH (1:0,1 bis 1:10) in MOPS-Puffer. Exzitation: 508 nm, Emission: 530 nm.

Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von FIASH zu TC-Nos, wurden jeweils 5  $\mu\text{M}$  des Proteins mit unterschiedlichen Konzentrationen des Farbstoffes inkubiert (Verhältnis 1:0,1 bis 1:10) und der Anstieg der Fluoreszenz über einen Zeitraum von 90 min gemessen. Es ist zu erkennen, dass jede Konzentration an FIASH für die Markierung von TC-Nos ausreichend war, da die Fluoreszenz mit der Zeit zunahm. Ein Verhältnis von 1:1 wurde für weitere Experimente verwendet, da die Kurve der FI eine hohe Steigung (83,5 AU/min) aufwies und nahezu linear verlief.

Für den Screening-Ansatz war es notwendig, dass die Markierung mit FIASH spezifisch an den TC-Tag erfolgt und nicht andere Proteine, wie Pum-wt<sup>AGPH</sup>, unspezifisch markiert werden. Eine unspezifische Markierung von Pum-wt<sup>AGPH</sup> würde die Detektion einer RNA-abhängigen Interaktion von Nos und Pum mittels Fluoreszenzpolarisation erschweren.

Um die spezifische Interaktion von FIASH mit dem TC-Tag nachzuweisen, wurden sowohl TC-Nos als auch Pum-wt<sup>AGPH</sup> mit FIASH inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.44 A). Für dieses Experiment wurde TC-Nos verwendet, welches zuvor aus Einschlusskörperchen isoliert wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass die Fluoreszenzmarkierung des TC-Tags davon unbeeinflusst ist, ob das Protein gefaltet oder ungefaltet vorliegt. Es wurden ebenfalls Proben angefertigt, welche zusätzlich einen zehnfachen Überschuss an EDT enthielten, um eine unspezifische Interaktion des Farbstoffs mit Cystein-Resten zu unterbinden. Der Vergleich des coomassiegefärbten und fluoreszenzdetektierten SDS-PAA-Gels zeigt deutlich die Markierung beider Proteine in Anwesenheit von FIASH. Dies ist daran zu erkennen, dass in den Proben mit

FlAsH (Spur 4+5, 8) auch Fluoreszenzsignale (schwarz, unteres Gel) auf der Höhe der Proteinbanden (blau, oberes Gel) detektiert werden konnten (TC-Nos: ca. 18 kDa, Pum-wt<sup>ΔGPH</sup>: ca. 40 kDa). In allen Spuren, welche FlAsH enthielten, ist ebenfalls eine fluoreszierende Bande bei ca. 10 kDa zu beobachten, welche dem Fluorophor zugeordnet wurde. Nach Zugabe von EDT (Spur 4, 7) wurde die Markierung mittels FlAsH aber nur noch für Nos (Spur 4) nicht aber für Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> (Spur 7) detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die unspezifische Markierung von Pumilio durch EDT verhindert werden konnte.



**Abbildung 3.44 Spezifische Fluoreszenzmarkierung von TC-Nos mit FlAsH.**

Markierung der Proteine TC-Nos (Nos) und Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> (Pum) mit FlAsH oder FlAsH und EDT. A: 25 μM FlAsH (optional mit 250 μM EDT vor inkubiert) wurden mit 25 μM Nos oder 50 μM Pum inkubiert; SDS-PAGE, Oben: Coomassie-Färbung, Unten: Fluoreszenzmessung bei 530 nm nach Anregung mit blauer LED; PageRuler Prestained Protein Ladder. B-C: Anstieg der Fluoreszenzintensität von 5 μM Nos (B) oder Pum (C) in Puffer A mit 10 μM FlAsH (optional mit 100 μM EDT vor inkubiert. Exzitation: 508 nm, Emission: 530 nm.

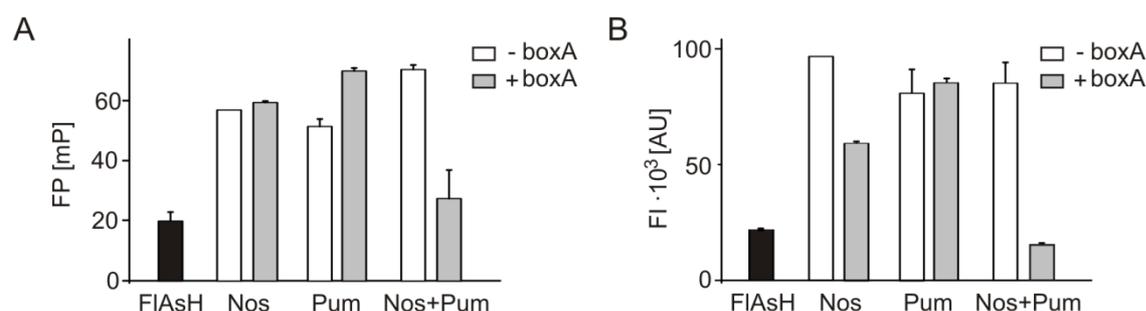
Diese Beobachtungen wurden ebenfalls durch Fluoreszenzmessungen in Lösung bestätigt. Beide Proteine wurden dazu mit FlAsH bzw. FlAsH und EDT inkubiert und der Anstieg der Fluoreszenzintensität verfolgt (Abbildung 3.44 B, C). Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz von TC-Nos in Anwesenheit von FlAsH mit der Zeit ansteigt und diese Zunahme der FI durch Zugabe von EDT nicht verhindert wird. Im Gegensatz dazu steigt die FI für Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> zwar auch in Anwesenheit von FlAsH an, diese unspezifische Markierung kann aber durch die Zugabe von EDT unterdrückt werden. Demnach ist eine spezifische Markierung des TC-Nos Proteins mittels FlAsH auch in Gegenwart von Pumilio möglich, wenn EDT in der Lösung vorliegt.

### 3.5.5. Interaktionsstudien von TC-Nos und Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> mittels Fluoreszenzpolarisation

Nach der erfolgreichen Reinigung von Pumilio-wt<sup>ΔGPH</sup> und TC-Nos sowie der spezifischen Fluoreszenzmarkierung von TC-Nos, erfolgten erste Interaktionsstudien mittels Fluoreszenzpolarisation (FP). Diese Studien wurden in An- und Abwesenheit der Pumilio

Target-RNA *boxA* durchgeführt. Zunächst wurde die FP des Farbstoffs FIAsh mit EDT vor und nach Zugabe von Nos vermessen (Abbildung 3.45 A). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die FP von FIAsh durch die Bindung an Nos 3-fach erhöht wurde (von 20 auf ca. 60 mP). In anderen Experimenten konnte sogar ein Signalanstieg bis auf das Zehnfache beobachtet werden. Wider Erwarten stieg die FP von FIAsh ebenfalls an, wenn Pumilio-*wt<sup>ΔGPH</sup>* zugegeben wurde (von 20 auf ca. 50 mP). Dieser Effekt spiegelt die Beobachtungen wider, dass Pumilio-*wt<sup>ΔGPH</sup>* unspezifisch mit FIAsh markiert und diese Markierung nicht immer erfolgreich durch EDT verhindert werden kann. Nach Zugabe der *boxA* RNA stieg die FP von FIAsh-TC-Nos nicht weiter an, was die Vermutung bestätigt, dass Nos nicht unspezifisch an die RNA bindet. Die FP von FIAsh mit Pum-*wt<sup>ΔGPH</sup>* stieg nach Zugabe der RNA jedoch um ca. 20 mP an, was durch die Bindung von Pumilio an die RNA erklärt werden kann (Abbildung 3.45 A).

Um festzustellen, ob Nos und Pum-*wt<sup>ΔGPH</sup>* miteinander interagieren, wurde die FP des Farbstoffs in Gegenwart beider Proteine und EDT in An- oder Abwesenheit von *boxA* bestimmt. Bei Komplexbildung von FIAsh-markiertem Nos und Pum-*wt<sup>ΔGPH</sup>* würde eine Zunahme der FP im Vergleich zu Nos alleine erwartet werden. Bei Anwesenheit beider Proteine ohne RNA wurde tatsächlich ein geringer Signalanstieg im Vergleich zu FIAsh-markiertem Nos alleine gemessen (von 60 auf ca. 70 mP, Abbildung 3.45 A). Das deutet darauf hin, dass trotz Abwesenheit einer Pumilio Target-RNA eventuell eine Interaktion beider Proteine auftritt. Nach Zugabe der Target-RNA *boxA* konnte hingegen statt der erwarteten Zunahme eine drastische Reduzierung des FP-Signals auf ca. 25 mP nachgewiesen werden. Dieses Signal entsprach ungefähr dem Wert für FIAsh ohne Protein.



**Abbildung 3.45 Interaktion von Pum-*wt<sup>ΔGPH</sup>* mit gefaltetem TC-Nos.**

Untersuchung der Interaktion von TC-Nos (aus löslicher Expression) und Pum-*wt<sup>ΔGPH</sup>* in Abhängigkeit von *boxA* RNA mittels Fluoreszenzpolarisierung. Nos wurde mit FIAsh und EDT markiert und im Anschluss mit Pumilio, der RNA oder dem Pum-RNA-Komplex inkubiert. A: Fluoreszenzpolarisierung (FP)-Messung, FIAsh+EDT diente als Vergleichswert (20 mP). B: Fluoreszenzintensitätsmessung der Proben, deren FP in Abb. A dargestellt sind. Doppelbestimmung.

Um diesen Signalverlust erklären zu können, wurden die Intensitäten der Fluoreszenz ausgewertet, welche während der FP-Messung aufgenommen wurden (Abbildung 3.45 B). Diese Werte zeigen, dass die Intensität der Fluoreszenz des Farbstoffs sowohl nach Zugabe von Nos, als auch Pum-*wt<sup>ΔGPH</sup>* anstieg, was die Annahme bestätigt, dass FIAsh an die Proteine gebunden

hatte. Dass dieser Fluoreszenzanstieg nicht nur für Nos sondern ebenfalls für Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> beobachtet werden konnte, bestätigt, dass FLAsH unspezifisch an Pum gebunden hatte.

Nach Zugabe der RNA blieb die Fluoreszenzintensität für Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> gleich, für Nos wurde sie jedoch wider Erwarten reduziert. Dieses Phänomen, in Kombination mit den Beobachtungen der FP-Messung lässt zwei Annahmen zu.

Zum einen liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion von Nos mit der RNA die Bindung des FLAsHs an Nos schwächt. Dies würde zur Folge haben, dass freies FLAsH in der Lösung vorliegt und das FP-Signal reduziert wird. Da eine Bindung von Nos an die RNA nur durch Interaktion von Pumilio vermittelt werden soll, würde dies erklären, warum die FP nur in der Probe reduziert wird, in welcher beide Proteine und RNA vorhanden sind und nicht in der Probe mit nur Nos und RNA. Demnach würde eine Bindung von Nos an Pum und die Interaktion mit der RNA die Menge an freiem FLAsH erhöhen.

Eine weitere Erklärung wäre, dass eine Bindung von Nos an die RNA ein Quenching des Fluoreszenzsignals verursacht. Da davon ausgegangen wird, dass Nos nur im geringen Maße an die RNA bindet und demnach der größte Anteil von Nos ungebunden vorliegt, würde dies erklären, warum die FI der Nos-RNA Probe sinkt, aber die FP gleich bleibt. Es wird davon ausgegangen, dass die Anwesenheit von Pum die Bindung von Nos an die RNA vermittelt. Das könnte dafür sprechen, dass das Fluoreszenzsignal für Nos+Pum in Anwesenheit der RNA drastisch reduziert wird, da die Fluoreszenz des FLAsH-markierten Nos ausgelöscht wird. Die restliche Fluoreszenz in der Probe würde demnach von freiem FLAsH in der Lösung stammen, was der Vergleich der FI-Werte für FLAsH alleine und den Nos-Pum-RNA Komplex bestätigt. Dies würde auch erklären, warum die FP der Probe ebenfalls auf einen Wert ähnlich dem für FLAsH sinkt. Die Fluoreszenz, welche durch die unspezifische Markierung von Pum ausgelöst wurde, schien durch ein eventuelles Quenching aber unbeeinträchtigt zu sein. Das könnte dadurch begründet werden, dass die Cysteine im Pumilio-Protein, welche nicht an der RNA-Interaktion beteiligt sind, zwar zugänglich für FLAsH sind, aber nicht so vorliegen, dass sie von der RNA ausgelöscht werden könnten.

Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation war es nicht möglich, die Bildung eines Komplexes aus Nos, Pumilio und RNA nachzuweisen. Es konnte lediglich beobachtet werden, dass die Zugabe der RNA zu einem Verlust des Fluoreszenzsignals von FLAsH-markiertem Nos führte und dass die Anwesenheit beider Proteine zusammen mit RNA eine Reduzierung der FP bedingte, welche auf eine Komplexbildung hindeutet aber nicht abschließend erklärt werden konnte.

Aus diesem Grund sollte in einem unabhängigen Experiment untersucht werden, ob tatsächlich eine Interaktion zwischen beiden Proteinen auftritt und ob diese abhängig von der Bindung an RNA ist. Aus diesem Grund wurden Pulldown-Experimente mit GST-Nos und Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> durchgeführt.

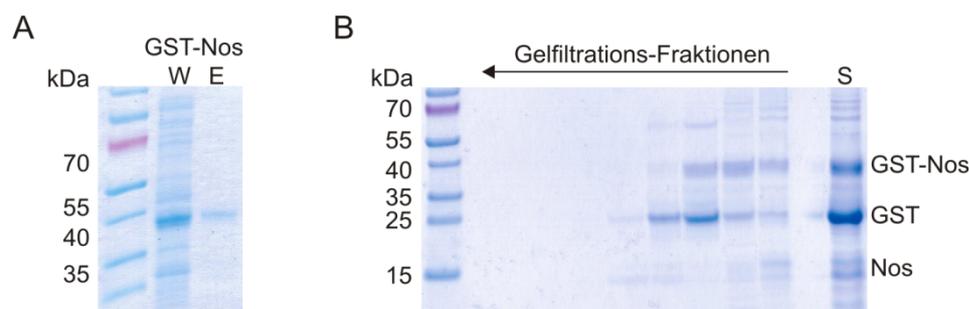
### 3.5.6. Untersuchung der RNA-Abhängigkeit der Nos-Pum-Interaktion

Im Jahr 1999 zeigten Sonoda *et al.*, dass *D. melanogaster* Nos nur mit immobilisiertem *D. melanogaster* Pum interagiert, wenn dieses zuvor die entsprechende Target-RNA gebunden hatte.<sup>222</sup> Dieses Experiment lieferte die Grundlage für die Annahme, dass *D. melanogaster* Nos und Pumilio nur in Gegenwart von Pumilio Target-RNA miteinander agieren. Da im Folgenden durch verschiedene Gruppen für eine Reihe weiterer Nos-Pum Paare eine RNA-unabhängige Interaktion nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 1.3.1), besteht die Vermutung, dass es sich bei den Ergebnissen von Sonoda *et al.* um ein Artefakt handelt. Des Weiteren wurde von Sonoda *et al.* gezeigt, dass eine Insertion der drei Aminosäuren GPH in PUF-Repeat 8 des *H. sapiens* Pumilios die Interaktion mit Nos unterbindet. Um zu bestimmen, ob Nos und Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> unabhängig von der Bindung an Target-RNA miteinander interagieren, sollten daher im Rahmen dieser Arbeit Pulldown-Studien durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst das Fusionsprotein GST-Nos produziert und gereinigt, um dieses für den Pulldown auf Glutathion-Beads immobilisieren zu können.

#### 3.5.6.1. Reinigung des Fusionsproteins GST-Nos

Für die Untersuchung der Interaktion von Nos mit Pumilio unter Verwendung von Pulldown-Studien sollte das Protein Nos als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) produziert und gereinigt werden. Außerdem sollte die Fusion von Nos mit GST die Löslichkeit erhöhen und eine weitere Strategie zur Produktion und Reinigung von Nos (bzw. TC-Nos) ermöglichen. Das Gen codierend für Nos (aus dem Plasmid pREST-B-Nos<sub>288-401</sub>, ohne TC-Tag) wurde in den pGEX Vektor kloniert, so dass dieses mit einem N-terminalen GST-Tag exprimiert werden konnte. Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen löslich produziert und mittels Affinitätschromatographie über eine GSTrap™ Säule gereinigt (Abbildung 3.46 A). Dieses Fusionsprotein konnte für Pulldown-Studien mit Pumilio und Target-RNA verwendet werden.

Um aber auch noch eine alternativen Reinigungsstrategie des Proteins Nos (ohne GST) auf diesem Wege auszutesten, wurde GST-Nos mit Hilfe der TEV-Protease gespalten. Die gelelektrophoretische Analyse der Spaltprodukte zeigte, dass die Spaltung des Proteins erfolgreich verlief, da Proteinbanden in Höhe des GST (26 kDa) und Nos (~15 kDa) detektiert werden konnten (Abbildung 3.46 B, Spur S). Da aber auch noch GST-Nos (40 kDa) detektiert werden konnte, schien die Spaltung nicht komplett abgelaufen zu sein. Um reines Nos zu erhalten, wurden die Proteine nach der TEV-Spaltung mittels Gelfiltration getrennt. Die Analyse der Fraktionen zeigte jedoch, dass mit dieser Methode kein reines Nos erhalten werden konnte (Abbildung 3.46 B). Die Reinigung von GST-Nos mit anschließender TEV-Spaltung und Gelfiltration stellt demnach keine Alternative zu der zuvor etablierten Strategie dar.



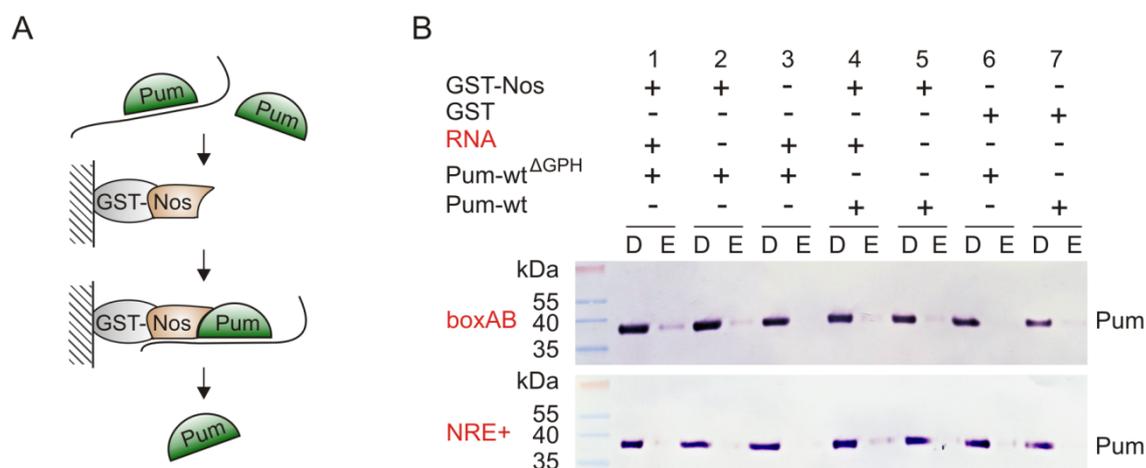
**Abbildung 3.46 Reinigung des Proteins GST-Nos und TEV-Spaltung.**

A: Waschfraktion (W) und Elutionsfraktion (E) der Reinigung des Fusionsproteins GST-Nos mittels Affinitätschromatographie über eine GSTrap™-Säule, 10 % SDS-PAA-Gel, Coomassie-Färbung; *PageRuler Prestained Protein Ladder*. B: GST-Nos nach der Spaltung mit der TEV-Protease (S) und Fraktionen der anschließenden Trennung mittels Gelfiltration, der Pfeil gibt die Reihenfolge der Elution an; 10 % SDS-PAA-Gel, Coomassie-Färbung.

### 3.5.6.2. Interaktionsstudien von GST-Nos und Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> mittels Pulldown-Experimenten

Nach der erfolgreichen Reinigung des GST-Nos Fusionsproteins sollte die RNA-Abhängigkeit dessen Interaktion mit Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> untersucht werden. Dazu wurde GST-Nos auf Glutathion-Beads immobilisiert und im Anschluss Pumilio in An- oder Abwesenheit von Target-RNA zugegeben (Schema: Abbildung 3.47 A). Wenn keine Interaktion zwischen beiden Proteinen auftrat, so sollte sich Pumilio im Durchlauf befinden. Eine Interaktion von Pumilio mit Nos sollte zur gemeinsam Elution der beiden Proteine führen. Diese Strategie wurde zur Charakterisierung der Interaktionen von Pum-wt und Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> in Kombination mit den Target-RNAs NRE+ (von Sonoda *et al.* verwendete RNA<sup>222</sup>) und boxAB mit GST-Nos angewandt (Abbildung 3.47 B). Um auszuschließen, dass Pumilio mit der Matrix oder GST interagiert, wurden als Kontrollen Ansätze ohne immobilisiertes Protein oder mit immobilisiertem GST angesetzt. Die Analyse der Durchlauf- und Elutionsfraktionen hinsichtlich der Anwesenheit von Pumilio erfolgte mittels Western-Blot und Anti-His Antikörper (Abbildung 3.47 B).

Die Analyse der Fraktionen mittels Western-Blot zeigte, dass die Pumilio-Proteine in allen Ansätzen im Durchlauf detektiert werden konnten. In Proben, welche GST-Nos auf der Matrix enthielten (Spur 1, 2, 4, 5) konnte Pum zusätzlich auch in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, was auf eine Interaktion von Nos und Pumilio hindeutet. Für die boxAB RNA wurde eine leichte Interaktion des Pum-wt mit GST beobachtet (Spur 7). In den anderen Proben war aber kein Unterschied zwischen Pum-wt (Spur 4, 5) oder Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> (Spur 1, 2) zu erkennen. Allerdings konnte die Nos-Pum-Interaktion nicht nur in Anwesenheit der Target-RNAs NRE+ oder boxAB (Spur 1 und 4), sondern ebenfalls in Abwesenheit einer Target-RNA beobachtet werden (Spur 2 und 5). Dies deutet – entgegen den Erwartungen – auf eine RNA-unabhängige Interaktion beider Proteine hin.



**Abbildung 3.47 RNA-Abhängigkeit der Interaktion von Pum-wt und Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> mit GST-Nos.**

A: Schema des Pulldowns; GST-Nos wird auf einer Glutathion-Matrix immobilisiert, RNA-gebundenes Pumilio wird von Nos gebunden und ebenfalls immobilisiert. Freies Pumilio befindet sich hingegen im Durchlauf (D). Zum Schluss kann der Protein-RNA-Komplex gemeinsam eluiert werden (E). B: Pulldown-Studien der Proteine GST-Nos und Pum-wt, bzw. Pum-wt<sup>ΔGPH</sup> in Abhängigkeit von RNA (NRE+ oder boxAB); Western-Blot, Anti-His Antikörper zur Detektion von Pumilio; *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

In allen Fällen konnte für beide Target-RNAs das gleiche Bindungsverhalten beobachtet werden. Für die Kontrollen ohne immobilisiertes Protein (Spur 3) oder mit GST (Spur 6 und 7) konnte kein Pum in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, wodurch unspezifische Interaktionen mit der Matrix oder GST ausgeschlossen werden konnten.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Interaktion von Pum und Nos nicht von der Anwesenheit einer Target-RNA abhängig ist. Des Weiteren lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Anwesenheit der drei Aminosäuren GPH im *H. sapiens* Pumilio-wt die Bindung an Nos nicht stört. Diese Aussagen widersprechen den Daten aus der Literatur,<sup>222</sup> konnten aber teilweise von D. Bhandari (Izaurrealde Gruppe, MPI Tübingen) bestätigt werden (Konversation auf der RNA2013 Tagung).

Die Hauptvoraussetzung für das ursprüngliche Screening war die Annahme, dass Nos nur mit RNA-gebundenem Pumilio interagiert. Aufgrund der neuen Erkenntnisse wurde deutlich, dass die ursprünglich angedachte Screening-Methode nicht etabliert werden kann.

## 4. Diskussion

### 4.1. Das RNA-bindende Protein Pumilio

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Reinigungsstrategie für die Pumilio-Homologiedomäne mit His-Tag etabliert werden, welche auf einer einstufigen Reinigung mittels Affinitätschromatographie basiert. Diese Strategie ähnelt der von Edwards *et al.* beschriebenen, da hierbei Pumilio ebenfalls mit einem His-Tag versehen und über eine Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Allerdings wurde in dem literaturbeschriebenen Protokoll der His-Tag nach der Reinigung abgespalten und das Protein vor der folgenden Kristallisation mittels Gelfiltration gereinigt.<sup>290</sup> Ähnliche Reinigungsstrategien wurden auch von anderen Gruppen angewandt.<sup>302,304</sup> Die Gruppe von T. Hall (NIH, NC, USA) fusionierte die Pumilio-Varianten zum Beispiel mit der Chitin-Bindedomäne und reinigten das Protein in einem ersten Schritt über Chitin-Beads. Um Aggregate zu entfernen, reinigten auch sie es in einem zweiten Schritt mittels Gelfiltration.<sup>288,289,294</sup>

Die unterschiedlichen Reinigungsstrategien bedingen auch die Unterschiede in den gemessenen Affinitätskonstanten. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Homologiedomäne des Pumilio Wildtyp Proteins ein  $K_D$  von  $2 \pm 2$  nM bestimmt, für das gleiche Protein von Cheong *et al.* aber ein Wert von  $0,48 \pm 0,21$  nM.<sup>294</sup> Dies lässt sich dadurch erklären, dass in jener Studie der funktionale Prozentsatz des Proteins anhand einer quantitativen Gelfiltration der RNA-Protein-Komplexe bestimmt und in den  $K_D$  Wert einberechnet wurde.<sup>294</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde trotz eines Überschusses an RNA nur eine 40 % maximale Bindung in Gel-Shifts beobachtet. Da Cheong *et al.* aber eine 80-100 %ige Bindung zeigen konnten, deutet dies möglicherweise darauf hin, dass in dieser Arbeit der funktionale Prozentsatz des Proteins geringer ausfiel. Um ein Maß für die Aggregation des Proteins zu erlangen, könnten DLS (*dynamic light scattering*)-Messungen durchgeführt werden, die Rückschlüsse auf den hydrodynamischen Radius des Proteins zulassen. Um die Menge an gebundener RNA und die Affinitätskonstanten zu verbessern, wäre es möglicherweise hilfreich, in zukünftigen Experimenten eine ähnliche Strategie wie Cheong *et al.* zu verfolgen. Die Reinigung des Pumilios war im Rahmen dieser Arbeit zur Etablierung von RNA-Detektionsmethoden sowie zur Etablierung eines Screening-Ansatzes erforderlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene PumHD-Varianten gereinigt und analysiert. Neben den bereits beschriebenen Varianten MUT3-2 und Pum-Var1 (MUT6-2/7-2)<sup>294</sup> wurde die neue Variante Pum-Var2 (Pum1-2/2-1/3-2) entworfen, hergestellt und gereinigt. Basierend auf Ergebnissen vorheriger Studien, wurden dazu in Repeat 6 und 7 der PumHD der

MUT3-2-Variante jeweils die beiden direkt interagierenden Aminosäuren substituiert. In Repeat 8 war es ausreichend, nur eine der beiden Aminosäuren auszutauschen. Es konnte gezeigt werden, dass die neue Variante eine vergleichbare Affinität zu der Sequenz UGUAUGGU aufwies, wie Pum-wt zu UGUAUAUA ( $K_D=15 \pm 6$  nM zu  $K_D=2 \pm 2$  nM) und die Substitutionen erfolgreich zu einer Änderung der Spezifität führten.

Ein Vergleich der Schmelztemperaturen der verwendeten Varianten, welche mittels CD-Spektroskopie bestimmt wurden, zeigt aber, dass mit zunehmender Anzahl der Aminosäuresubstitutionen die Stabilität der Proteine verringert wurde (siehe nachfolgende Tabelle). Das spricht dafür, dass das rationale Design zur Erzeugung neuer Pumilio-Varianten limitiert ist, was es erfordert andere Aminosäuren in das Design mit einzubeziehen oder Pumilio-Varianten mittels randomisierter Mutagenese herzustellen.

**Tabelle 4.1: Schmelzpunkte verschiedener Pumilio-Varianten.**

Variante	Aminosäuresubstitutionen	$T_M$ [°C]
Pum-wt	0	55,1 $\pm$ 0,1 *
MUT3-2	2	51,7 **
Pum-Var1	4	50,8 **
Pum-Var2	5	46,4 **

Aus zwei (\*) bzw. einer (\*\*) Messung berechnete  $T_M$  Werte.

Um ein mögliches Screening in Lysat zu erlauben, wurde die Bindung des Pumilio-wt an 2'-Desoxy-2'-fluor-modifizierte RNA getestet. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Bindung des Proteins an boxA durch den Einbau von 2'-Desoxy-2'-fluorpyrimidinen verhindert wurde. Dies widerspricht zunächst den Erwartungen, da Pumilio mit den Basen der RNA interagiert und nicht mit deren Rückgrat. Allerdings ist das Zucker-Phosphat-Rückgrat wichtig für die Ausbildung der richtigen Konformation zur Bindung von Pumilio. Dies zeigte sich bereits dadurch, dass die Affinität von Pumilio an einzelsträngige DNA im Vergleich zu RNA 2.500-fach reduziert war.<sup>289</sup> Es ist daher anzunehmen, dass die Veränderung der Konformation des Zuckers durch den Einbau der fluormodifizierten Ribonukleotide einen Einfluss auf die Pumilio Bindung ausübt. Da das Fluor an der 2'-Position üblicherweise dazu führt, dass der Zucker in der C3'-*endo* Konformation vorliegt,<sup>357</sup> welche typisch für RNA ist und auch bei der Bindung von Pumilio bevorzugt wird,<sup>302</sup> scheint dies aber nicht ausschlaggebend für den Bindungsverlust zu sein. Kürzlich wurde gezeigt, dass der Einbau von Fluor, obwohl er wenig Einfluss auf die Helix-Geometrie hat,<sup>358</sup> zu verstärkten Watson-Crick Wasserstoffbrücken und Stapelwechselwirkungen führt.<sup>357</sup> Es ist möglich, dass diese veränderten Interaktionseigenschaften der RNA eine Bindung verhindern. In Studien der Kristallstruktur wurde gezeigt, dass Repeat 4 des Pumilio-Proteins in Abhängigkeit der Base von der C3'-*endo*

zur C2'-endo Konformation ohne Verlust der Affinität wechseln kann.<sup>302</sup> Möglicherweise wurde diese benötigte Flexibilität des Proteins durch den Einbau der 2'-F-Modifikation gestört und dadurch die Bindung beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden beide Pyrimidin-Basen als fluormodifizierte Analoga eingesetzt. Da das Bindemotiv von Pumilio zum Großteil aus Uridinen besteht, wurde dieses stark verändert. In weiteren Versuchen wäre es eventuell möglich nur fluormodifiziertes Cytidin einzubauen, um so die Stabilität der RNA zu erhöhen ohne die Bindung des Proteins zu beeinflussen.

Die sequenzspezifische Bindung von Nucleinsäuren durch programmierbare Proteine stellt ein wichtiges Werkzeug des Genom-Engineerings sowie der Genregulation dar. Die Kombination eines sequenzspezifisch nucleinsäurebindenden Proteins mit einer Vielzahl verschiedener Effektorproteine wurde bereits mehrfach zur Genom-Manipulierung anhand der DNA-bindenden TALE (*transcription activator-like effector*) Proteine angewandt.<sup>359-361</sup> TALEs werden in der Natur von bakteriellen Pathogenen in den Wirt eingeschleust, um die Genexpression des Wirtes zu beeinflussen und dessen Abwehr zu schwächen.<sup>362</sup> Das erste untersuchte TALE-Protein war das AvrBs3 aus *Xanthomonas*, das eine Region mit 17 annähernd identischen Repeats aus 34 Aminosäuren und einem zusätzlichen „halben“ Repeat besitzt.<sup>362,363</sup> Die konservierten Konsensus-Sequenzen der TALE-Targets erlaubten es Boch *et al.* sowie Moscou und Bogdanove einen DNA-Barcode für TALEs zu erstellen.<sup>359,360</sup> Innerhalb der TALE-Proteine vermittelt - ähnlich zu Pumilio - jeweils ein Repeat die Bindung an eine Base der dsDNA.<sup>359,360,364</sup> Diese Sequenzspezifität und Programmierbarkeit führten dazu, dass die TALEs in Kombination mit Nucleasen oft als Werkzeug zum genetischen Engineering verwendet wurden.<sup>365</sup> Sequenzspezifische Genomveränderungen wurde bereits in humanen Zellen,<sup>364,366</sup> Ratten,<sup>367</sup> Pflanzen,<sup>368,369</sup> Nematoden<sup>370</sup> und Zebrafischen<sup>371,372</sup> eingesetzt. Des Weiteren war es möglich TALE-Proteine mit DNA-Rekombinasen zu verknüpfen, und so DNA-Modifizierungen in Bakterien und Säugerzellen zu steuern.<sup>373</sup>

Die Fusionierung nucleinsäurebindender Proteine mit Effektorproteinen bietet die Möglichkeit, beliebige Funktionen an der Target-Nucleinsäure auszuüben. Die Sequenzspezifität des Pumilios erlaubt es dabei, bestimmte RNAs spezifisch anzusteuern und zu regulieren. Designer PUF-Proteine wurden dabei schon zur Regulation der Translation, des alternativen Spleißens oder des RNA-Abbaus verwendet.<sup>300,305,309,315</sup> Weitere mögliche Anwendungen stellen die Inhibierung anderer Proteineffektoren oder die Modifizierung von RNA dar. Die Möglichkeit das Pumilio-Protein auf längere Sequenzen zu erweitern, erlaubt es außerdem RNAs spezifisch im Kontext komplexer eukaryotischer Transkriptome anzusteuern.<sup>301</sup>

## 4.2. Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung

### 4.2.1. Mögliche Anwendung der TetFC *in vivo*

Die intrazelluläre Visualisierung von RNAs spielt eine wichtige Rolle zum Verständnis der Regulation und Dynamiken von RNA. Besonders die Verfolgung des aktiven Transports und der subzellulären Lokalisation von RNA ist notwendig, um die Genexpression zu verstehen und mögliche therapeutische Ansätze zu entwickeln, da deren Fehlregulation oft schwerwiegende Folgen hat und zu neuronalen Erkrankungen oder Krebs führen kann.<sup>76,77</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung auf eine potenzielle Anwendung *in vivo* hin zu charakterisieren. Es wurde gezeigt, dass die TetFC ein Temperaturmaximum von 30 °C aufweist, was für eine Anwendung *in vivo* beachtet werden muss. Die negative Temperaturabhängigkeit der TetFC ist wahrscheinlich dadurch bestimmt, dass der Komplexbildung mehrere Gleichgewichte vorgeschaltet sind. Da jedes dieser Gleichgewichte temperaturabhängige Dissoziationskonstanten aufweist, führt dies zu weniger gebildeten Komplexen bei höheren Temperaturen. Diese Einschränkung spricht aber nicht gegen eine Anwendung in Zellen, wenn diese auch bei niedrigen Temperaturen kultiviert werden können. So wurden bereits von Schmidt *et al.* Zellen erfolgreich bei 30 °C inkubiert, um RNA mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementierung zu detektieren.<sup>202</sup>

Der 75-fache Signalanstieg der TetFC nach Target-Bindung liegt im Vergleich mit anderen *in vitro* Methoden in einer ähnlichen Größenordnung. So wurde für die *molecular beacons in vitro* nach Hybridisierung ein 25-fach erhöhtes Signal bestimmt,<sup>110</sup> für die Rekonstitution einer Luciferase in Abhängigkeit von der Bindung zweier Pumilio-Proteine ein ca. 13-facher Anstieg nach Bindung an 10 nM Target-RNA.<sup>208,211</sup>

Des Weiteren wurde der Einfluss von kompetierender RNA auf die TetFC untersucht. Es wurde gezeigt, dass durch die Anwesenheit von 10 µg bakterieller Total-RNA das Detektionslimit der TetFC von 16 nM nicht erhöht wurde. Für 62,5 nM Target-RNA konnte in Anwesenheit der Total-RNA nach 18 h ein 17-facher Signalanstieg im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden. Das entspricht Messungen für 63 nM ohne Zugabe von Total-RNA, bei denen nach 14 h ein ca. 12-facher Signalanstieg gemessen wurde.<sup>317</sup> Besonders hervorzuheben ist, dass die *in vitro* hergestellte Target-RNA ebenfalls in Anwesenheit von bakteriellem Zellysate mit einer dreifachen Signaldifferenz zur Negativkontrolle nachgewiesen werden konnte.<sup>216</sup>

Allerdings war es in dieser Arbeit nicht möglich, *in vivo* produzierte Target-RNA nach Isolierung der Total-RNA nachzuweisen. Die ca. 120 nt lange Target-RNA konnte zwar mittels Northern-Blot nachgewiesen und auf eine Konzentration von ca. 1 µM in 10 µg Total-RNA geschätzt

werden, was entsprechend der Vorversuche für eine Detektion der RNA ausreichend sein sollte. Dennoch konnte diese RNA nicht erfolgreich mittels TetFC detektiert werden. Möglicherweise lag die, *in vivo* hergestellte, RNA trotz Phenol-Chloroform-Extraktion in Proteinkomplexen vor, welche die Interaktion mit Pumilio verhindern. Möglicherweise war die effektive Konzentration der Target-RNA im Verhältnis zur Total-RNA zu gering, um detektiert zu werden. Sowohl die Interaktion mit anderen Faktoren, als auch die Konzentration könnte eine Detektion *in vivo* erschweren und muss beachtet werden. Es wäre ebenfalls möglich, dass die Temperatur einen negativen Effekt ausübte, weshalb das Experiment bei niedrigeren Temperaturen wiederholt werden sollte.

Da durch die Total-RNA Isolierung die gesamte bakterielle RNA konzentriert wird und dadurch die natürlichen Verhältnisse verändert werden, ist es durchaus möglich, dass dies keine Aussage über eine mögliche Detektion *in vivo* erlaubt. Des Weiteren kann anhand der Inkubation mit bakteriellem Zellysat keine Aussage über eine mögliche Anwendbarkeit in eukaryotischen Zellen getroffen werden, da diese über andere RNA-Interaktionspartner sowie Abbaumechanismen verfügen.

Es wäre eventuell von Vorteil, die RNA-Detektion in eukaryotischen Zellen zu versuchen, da hier die Target-RNA von einem Teil der Kompetitor-RNA und bindenden Proteinen durch die Zellkompartimente getrennt wird. Um trotz einer geringen Konzentration an Target-RNA und somit rekonstituierten GFPs, RNA in Zellen detektieren zu können, wäre es möglich, wie von Yamada *et al.* beschrieben, die RNA mittels TIRF-Mikroskopie nachzuweisen.<sup>203</sup> Bei der TIRF-Mikroskopie wird nur ein bestimmter Bereich der Zelle betrachtet, wodurch es möglich wird fluoreszierende Komplexe geringer Konzentration nachzuweisen, da das Hintergrundsignal reduziert wird. Des Weiteren könnte diese Mikroskopie-Methode es erlauben Einzelmolekülsensitivität zu erlangen.

Um eine höhere RNA-Konzentration zu erreichen, könnte es ebenfalls hilfreich sein, die RNA-Stabilität und somit Halbwertszeit zu erhöhen. Dies könnte durch die Integration in ein tRNA-Gerüst erfolgen, welches den Abbau der RNA erschwert und als Faltungsgestütz fungiert, wie es zum Beispiel für das *spinach2*-Aptamer oder *molecular beacons* beschrieben wurde.<sup>136,144</sup> Die Erstellung einer solchen RNA würde zwar für die Etablierung des Systems *in vivo* von Vorteil sein, aber von dem eigentlichen Ziel der Methode, endogene RNA zu detektieren, ablenken.

Um die TetFC *in vivo* anwenden zu können, ist es unbedingt nötig, das Level der RNA sowie der benötigten Proteine kontrollieren zu können. So sollten beide Pumilio-Proteine in ähnlichen Mengen in der Zelle vorliegen und zum Zeitpunkt der RNA-Synthese gefaltet vorhanden sein. Auch das GFP1-9 muss zum Zeitpunkt der RNA-Synthese in ausreichenden Mengen und vorgefaltet vorliegen, um eine direkte Detektion der Target-RNA zu ermöglichen. Dazu wäre es hilfreich Plasmide zu verwenden, welche es erlauben, die Produktion aller Komponenten getrennt zu kontrollieren. So konnten zum Beispiel Zimyanin *et al.* die Produktion der *oskar*

mRNA erst in Echtzeit verfolgen, indem sie die Synthese der RNA getrennt induzierten.<sup>374</sup> Eine weitere Studie, welche die potenzielle *in vivo* Anwendung der TetFC unterstützt, wurde von Cabantous *et al.* veröffentlicht. Es gelang ihnen, das GFP1-9 sowie zwei Proteine, welche mit dem S10- bzw. S11-Tag versehen waren, sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen zu produzieren und für die Fluoreszenzkomplementierung einzusetzen.<sup>217</sup>

Neben der Produktion aller Komponenten innerhalb der Zellen, sollte für *in vivo* Anwendungen noch eine weitere Voraussetzung erfüllt werden. Das *in vitro* etablierte System würde es *in vivo* zwar erlauben, die RNA zu detektieren, allerdings würde es nicht ermöglichen Änderungen in der Genexpression zu verfolgen, welche schnell verlaufen oder wieder ausgeschaltet werden. Dies resultiert aus der Tatsache, dass rekonstituiertes GFP nach Abbau der RNA nicht wieder zerfällt,<sup>213,317</sup> wodurch eine negative Regulation der Transkription nicht verfolgt werden könnte. Um neu gebildete Komplexe von bereits bestehenden zu unterscheiden, würde es sich anbieten FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) zu verwenden, wie bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben.<sup>4,36,156,160,165,169,180-182,184,185,375</sup> Um auch eine negative Regulierung der RNA verfolgen zu können, wäre es eventuell hilfreich, das System so zu destabilisieren, dass das komplementierte Protein nach Dissoziation oder Abbau der RNA wieder zerfällt, vorausgesetzt eine Komplementierung würde durch solch eine Destabilisierung nicht verhindert. Die Destabilisierung des Komplexes könnte durch gerichtete Mutagenese des dreiteiligen *split*-GFPs erfolgen. Um diese Arbeiten hinsichtlich der Dissoziation des Komplexes zu beginnen, ist es aber zunächst notwendig die Kinetik des Systems besser zu verstehen. Diese werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

#### 4.2.2. Kinetik des TetFC-Systems

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Komplementierung des GFP1-9 mit dem Fusionsprotein Pum-wt-S10-S11 weitaus schneller verläuft als die Zusammenlagerung des kompletten TetFC Komplexes (ca. 120 AU/min im Durchschnitt im Vergleich zu maximal ca. 42 AU/min innerhalb der ersten Stunde bei gleicher Proteinkonzentration).

Diese Beobachtung konnte auch von Cabantous *et al.* bestätigt werden. Sie konnten einen schnelleren Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachten, wenn die beiden  $\beta$ -Faltblätter S10 und S11 in einer Haarnadelschleifendomäne vorlagen, im Vergleich zu einem flexibleren „Sandwich“ Konstrukt, in welchem beide  $\beta$ -Faltblätter nur durch eine Proteindomäne verbunden waren. Das Erreichen des maximalen Signals unter Verwendung des Proteins GFP1-9OPT erfolgte in diesem Fall nach ca. 4 h bzw. 2 h.<sup>217</sup> Cabantous *et al.* zeigten ebenfalls, dass das maximale Fluoreszenzsignal nach Rapamycin-induzierter Interaktion der Proteine FRB und FKBP12 auch nach 5 h noch nicht erreicht war, eine Unterscheidung des Fluoreszenzsignals vom Hintergrund aber schon nach 2-5 min erfolgen konnte. Auch die Assoziation von Proteinkomplexen in *E. coli* trat erst nach 4 h auf. Dies spricht dafür, dass die Interaktion der

beiden Proteine der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war und die Positionierung der beiden  $\beta$ -Faltblätter S10 und S11 einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Fluoreszenzausbildung hatte. Mit der Annahme, dass sich bei der TetFC ein Gleichgewicht zwischen beiden Pumilio und der RNA eingestellt hatte, bevor das GFP1-9 zugegeben wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Zusammenlagerung der drei Proteinteile der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war.

Trotz dieser Zusammenhänge besteht durchaus die Möglichkeit, dass die Ausbildung der Fluoreszenz des GFPs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Der Chromophor innerhalb des GFPs besteht aus den drei Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67, welche in einer  $\alpha$ -Helix liegen, die durch das Zentrum des  $\beta$ -Fasses verläuft.<sup>376</sup> Reid *et al.* zeigten, dass die Fluoreszenzausbildung von GFP, welches aus Einschlusskörperchen isoliert wurde, durch die Chromophorausbildung und nicht die Proteinfaltung bestimmt wird. Sie konnten zeigen, dass die *de novo* Faltung des Proteins aus Einschlusskörperchen in drei kinetischen Schritten verläuft, wobei die Oxidation des vorgebildeten reduzierten Chromophors der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.<sup>376</sup> Um die Fluoreszenzausbildung der TetFC zu beschleunigen, wäre es daher eventuell hilfreich, zu untersuchen, ob der Chromophor im GFP1-9 vorgebildet vorliegt und ob die Ausbildung durch äußere Einflüsse, wie die Vorinkubation bei bestimmten Temperaturen, beeinflusst werden kann.

Um herauszufinden, ob die Ausbildung der Fluoreszenz oder die Komplexbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wäre es ebenfalls möglich photoaktivierbare (PA) GFPs zu verwenden. Diese erlauben es, die Fluoreszenz räumlich und zeitlich zu kontrollieren.<sup>184</sup> So wäre es möglich, die Fluoreszenz erst zeitlich nach der Komplexbildung anzuregen, um zu überprüfen, ob sie dann schneller ansteigt. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass die Ausbildung des Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Außerdem wäre es möglich im Mikroskop einzelne Moleküle anzuregen und die Ausbildung des Fluoreszenzsignals zu verfolgen. Da in unserem System aber eine spezielle GFP Variante verwendet wurde, welche sich von den verfügbaren PA-GFPs unterscheidet, wäre der Informationsgewinn begrenzt.

Zur Untersuchung der Interaktion des GFP1-9 mit dem Pum-RNA-Komplex, wäre es denkbar die beiden Pumilio-Proteine nach RNA-Bindung mit der RNA zu vernetzen und dann Interaktionsstudien mit GFP1-9 durchzuführen. Das Crosslinking von Proteinen mit RNA durch UV-Licht ist eine etablierte Methode,<sup>377</sup> welche in der Regel *in vivo* angewandt wird, um im Anschluss die RNA-Segmente zu isolieren und mittels cDNA Sequenzierung zu identifizieren (CLIP, *cross-linking and immunprecipitation*).<sup>378</sup> Zur Untersuchung der Interaktion dieses vernetzten Pumilio-RNA-Komplexes mit GFP1-9 würden sich Oberflächenplasmonresonanzstudien (SPR, *surface plasmon resonance*) oder konzentrationsabhängige Fluoreszenzmessungen anbieten. Anhand dieser Bindungsstudien

wäre es möglich, die Interaktion des GFP1-9 mit den beiden Pumilio-Proteinen von der Interaktion der Pumilios mit der RNA zu trennen und zu unterscheiden.

Zum Verständnis der Kinetik dieses Systems wäre es auch hilfreich zu wissen, wann und wie lange der rekonstituierte Proteinkomplex an der RNA gebunden vorliegt. Dies könnte mittels FRET-Analysen untersucht werden, indem die RNA in der Nähe der Pumilio-Bindestellen mit einem Fluorophor markiert wird, welcher mit dem GFP ein FRET-Paar ausbildet. Wäre dieses Fluorophor zum Beispiel Alexa546, ein GFP-Akzeptor,<sup>379</sup> wäre vor der Komplementierung kein Signal messbar sein, nach der Bindung der Pumilios und Rekonstituierung des GFPs, könnte aber durch die strahlungsfreie Anregung die Emission des Fluorophors detektiert werden. Nach Dissoziation des GFP-Komplexes dürfte nach Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge sowohl das Signal des GFPs als auch des Akzeptors messbar sein. Ähnliche Experimente zur Untersuchung von RNA-Strukturveränderungen wurden mittels *single molecule* (sm) FRET durchgeführt.<sup>380-382</sup> Es wäre ebenfalls denkbar, die beiden  $\beta$ -Faltblätter S10 und S11 mit Fluorophoren zu versehen, welche ein FRET-Paar ausbilden, um die Orientierung der  $\beta$ -Faltblätter zueinander zu untersuchen.

Mit Hilfe von SPR-Studien wäre es theoretisch möglich, zu bestimmen, wie schnell sich der Komplex an die RNA anlagert und die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziations- und Assoziation zu messen. Durch Immobilisierung der RNA auf einem Trägermaterial (Chip), könnte durch Änderung der SPR betrachtet werden, wann sich der vorgebildete Komplex an die RNA anlagert und wann er wieder dissoziiert.

Eine weitere Möglichkeit, die Kinetik der Fluoreszenzausbildung zu verfolgen, wäre der Einsatz sogenannter *fluorescent timers*, welche die Wellenlänge des emittierten Signals über die Zeit verändern. Es wurden bereits mehrere fluoreszierende Proteine, darunter auch *superfolder*-GFP (ähnelt dem hier verwendeten GFP1-9), zu *fluorescent timers* umprogrammiert.<sup>383,384</sup>

Die Verwendung dieser *timers* würde es erlauben, neu gebildete von „älteren“ fluoreszierenden Komplexen zu unterscheiden. Dies würde es ermöglichen, zu untersuchen, ob der verzögerte Anstieg des Fluoreszenzsignals durch die verspätete Fluoreszenzausbildung der Mehrheit der Komplexe entsteht oder durch die verzögerte bzw. erschwerte Bindung an die RNA.

Eine Idee zur Beschleunigung der Komplementierung, wäre die Stabilisierung der Interaktion von S10 und S11 durch das Anfügen interagierender Gruppen. Dazu könnten Gruppen wie His-Tag und Tris-NTA<sup>385</sup> verwendet werden oder innerhalb des Proteins Aminosäuren ausgetauscht werden, wodurch Wechselwirkungen, wie z.B. Disulfidbrücken begünstigt werden. Solche Veränderungen würden evtl. die Zusammenlagerung beschleunigen, könnten aber auch das unspezifische Hintergrundsignal erhöhen, und müssten deshalb genauestens untersucht werden.

### 4.2.3. Anwendung der TetFC zur RNA-Strukturanalyse

RNA-Strukturveränderungen spielen in der Regulation der Genexpression von Prokaryoten und Eukaryoten eine große Rolle. Kürzlich wurde von Reining *et al.* anhand des Adenin-Riboswitches gezeigt, dass die Strukturveränderungen dieses metabolitinduzierten Regulators nicht nur zwei, wie bisher angenommen, sondern drei Konformationen annimmt, welche einen großen Temperaturbereich tolerieren.<sup>386</sup> Es wurde zum ersten Mal die Verknüpfung von temperatur- und metabolitinduzierter Regulation der Translation durch einen Riboswitch beschrieben. Diese Studie zeigt, dass die strukturellen Untersuchungen von RNAs von großer Bedeutung sind und es erlauben, Einblicke in die Regulation der Genexpression auf molekularer Ebene zu erlangen.

Ein weiteres Beispiel, welches die Relevanz von RNA-Strukturanalysen hervorhebt, ist die konformationelle Veränderung des *rev response elements* der HIV-2 RNA. Es wurde gezeigt, dass dieser RNA-Bereich, welcher aus mehreren Stamm-Schleife-Strukturen besteht, zwei konformationelle Veränderungen durchläuft, bevor die energetisch günstigste Form gebildet wird.<sup>387</sup> Ein besseres Verständnis der RNA-Struktur, sowie deren Interaktion mit dem Rev-Protein und Wirtsfaktoren könnte die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente begünstigen, welche *cis*-agierende RNA regulatorische Elemente ansteuern.

Weitere wichtige Beispiele für RNA-Sekundärstrukturelemente, die bei der Regulation der Genexpression eine große Rolle spielen, sind Pseudoknoten, welche in der Virusreplikation involviert sind,<sup>388</sup> die Stamm-Schleife-Strukturen an Exon-Intron-Verbindungen, die das alternative Spleißen beeinflussen können,<sup>389</sup> sowie G-Quadruplexe, deren Existenz kürzlich erstmals in lebenden Zellen nachgewiesen wurde.<sup>390</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels TetFC die Ausbildung einer Stamm-Schleife-Struktur mit 5-fachem Signalanstieg im Vergleich zu einer RNA mit gleicher Linkerlänge verfolgt werden. Im Vergleich zur *boxAC* wurde sogar ein 42-facher Signalunterschied gemessen. Durch den Austausch des 5 nt Linkers zwischen den beiden Pumilio-Bindemotiven der *boxAB* RNA durch eine doppelsträngige RNA-Region konnte ein vergleichbares Fluoreszenzsignal nach Ausbildung der Struktur generiert werden. Dies spricht zum einen dafür, dass TetFC zum Nachweis von strukturellen Veränderungen nützlich sein könnte, lässt zum anderen aber auch Schlussfolgerungen über den Einfluss der RNA-Konformation auf die FC zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Linkerlängen mit mehr als 21 Nukleotiden ein 25-33 %iges Hintergrundsignal, im Vergleich zu RNAs mit einem 5 nt Linker, auslösen. Auch in früheren Studien wurde gezeigt, dass sogar eine Linkerlänge von 7 nt, welche nur 2 nt von der optimalen Länge abweicht, schon ein 31 %iges Signal auslöst. Es wird vermutet, dass diese Linker eine Faltung oder Verdrehung der RNA bedingen, welche dazu führen, dass beide Pumilio-Proteine in der richtigen Distanz und Orientierung zu einander positioniert werden, um die TetFC auszulösen.

Um dieses Phänomen erklären und das Problem umgehen zu können, wäre es hilfreich den Einfluss der Verdrehung der RNA in dem Bereich zwischen beiden Bindemotiven auf die Komplementierung zu untersuchen und mit der traditionellen TriFC, welche auf einem zweigeteilten *split*-GFP beruht, zu vergleichen. Dabei soll das Fluoreszenzsignal in Relation zur Linkerlänge und die damit einhergehenden Distanz bzw. Verdrehung weiter untersucht werden.

Um einen Nachweis von RNA-Thermometern mittels TetFC zu ermöglichen, sollten in dieser Arbeit temperaturinduzierte Strukturunterschiede der Target-RNA mittels TetFC untersucht werden. Entgegen den Erwartungen konnten keine Unterschiede der entworfenen RNA-Thermometer bei 10 oder 30 °C gemessen werden. Dies wurde möglicherweise durch die Einschränkungen der TetFC bei Temperaturen ab 30 °C bedingt. Es besteht aber ebenfalls die Möglichkeit, dass durch Interaktion mit Pumilio der doppelsträngige Bereich der RNA geöffnet wurde. Es wird vermutet, dass Pumilio doppelsträngige mRNA öffnen und somit strukturelle Veränderungen bedingen kann, welche unter anderem eine Regulation durch miRNAs erlauben.<sup>273</sup> Sollte dies auch hier der Fall sein, wäre ein erhöhtes Signal für die Probe bei 10 °C zu erwarten gewesen. Da dieses aber nicht gemessen wurde, sprechen die Ergebnisse dafür, dass die RNA – wie erwartet – bei 10 °C geschlossen und bei 30 °C aufgeschmolzen vorlag, die TetFC aber aufgrund der hohen Temperatur zu sehr eingeschränkt war, um detektiert zu werden. Die Beobachtung, dass TetFC nur in einem Temperaturbereich bis 30 °C erfolgt, spricht dafür, dass sie nicht die ideale Methode darstellt, um temperaturinduzierte Strukturveränderungen zu detektieren.

Aus diesem Grund sollten metabolitinduzierte Strukturveränderungen, wie sie in Riboswitches zu finden sind, untersucht werden. In dieser Arbeit konnte mittels TetFC aber ebenfalls kein struktureller Unterschied der Designer-Riboswitches in An- oder Abwesenheit der Metaboliten festgestellt werden. Da für die jeweiligen RNAs eine Hintergrundfluoreszenz passend zu der Linkerlänge detektiert wurde, spricht dieses für eine nicht erfolgreiche Einbindung der natürlichen Aptamerdomänen in die Designer-Riboswitches. Es war anscheinend nicht möglich, die Struktur der Aptamerdomäne aufrecht zu erhalten, wie es bei Paige *et al.* der Fall war.<sup>334</sup> Die Designer-Riboswitches in der Studie von Paige *et al.* wurden aber in ein tRNA-Gerüst eingefügt, welches möglicherweise die Ausbildung der Aptamerregion stabilisierte.<sup>334</sup> Ein Footprinting der RNAs mit dem Metabolit könnte weiteren Aufschluss darüber geben, ob die Designer-Riboswitches in der Lage sind, die Metabolite zu binden.

Obwohl kein Unterschied des Fluoreszenzsignals der TetFC nach Zugabe der Metaboliten detektiert werden konnte, wurde für die *boxA-SR2-B* RNA ein Fluoreszenzsignal in der gleichen Stärke wie für die *boxAB* RNA gemessen. Da der Linkerbereich dieser RNA zu lang ist, um ein solches Signal auszulösen, spricht dies dafür, dass die Ausbildung einer Sekundärstruktur zur

TetFC führte. Dies wird ebenfalls dadurch bestätigt, dass die RNA boxA-SR1-B lediglich ein – der Linkerlänge entsprechendes – Hintergrundsignal auslöst, obwohl beide RNAs sich nur in zwei Nukleotiden voneinander unterscheiden. Es wäre sogar vorstellbar, dass die Ausbildung der Sekundärstruktur die TetFC begünstigt, da das Fluoreszenzsignal der boxA-SR2-B RNA das der boxAB RNA noch übersteigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es mit der TetFC möglich ist, verschiedene RNA-Strukturen voneinander zu unterscheiden, auch wenn diese nur in wenigen Nukleotiden voneinander abweichen. Ein Vergleich mit derzeit bestehenden Methoden stellt die Vor- und Nachteile der TetFC als Strukturanalyse-Methode dar. Derzeit bestehende Methoden zur RNA-Strukturanalyse stellen das chemische oder enzymatische *probing*, die NMR- bzw. Röntgenstrukturanalysen, CD-Spektroskopie, UV Schmelzkurven sowie smFRET dar.

Beim *probing* wird die zu untersuchende RNA mit einem Reagenz behandelt, welches die RNA modifiziert. Dieses Reagenz kann ein kleines organisches Molekül, ein Metallion oder ein Enzym sein und die Modifikation besteht entweder aus einer Spaltung der RNA oder der Ausbildung eines Adduktes. Die Detektion der Modifikation erfolgt in der Regel durch Primer-Verlängerung durch eine reverse Transkriptase gefolgt von einer Analyse der cDNA Fragmente, wie zum Beispiel bei der SHAPE (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*)-Methode.<sup>391-394</sup> Dabei gibt es verschiedene Arten der Modifizierung, die es erlauben unterschiedliche Informationen über die RNA zu erlangen.<sup>395</sup> In Abhängigkeit der verwendeten Chemikalie können Informationen über Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelwechselwirkungen sowie die Zugänglichkeit des Rückgrats der Nukleinsäure gewonnen werden.<sup>396-402</sup> Das *in-line probing* liefert Informationen über die Flexibilität und Dynamiken einzelner Nukleotide und wird oft zur Untersuchung von RNA-Protein oder RNA-Ligand-Interaktionen, wie sie in Riboswitches auftreten, verwendet.<sup>403-405</sup> Diese Methoden haben im Vergleich zur TetFC den Nachteil, dass die Nukleinsäuren chemischen oder enzymatischen Veränderungen unterzogen werden und relativ anspruchsvolle und zeitaufwendige Analysen durchgeführt werden müssen. Das *in-line probing* benötigt beispielsweise einen Zeitrahmen von 40 h.<sup>405</sup> Außerdem können mit diesen Methoden zwar verschiedene Strukturen aber nicht deren Dynamiken verfolgt werden. So war es zum Beispiel Lusvardi *et al.* mittels SHAPE nur möglich, die verschiedenen Konformationen des *rev response elements* der HIV-2 RNA zu bestimmen, aber nicht dessen Umwandlung in Echtzeit zu verfolgen.<sup>387</sup>

Auch das Nukleinsäure-NMR dient zur Strukturanalyse, wobei hauptsächlich NOESY und COSY Spektren aufgenommen werden. Aus diesen können Aussagen über die Zuckerkonformation, gebogene Helices, nicht-Watson-Crick Basenpaarung und Stapelwechselwirkungen getroffen werden. Auch komplexere Strukturen, wie Stamm-Schleife-Strukturen und Pseudoknoten, oder

die Bindung an andere Moleküle können auf diese Weise untersucht werden.<sup>406</sup> Diese lokalen Strukturanalysen müssen aber mit anderen Strukturvorhersagen oder Modellen kombiniert werden, um Fehler auszuschließen und Gesamtstrukturen zu bestimmen. Außerdem ist die Auswertung der NMR-Spektren zeitaufwendig und benötigt eine gewisse Expertise, besonders zur Untersuchung komplexerer Sekundärstrukturen.

Weitere Methoden, welche keine Veränderung der RNA bedingen, sind die Untersuchung der Sekundärstruktur mittels UV- oder CD-Spektren sowie Röntgenstrukturanalysen. Anhand von UV-Absorptionsspektren lassen sich Aussagen über den Anteil doppelsträngiger Bereiche von Nukleinsäuren treffen, welche Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur zulassen.<sup>407</sup> Auch CD-Spektren liefern Informationen über Strukturelemente von Nukleinsäuren erlauben aber keine komplette Strukturvorhersage.<sup>408,409</sup> Die Röntgenstrukturanalyse ist zwar die klassische, hochauflösende Methode, um die Struktur von Nukleinsäuren darzustellen,<sup>410</sup> benötigt aber ausreichende Mengen des Moleküls, welche mit Schwermetallen kristallisiert werden müssen, um eine Kristallstruktur zu bestimmen und das Phasenproblem zu lösen.

Die zurzeit vielversprechendste Methode zur Analyse von RNA-Strukturen und -Dynamiken stellt die Anwendung von smFRET dar. Durch die Markierung der zu untersuchenden RNA mit zwei Fluorophoren lassen sich Strukturveränderungen im Bereich von bis zu 1-10 nm detektieren und Zwischenkonformationen nachweisen, die bei anderen Methoden verborgen bleiben würden. Des Weiteren können Dynamiken in Echtzeit und auf Einzelmolekülebene verfolgt werden.<sup>411</sup> So konnten beispielsweise Kobitski *et al.* sowie Keller *et al.* mittels smFRET die Faltung eines Ribozyms untersuchen und Karunatilaka *et al.* die strukturellen Veränderungen des humanen U2-U6 snRNA Komplexes verfolgen.<sup>380-382</sup> Trotz der hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung weist die Verwendung von smFRET aber auch einige Nachteile auf. Zum einen muss die zu untersuchende RNA mit den Fluorophoren modifiziert werden.<sup>411</sup> Zum anderen werden für die Analyse der smFRET ein spezielles TIRF-Mikroskop sowie eine gewisse Expertise zur Datenauswertung benötigt.<sup>411</sup>

Aus diesem Grund stellt TetFC eine hilfreiche Alternative dar. Die TetFC sollte es erlauben Strukturveränderungen der RNA mit Hilfe eines einfachen Plattenlesegeräts zu verfolgen, ohne das RNA-Molekül direkt modifizieren zu müssen. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu *probing*-Verfahren liegt darin, dass die TetFC theoretisch *in vivo* angewandt werden könnte. Auch die Modifizierung für das *chemical probing* wurde bereits *in vivo* durchgeführt, die Analyse der Struktur musste aber dennoch *in vitro* erfolgen.<sup>395</sup> Einen Nachteil im Vergleich zu smFRET stellt die Tatsache dar, dass nur eine ja/nein Aussage getroffen werden kann und mit dem jetzigen System keine Zwischenstrukturen gemessen werden könnten. Außerdem können mit der TetFC im Gegensatz zu smFRET keine schnellen Strukturveränderungen beobachtet werden.

Die besten Chancen zur Analyse von RNA-Strukturen und deren Dynamiken liegen sicherlich in der Kombination verschiedener Methoden. Ein Beispiel dafür lieferten Zhao *et al.*, welche zur Untersuchung von snRNA-Komplexen smFRET, NMR und *enzymatic probing* kombinierten.<sup>412</sup> So könnte zum Beispiel die TetFC mit smFRET kombiniert werden, um Strukturveränderungen in unterschiedlichen Bereichen eines Moleküls oder RNA-Protein-Komplexen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass erste Schritte in Richtung Strukturanalysen mittels TetFC getätigt wurden, auch wenn noch einige Herausforderungen zur Anwendung für die komplette Strukturaufklärung überwunden werden müssen.

### 4.3. Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung

Die RNP-FC wurde in dieser Arbeit zur *in vitro* Detektion von RNAs verwendet, welche nur ein oder kein Pumilio-Bindemotiv aufwiesen. Dabei konnte die Modell-RNA boxAC mit einem 3,9-fachen Signalanstieg und die boxLI RNA sogar mit einem 25-fachen Signalanstieg von der Negativkontrolle unterschieden werden. Es wurde gezeigt, dass eine Linkerlänge von 1 nt zwischen beiden Pumilio-Bindemotiven auf den zwei RNAs zu dem besten Signal führte und das maximale sequenzspezifische Signal nach ca. 10 h erreicht wurde.

Durch das Einführen zweier Staple-RNAs war es möglich, RNAs nachzuweisen, welche kein Pumilio-Motiv aufwiesen, indem beide Pumilio-Proteine über Staples an die Target-RNA dirigiert wurden. Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Staple-Paare konnten so die ungespleißte und gespleißte Form der Modell-HIV-RNAs mit einem 2-fachen Signalunterschied voneinander unterschieden werden. Das maximale Fluoreszenzsignal wurde dabei bereits nach ca. 5 h erreicht. Es wurde gezeigt, dass eine Stabilisierung der Staples auf der Target-RNA durch eine Hybridisierungsstelle aus drei Nukleotiden erreicht werden konnte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl die Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenzausbildung als auch die maximalen Fluoreszenzintensitäten die Target-RNA-Konzentration widerspiegeln.

#### 4.3.1. RNP-FC als Werkzeug zur RNA-Detektion *in vivo*

Um die RNP-FC *in vivo* anwenden zu können, müssten noch einige Fragen geklärt werden. Zum einen gelten natürlich die gleichen Voraussetzungen, bezüglich der Genexpression und Stabilität der einzelnen Komponenten, welche schon für die TetFC diskutiert wurden (4.2.1). Zum anderen muss bedacht werden, dass noch eine bzw. zwei Komponenten mehr in die Zelle eingebracht werden müssen. Die Staple-RNAs könnten dabei beispielsweise transfiziert werden, wie es bereits für eine Vielzahl von RNAs beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.2.1). Diese Methode wurde auch von Andou *et al.* verwendet, die anhand eines *split*-Aptamers die Fluoreszenzkomplementierung in Anwesenheit einer Target-RNA induzierten.<sup>199</sup> Da der Vorteil von genetisch kodierbaren Sonden, in unserem Fall der Pumilio-GFP-Fusionsproteine, aber darin liegt, dass die Zellen nicht dem Stress der Transfektion ausgesetzt werden müssen, wäre es

von Vorteil die Staples direkt in der Zelle zu produzieren. Die größte Herausforderung bei der RNA-Produktion in Zellen würde dabei die Stabilität der kurzen, einzelsträngigen RNAs sein. Diese könnte durch Einbau in eine tRNA-Struktur erhöht werden,<sup>136,144</sup> wobei fraglich wäre, ob die Staples dann noch für die RNP-Komplexbildung zugänglich wären. Des Weiteren wäre es möglich, Sequenzen an die RNA anzufügen, welche von stabilisierenden Proteinen gebunden werden, um den Abbau durch RNasen zu verhindern. Eine typische Klasse solcher Proteine sind die PPR (*pentatricopeptide repeat*)-Proteine, welche an *cis*-agierende Elemente in der RNA binden, und diese vor Exoribonukleasen schützen.<sup>413</sup> Es wäre ebenfalls denkbar an die Enden der RNAs Sequenzen anzufügen, welche Tripel-Helices ausbilden, welche die RNA vor dem Abbau schützen, wie es kürzlich für das 3'-Ende der MALAT1 lncRNA gezeigt wurde.<sup>414</sup> Auch das Anfügen von RNA-Sequenzen, die G-Quadruplexe ausbilden, wie sie in den Guanin-reichen telomeren Repeat-RNA-Sequenzen (TERRAs) zu finden sind, könnte die Stabilität der Staple-RNAs erhöhen.<sup>415</sup> Auch in diesem Fall müsste untersucht werden, ob eine Komplexbildung auf Basis der verlängerten Staples noch erfolgen kann.

Des Weiteren muss vor einer *in vivo*-Anwendung untersucht werden, ob die Hybridisierung der Staple-RNAs zu einem Abbau der Target-RNA durch die RNAi-Maschinerie (in Eukaryoten) oder durch RNasen führt. Dies könnte unter Anderem durch *in vitro* Dicer-Assays erfolgen.

Eine weitere offene Frage ist, ob es möglich wäre, alle benötigten Komponenten der RNP-FC zeitgleich in der Zelle zu produzieren. Die Herausforderung wäre dabei sicherlich die Auswahl geeigneter Vektoren, welche es erlauben drei Proteine und zwei RNAs zeitgleich zu produzieren. Erfolgversprechend sind dabei einige Studien, welche sich ebenfalls mit diesem Problem beschäftigt haben. So war es Ghoujal *et al.* möglich, drei Detektorproteine zeitgleich zu produzieren, um unter Verwendung eines Adapterproteins RNA-vermittelte Fluoreszenzkomplementierung auszulösen.<sup>212</sup> Cabantous *et al.* konnten unter Verwendung geeigneter Vektoren ebenfalls mehrere Proteine, darunter das GFP1-9 sowie zwei weitere rekombinante Proteine, zeitgleich in Bakterien und Säugerzellen produzieren.<sup>217</sup>

Ungeachtet der Bereitstellung der Komponenten für die RNP-FC in der Zelle wird die Signalstärke ein weiteres Problem darstellen. Im *in vitro*-Vergleich konnte mittels TetFC ein 75-fach erhöhtes Signal gemessen werden, mit der RNP-FC und einem Staple ein 25-fach erhöhtes und mit zwei Staples sogar nur ein 2-fach erhöhtes Signal. Diese Reduzierung der Signalstärke mit Zunahme der Komponenten stellt die größte Herausforderung für die RNP-FC zur *in vivo* Detektion dar. Das reduzierte Signal bei der RNP-FC wird sicherlich durch die Einführung weiterer Komponenten bedingt. Die erhaltenen Ergebnisse deuten aber auch darauf hin, dass das Signal möglicherweise durch die Veränderung der Hybridisierungssequenz oder eine weitere Stabilisierung des Komplexes wieder erhöht werden könnte. Es wäre auch möglich, die Staple-RNAs so zu entwerfen, dass sie Haarnadelschleifen-Strukturen ausbilden, welche durch

Hybridisierung an die Target-RNA aufgeschmolzen werden, um so möglicherweise das Hintergrundsignal zu reduzieren.

Eine Verbesserung der TetFC durch die Einführung der Staple-RNAs stellt jedoch die Geschwindigkeit der Komplexbildung dar. Das maximale Signal wurde unter Verwendung von zwei Staple-RNA bereits nach 5 h erreicht, was darauf hindeutet, dass die diese Methode zur Untersuchung von Dynamiken oder Kinetiken von RNAs geeigneter sein könnte als die TetFC.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RNP-FC erfolgreich genutzt werden konnte, um RNA *in vitro* sequenzspezifisch zu detektieren, vor der *in vivo* Anwendung aber noch einigen Herausforderungen, wie der Signalstärke, gegenüber steht.

Unabhängig von dem Nutzen zur RNA-Detektion, war es möglich, einen vollprogrammierbaren Ansatz zum Design von RNP-Komplexen zu etablieren, welcher im nächsten Abschnitt diskutiert wird.

#### 4.3.2. RNP-FC zum Nachweis der Zusammenlagerung von RNP-Komplexen

RNP-Komplexe spielen eine große Rolle bei vielen fundamentalen molekularen Prozessen, zu denen unter anderem die Translation durch das Ribosom und das Spleißen in Eukaryoten gehören. Die RNA innerhalb der RNP-Komplexe kann sehr unterschiedliche Funktionen ausführen, welche von der Ausbildung eines Gerüsts über die Funktion eines *guides* bis hin zu der katalytischen Aktivität reichen können.

Beispiele für RNAs, welche durch ihre Sekundärstruktur ein Gerüst für den RNP-Komplex ausbilden sind die 7SL RNA in dem SRP (*signal recognition particle*) oder die verschiedenen RNAs innerhalb des Spleißosoms und des Ribosoms.<sup>323,324,416</sup> *Guide*-RNAs treten in snoRNPs, Telomerasekomplexen und der RNA-Interferenz-Maschinerie auf.<sup>417-422</sup> Neben diesen strukturellen Funktionen kann die RNA innerhalb des Komplexes auch katalytische Aktivität ausüben, wie es für die molekularen Maschinen des Spleißosoms und Ribosoms gezeigt wurde.<sup>323,423-425</sup>

Da diese komplex geordneten Strukturen die molekulare Basis wichtiger regulatorischer Schritte formen, gab es schon einige Versuche sie *in vitro* nachzuahmen. Diese Versuche umfassen die Rekonstituierung von *guide*-RNA vermitteltem RNA-Editing, RNA-Spleißen und RNP-abhängiger Virusreplikation.<sup>426-429</sup> Aber auch komplexe *in vitro* snoRNA-Biogenesesysteme oder Telomeraseaktivitätsassays wurden nachgestellt.<sup>430-432</sup> Die Relevanz und Bedeutung von RNP-Technologien wurde kürzlich durch das CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-vermittelte Genom-Engineering hervorgehoben.<sup>433-435</sup> Bei dieser Technologie wurde das bakterielle CRISPR-Cas-System genutzt, um mittels *guide*-RNAs die Spaltung der genomische DNA von Menschen und Mäusen durch Cas-Proteine zu steuern.<sup>433-435</sup>

In dieser Arbeit wurde ein programmierbarer Ansatz zur selbst-vermittelten Zusammenlagerung von heterogenen, RNA-gesteuerten RNP-Komplexen vorgestellt. Ribonukleinsäuren sowie das RNA-bindende Protein Pumilio erwiesen sich dafür als geeignete Bausteine, da sie Sequenzspezifität sowie hohe Affinität aufweisen. Es konnte für mehrere Beispiele gezeigt werden, dass die Funktionalität der RNP-Komplexe auf den passenden Stapel- sowie Target-RNAs beruhte. Neben der Generierung eines Fluoreszenzsignals könnten auch andere Funktionalitäten mit den RNP-Komplexen kombiniert werden. Diese Funktionalitäten könnten zum Beispiel *split*-RNasen sein,<sup>436,437</sup> welche es erlauben würden, RNA sequenzspezifisch zu schneiden, oder *split*-Enzyme, welche ein Selektionskriterium ausbilden können. Dazu gehören unter anderem die  $\beta$ -Lactamase oder die DHFR (Dihydrofolatreduktase), welche beide bereits als *split*-Proteine vorhanden sind.<sup>438-441</sup>

Durch die Kombination verschiedener einzelner Bausteine könnten Komplexe mit neuen Funktionen oder physikalische Eigenschaften geschaffen werden. Ein solcher Ansatz zum Design von RNP-Komplexen könnte nicht nur unser Verständnis über die Funktion dieser Biomoleküle in der Natur erweitern sondern auch für neue Anwendungen in der Bionanotechnologie von Nutzen sein.

#### 4.4. Pumilio-Screening

Die gängigste Methode zum Pumilio-Screening stellt das Hefe-drei-Hybrid-System dar. Ein Transkriptions-Reporter-System erlaubt hierbei Protein-RNA-Interaktionen *in vivo* nachzuweisen und zu charakterisieren. Dieses System verlangt aber die Bereitstellung genetisch veränderter Hefezellen, welche nicht jedem Labor zur Verfügung stehen. Des Weiteren findet die Interaktion der zu untersuchenden Komponenten zwar *in vivo* jedoch im Zellkern der Hefen statt und durch die Auto-Aktivierung kann es zu falsch positiven Signalen kommen (siehe Kapitel 1.3.3.) Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein alternatives Screening-System für Pumilio entwickelt werden, welches es erlaubt im Hochdurchsatzverfahren Pumilio-Varianten zu charakterisieren.

Mittels Fluoreszenzpolarisation sollte die Komplexbildung von fluoreszenzmarkiertem Nos mit Pumilio und der Target-RNA verfolgt und bindende Pumilio-Proteine bestimmt werden. Hierzu konnte zunächst erfolgreich eine Methode zur Reinigung sowie spezifischen Fluoreszenzmarkierung von Nos mittels FIAsh etabliert werden. Zur Detektion mit Hilfe des Plattenlesegeräts wurden ein optimales Verhältnis von 1:1 des Proteins und Farbstoffes, sowie eine minimale Proteinkonzentration von 5  $\mu$ M festgesetzt. Dabei konnte auch eine unspezifische Markierung des Proteins Pumilio mit FIAsh beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde bereits zuvor beobachtet und beruht auf einer unspezifischen Bindung des Farbstoffes an Cystein-reiche

Proteine.<sup>442</sup> In dieser Arbeit konnte die unspezifische Markierung von Pumilio aber größtenteils durch die Zugabe eines 10-fachen Überschusses an EDT bezogen auf FLaSH verhindert werden. Es wurde beobachtet, dass die FP sowie die Fluoreszenzintensität von fluoreszenzmarkiertem Nos reduziert wurden, wenn dieses mit Pum und RNA inkubiert wurde. Dieses Phänomen wurde in Abwesenheit von Pumilio nicht beobachtet, und deutete auf eine eventuelle Pumilio-vermittelte Bindung des Nos-Proteins an die RNA hin. Es wurde die Vermutung angestellt, dass die Bindung des FLaSH-markierten Nos an die RNA zum Quenching des Farbstoffes führte. Das Quenching von Farbstoffen durch Nukleinsäuren wurde bereits des Öfteren beobachtet und wird häufig durch Guanine vermittelt.<sup>443-447</sup>

Da anhand von FP-Messungen keine Aussage über eine Interaktion der drei Komponenten getroffen werden konnte, wurde anhand von Pulldown-Studien die RNA-Abhängigkeit der Nos-Pumilio-Interaktion untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass beide Proteine auch in Abwesenheit der RNA miteinander interagierten, was früheren Publikationen widerspricht,<sup>222</sup> den FP-basierten Assay aber redundant machte. Im Gespräch mit D. Bhandari (Izaurrealde Gruppe, MPI Tübingen) auf der RNA2013 Tagung wurden diese Beobachtungen bestätigt. Auch die Interaktion von Nos mit der Homologie-Domäne des humanen Pumilios ohne die Deletion der drei Aminosäuren GPH widerspricht den Ergebnissen von Sonoda *et al.*

Es stellt sich die Frage, weshalb die hier erhaltenen Ergebnisse von der Literatur abweichen. Sonoda *et al.* untersuchten die Interaktion der drei Moleküle ebenfalls mit Pulldown-Studien, wobei sie aber das GST-Pumilio-Protein immobilisierten und nicht – wie in der vorliegenden Arbeit – GST-Nos. Nach Reinigung des Proteins His<sub>6</sub>-Nos detektierten sie Proteolyseprodukte des Proteins mittels Western-Blot. Es lässt sich die Vermutung anstellen, dass das Nos Protein in dieser Studie evtl. nicht korrekt gefaltet oder degradiert vorlag und die Interaktion mit Pumilio abgeschwächt oder behindert war, so dass keine RNA-unabhängige Bindung detektiert wurde.

Da in beiden Studien für die Bindung ähnliche HEPES-Puffer verwendet wurden, scheint die Stringenz keine Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse darzustellen. Möglicherweise wurde aber durch die unterschiedlichen Tags das Bindungsverhalten des Nos beeinflusst. In dieser Arbeit wurde Nos für die Pulldown-Studien mit der Glutathion-S-Transferase fusioniert, welche die Löslichkeit des Proteins erhöhte. Da auch bekannt ist, dass der GST-Tag die Faltung des Proteins begünstigen kann,<sup>448</sup> könnte dies begründen, weshalb das GST-Nos eine verstärkte Bindungseigenschaft im Vergleich zum His<sub>6</sub>-Nos aufwies, welches von Sonoda *et al.* verwendet wurde.

Zur Etablierung eines neuen Screening-Ansatzes für Pumilio ist die angedachte Fluoreszenzpolarisations-Strategie basierend auf Nos demnach nicht realisierbar. Die Beobachtung, dass aber Pumilio ebenfalls mit FLaSH markiert werden konnte, und beobachtet

wurde, dass die Zugabe von RNA die FP des Pumilio erhöhte, lässt vermuten, dass eine FP-Strategie ohne Nos möglich wäre. Um eine unspezifische Markierung anderer zellulärer Proteine zu verhindern, wäre daher denkbar, das Pumilio Protein mit Hilfe des Autodisplays an der Oberfläche der *E. coli* Zellen zu präsentieren,<sup>449</sup> und nach Proteasespaltung und Fluoreszenzmarkierung für einen FP-basierten Bindungsassay einzusetzen. Dies würde eine Reinigung des Proteins umgehen und ein Hochdurchsatzverfahren ermöglichen.

Des Weiteren könnte eine Markierung von Pumilio mit dem TC-Tag eine spezifische Markierung mit FLAsH erlauben.<sup>351,352</sup> Durch die Verwendung von EDT zur Verhinderung unspezifischer Markierungen würde dies ein Screening in *E. coli* Zellysat mit *in vitro* hergestellter RNA ermöglichen, vorausgesetzt die RNA wäre lang bzw. stabil genug, um eine Bindung zu erlauben. Dieser Strategie wäre aber möglicherweise aufgrund der Größe des Pumilio Grenzen gesetzt. Das Verhältnis der Fluoreszenzpolarisation zum Molekulargewicht der Probe hängt von der Rotationsrelaxationszeit des Fluorophors ab, welche wiederum im Verhältnis zu dessen Lebensdauer steht.<sup>350</sup> Je höher die Lebensdauer, desto größere Gewichtsunterschiede können detektiert werden. Für Fluorescein, welches eine Lebensdauer von 4 ns aufweist, liegt das Limit bei ca. 40 kDa.<sup>450</sup> Das bedeutet, dass Veränderungen über 40 kDa nicht mehr detektiert werden können. Da mit Zunahme der Fluoreszenzlebensdauer die Polarisation sinkt, wird dadurch dieses Limit erhöht.<sup>350</sup> Für FLAsH, welches eine Lebensdauer von 4.88 ns aufweist,<sup>451</sup> wird erwartet, dass das Limit verschoben ist. So können für einige BODIPY Fluorophore, die eine Lebensdauer von 6 ns aufweisen, noch Veränderungen bis ca. 60 kDa detektiert werden (Invitrogen). Diese Daten in Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit sprechen dafür, dass es theoretisch möglich sein könnte, Veränderungen in der Fluoreszenzpolarisation von FLAsH-markierten Pumilio (ca. 41 kDa) nach Bindung an RNA zu detektieren. Es wird aber auch deutlich, dass die Verwendung größerer Fluoreszenzreporter, wie zum Beispiel des ca. 27 kDa großen GFPs, anstelle von FLAsH, ausgeschlossen ist.

Eine andere Methode, um die Bindung fluoreszenzmarkierter Proteine an RNA zu messen, stellt die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) dar, die anhand der Diffusionszeit Rückschlüsse auf eine Bindung zulässt.<sup>452</sup> Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie es auch erlaubt intrazelluläre Wechselwirkungen zu messen.<sup>453</sup> Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter RNA, könnte dieses Verfahren noch durch die Verwendung der Fluoreszenzkrosskorrelationsspektroskopie (FCCS) erweitert werden.<sup>454,455</sup> Auch die Verwendung eines zellfreien Translationssystems zur Produktion der Proteinkomponenten, wie es von Porter *et al.* verwendet wurde,<sup>211</sup> könnte Interaktionsstudien zur Identifizierung neuer Pumilio-Varianten erlauben. Dies würde die Proteinsynthese und damit das Screening zwar

beschleunigen, jedoch die Etablierung des zellfreien Systems sowie die Bereitstellung genügender Mengen an benötigten Proteinen bedingen.

Um ein Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln, wäre es aber sicherlich von Vorteil einen Screening-Ansatz in Zellen zu realisieren. Dafür würde sich die Methode der TetFC anbieten. Nach Produktion der Proteinkomponenten sowie der Pumilio-Varianten in *E. coli* Zellen und Bindung an die gewünschte Target-RNA, könnten die Zellen, welche fluoreszierende Komplexe beinhalten, mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) identifiziert und sortiert werden.<sup>456</sup> Dies würde ein Screening der Zellen erlauben. Da es mittels FACS möglich ist je nach Gerät pro Sekunde 10 000 – 100 000 Zellen zu charakterisieren und die Messung in Echtzeit zu verfolgen (Angaben BD Bioscience, San Jose, USA), wäre dies ein ideales Hochdurchsatzverfahren. Es ist dabei aber zu beachten, dass die Verhältnisse in *E. coli* nicht vergleichbar sind mit eukaryotische Zellen.

Unter Verwendung anderer *split*-Proteinen, wie der  $\beta$ -Lactamase, wäre es möglich, die RNA-abhängige Proteinkomplementierung in Bakterien unter Ausbildung eines Selektionsvorteils zu verwenden, um neue Pumilio-Varianten zu selektieren. Dabei wäre zu beachten, ob durch die vorhandenen RNA-Mengen genügend Moleküle des rekonstituierten Proteins gebildet werden können, um die gewünschte Enzymfunktion auszubilden. Bereits veröffentlichte Studien zur bimolekularen Komplementierung der Enzyme  $\beta$ -Lactamase oder DHFR, welche durch Protein-Interaktionen vermittelt wurden und die es ermöglichten ein Selektionsvorteil zu generieren, wären dabei von großem Nutzen.<sup>438-441</sup> Solch eine Methode würde es erlauben Zellen direkt anhand einer *life-death-selection* zu selektieren und dem Hefe-drei-Hybrid-System ähneln.

Ein weiterer *in vivo* Screening-Ansatz, der auf der Ausbildung eines Fluoreszenzsignals beruht, könnte durch die Verwendung des *spinach*-Aptamers realisiert werden. Dafür müsste eine RNA entworfen werden, welche die Aptamer-Sequenz trägt, die aber durch die Ausbildung eines intra- oder intermolekularen doppelsträngigen Bereichs an der Fluorophorbinding gehindert wird. Durch die Wahl geeigneter RNA-Sequenzen sollte dann die Bindung des Pumilio-Proteins eine Strukturveränderung der RNA vermitteln, welche eine Fluorophorbinding und Fluoreszenzausbildung zur Folge hat. Die Entwicklung solch einer RNA, welche einem Riboswitch ähnelt, müsste aber genauestens durchdacht werden. Dabei sollten vorherige Studien zu dem *spinach*-Aptamer und natürlicher Riboswitches, sowie der Bindungseigenschaften von Pumilio hinzugezogen werden. Besonders die vermutete Eigenschaft des Pumilios, doppelsträngige RNA-Bereiche aufzuwinden,<sup>273</sup> müsste zuvor in *in vitro* Studien auf die Sequenzabhängigkeit untersucht werden



## 5. Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Methoden der TetFC und RNP-FC wertvolle Werkzeuge zum RNA-Nachweis *in vitro* darstellen. Den nächsten Schritt zur sequenzspezifischen Detektion von RNA mittels TetFC und RNP-FC stellt die Etablierung *in vivo* dar.

Die Anwendung in Eukaryoten soll dabei hauptsächlich zum Nachweis subzellulär lokalisierter RNA dienen, aber auch erlauben die RNA-Transkription sowie deren Transport in Echtzeit verfolgen zu können. Des Weiteren soll die TetFC dazu dienen RNA-Strukturveränderungen *in vivo* zu verfolgen, um dadurch neue Erkenntnisse im Bereich der Genregulation gewinnen zu können. Um TetFC *in vivo* realisieren zu können, ist es notwendig, die einzelnen Komponenten in der Zelle zu produzieren und deren Stabilität sowie zeitgleiche Verfügbarkeit zu untersuchen. Dabei muss besonders die Signalstärke untersucht und mit der traditionellen TriFC verglichen werden. Der Nutzen üblicher Methoden zur Visualisierung von Fluoreszenzkomplementierung in lebenden Zellen mit Einzelmolekülsensitivität, wie FRAP oder TIRF-Mikroskopie soll dabei ebenfalls analysiert werden.

Durch das Einführen der Staple-RNAs *in vivo* soll es ermöglicht werden, mittels RNP-FC auch ohne Pumilio-Engineering jede beliebige RNA zu detektieren. Um das realisieren zu können, sind zusätzliche Expressions- und Stabilitätsstudien der Staple-RNAs *in vivo* erforderlich. Aber auch die Stabilität der Target-RNA nach Hybridisierung der Staples und Ausbildung eines doppelsträngigen Bereiches muss analysiert werden. Des Weiteren wäre es erforderlich zuvor den RNP-Komplex *in vitro* zu stabilisieren, um das Fluoreszenzsignal zu erhöhen. Dies könnte durch die Auswahl geeigneterer Target-RNAs und damit einhergehender Staple-RNAs erfolgen.

Um die subzelluläre Lokalisation verschiedener RNAs *in vivo* nachweisen zu können, wäre es von Vorteil, mittels TetFC unterschiedliche Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit der RNA zu generieren. Die simultane Detektion verschiedener RNAs soll durch das Einführen einer dreigeteilten *split*-YFP Variante ermöglicht werden. Dabei muss zuerst *in vitro* getestet werden, ob das Einbringen der Mutation T203Y in das  $\beta$ -Faltblatt S10 die Verschiebung des Emissionssignals von *split*-GFP in den gelben Bereich des sichtbaren Lichts bedingt. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass diese Mutation ausreichte, um im GFP eine Veränderung der Fluoreszenzwellenlänge hervorzurufen.<sup>457</sup> Sollte die Generierung eines *split*-YFP-Systems *in vitro* erfolgreich verlaufen, wäre es möglich zwei verschiedene RNAs unter Verwendung des gleichen GFP1-9 und Pum-Var1-S11 zu detektieren, indem lediglich zwei verschiedene S10-Pum Proteine eingesetzt werden.

Die Anwendung der TetFC in Prokaryoten soll hauptsächlich zur Etablierung einer *in vivo* Screening-Methode für neue Pumilio-Varianten mit veränderter Sequenzspezifität etabliert werden. Die TetFC in Bakterien ist die Screening-Methode der Wahl, da sie es erlaubt in einem Hochdurchsatzverfahren anhand der Fluoreszenz eine Vielzahl von Bakterien zu screenen und gleichzeitig zu selektieren. Des Weiteren werden zugleich die Bindungseigenschaften *in vivo* überprüft, auch wenn Aussagen über eine mögliche Anwendung in Eukaryoten mit Vorsicht getroffen werden müssen. Das Screening-System *in vivo* soll genutzt werden, um neue Pumilio-Varianten zu identifizieren. Da bereits ein Bindecode des Proteins basierend auf den direkt interagierenden Aminosäuren bekannt ist, kann hierbei besonders der Einfluss der Stapelwechselwirkungen weiter untersucht werden. Dabei wäre ein Ziel Varianten zu identifizieren, die gänzlich randomisierte Sequenzen binden, und nicht mehr auf das UGU Bindemotiv angewiesen sind, aber keinen Verlust der Affinität aufweisen. Um den beobachteten destabilisierenden Effekten der Aminosäuresubstitutionen entgegen zu wirken, wäre es auch ein Ziel, thermostabilere Pumilio-Varianten mittels dieses Verfahrens zu identifizieren.

Zur Untersuchung der Transkriptom-Diversität sollen in zukünftigen Experimenten auch Pumilio-Proteine mit Affinität für unnatürliche Basen, wie Inosin selektiert werden. Seit Kurzem ist bekannt, dass das Adenin>Inosin *editing* in vielen Transkripten auftritt und möglicherweise in der Entwicklung und Funktion des Gehirns involviert ist.<sup>458</sup> Studien liefern Hinweise darauf, dass diese Modifikationen auch eine Rolle bei der miRNA Funktion, der HIV-1 Expression und der Proliferation von Glioblastoma Zellen spielt.<sup>459-461</sup> Mit Hilfe Inosin-bindender Pumilios könnten modifizierte RNAs nachgewiesen oder in Abhängigkeit der Modifikation stabilisierende Faktoren an die RNA dirigiert werden. Da das *editing* in doppelsträngigen Regionen der RNA auftritt, ist zunächst noch die postulierte Fähigkeit des Pumilios, dsRNA-Bereiche aufzuwickeln,<sup>273</sup> zu untersuchen. Dies könnte anhand von *in vitro* Studien mit doppelsträngigen RNAs verschiedener Sequenzen und unterschiedlicher Pumilio-Varianten erfolgen.

Da das Pumilio-Protein erfolgreich für die RNA-abhängige Fluoreszenzkomplementierung eingesetzt wurde, kann es in nächsten Versuchen in Kombination mit anderen *split*-Proteinen angewendet werden. Dabei soll besonders die Etablierung eines sequenzspezifischen RNA-Degradationssystems mittels *split*-RNasen entwickelt werden.<sup>436,437</sup> Dies würde es erlauben, RNA in Abhängigkeit ihrer Sequenz abzubauen und einen wichtigen Schritt in Richtung Genregulation und Transkriptom-Engineering darstellen, sowie eine hilfreiche Strategie zum *gene silencing* in Prokaryoten bieten.

Eine weitere Strategie RNA-abhängige Effekte auszulösen, stellt die Verwendung von toxischen Proteinen dar, wie zum Beispiel dem Photosensitizer KillerRed, einem GFP-Homolog.<sup>462</sup> Dabei muss in ersten Versuchen zunächst untersucht werden, ob KillerRed analog zu GFP geteilt

werden und sich wieder zu einem funktionalen Protein zusammenlagern kann. Die Anwendung dieses Photosensitizers könnte es in zukünftigen Experimenten erlauben, kranke oder fehl regulierte Zellen in Abhängigkeit einer bestimmten RNA zu töten und ein bedeutendes Werkzeug in der Therapeutik darstellen.

Unabhängig von der Anwendung der TetFC *in vivo*, sollen einige *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden, um die Kinetik und das Potential der Methode zu analysieren. Dabei ist es besonders wichtig, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fluoreszenzentwicklung zu identifizieren und diesen zu beschleunigen. Zur Bestimmung der Kinetik sollen Untersuchungen zur Chromophor- sowie zur Komplexbildung durchgeführt werden. Dabei soll sowohl die Interaktion des GFP1-9 mit dem Komplex aus Pumilio und RNA sowie der RNA mit dem vorgebildeten Proteinkomplex analysiert werden. Anhand der Erkenntnisse aus diesen Kinetikstudien sollen dann Veränderungen des Systems vorgenommen werden, welche eine Ausbildung des Fluoreszenzsignals beschleunigen. Um es zu erlauben, RNA-Prozesse wie Synthese oder Abbau besser verfolgen zu können, soll der Proteinkomplex so verändert werden, dass er nach Dissoziation oder Abbau der RNA zerfällt. Diese Destabilisierung könnte durch Einführen von Mutationen innerhalb des GFPs erfolgen und anhand zuvor etablierter SPR- oder Fluoreszenz-basierter Interaktionsstudien mit der RNA identifiziert werden.

Weitere *in vitro* Studien, welche zur Charakterisierung de TetFC durchgeführt werden sollen, sind Untersuchungen zur Linkerlänge zwischen beiden Pumilio-Bindemotiven. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Linker mit mehr als 7 nt zu einem ca. 25-33 % Hintergrundsignal führt. Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Linkerlänge soll detailliert untersucht werden. Dabei müsste besonders der Einfluss der Linkerlänge auf die FC im Hinblick auf die Verdrehung der RNA analysiert werden. Für spätere *in vivo* Studien wäre es wichtig festzustellen, ob die TetFC dabei eine flexiblere Struktur als die TriFC ausbildet, und dadurch toleranter der Linkerlänge gegenüber ist.

Erste Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine mögliche Detektion von RNA-Sekundärstrukturen mittels TetFC hin. In nächsten Experimenten sollen die Studien zur Detektion ligandinduzierter Strukturveränderungen weiter verfolgt werden. Es wäre dabei möglich nicht nur metabolit- sondern auch protein-bindende Aptamere zu verwenden. Neben der Ausbildung von Riboswitches soll auch die Ausbildung anderer Sekundärstrukturelemente untersucht werden, wie zum Beispiel die Bildung von G-Quadruplexen, deren Vorkommen in RNAs kürzlich erstmals in lebenden Zellen nachgewiesen wurde und die vermutlich einen Einfluss auf die Translation ausüben.<sup>390</sup> Zum Verständnis der regulatorischen Funktionen von RNA Strukturveränderungen soll unter Verwendung der potentiell gelbfluoreszierenden T203Y-

GFP-Variante versucht werden ein System aus mehreren Detektoren zu etablieren, dass es erlaubt Zwischenstrukturen und mehrstufige Strukturveränderungen zu verfolgen, wie es mittels smFRET möglich ist.

In Hinblick auf die Relevanz von Strukturveränderungen in der Genregulation könnte das Pumilio bzw. die TetFC genutzt werden, um Strukturveränderungen nicht nur nachzuweisen, sondern diese gezielt zu begünstigen. Dafür muss in ersten Experimenten untersucht werden, ob die Proteinkomponenten durch Interaktion mit der RNA in der Lage sind, gezielt Strukturveränderung der RNA zu verstärken. In weiteren Experimenten könnten so Regulationselemente wie Riboswitches oder Pseudoknoten sowie Ribozymsspaltungen gesteuert werden.

Um eine weitere alternative Strategie zu der sequenzbasierten TetFC zu entwickeln, könnte in nächsten Experimenten ein Pumilio-Protein durch ein strukturbindendes Protein wie das MS2-CP ersetzt werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigten Wu *et al.*, dass durch die Kombination zweier strukturbinder Proteine das Hintergrundsignal der FC im Vergleich zur Verwendung nur einer Art von Protein erniedrigt wurde.<sup>201</sup>

In anderen Arbeiten konnte das Pumilio mit verschiedenen Effektorfunktionen gekoppelt werden, und so die Genexpression in Abhängigkeit der RNA-Sequenz reguliert werden. Darunter waren Faktoren, die das Spleißen oder die Translation regulieren, sowie RNasen, die einen Abbau der RNA vermitteln.<sup>300,305,309,315</sup>. In nächsten Experimenten soll Pumilio mit RNA-modifizierenden Enzymen, wie RNA-Methyltransferasen fusioniert werden, um RNAs in Abhängigkeit ihrer Sequenz zu modifizieren und im Anschluss isolieren oder markieren zu können. Auch ein Eingriff in die Genregulation durch Basen-Modifikationen mittels Pumilio-gesteuerter Enzyme ist eine mögliche Strategie, die verfolgt werden könnte.

Zusammenfassen lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit durch die Charakterisierung der TetFC und Etablierung der RNP-FC Grundlagen zur sequenzspezifischen RNA-Detektion in lebenden Zellen geschaffen wurden. In nächsten Experimenten steht nun die Etablierung dieser Methoden *in vivo* im Vordergrund, wobei zunächst der Nachweis von RNA-Strukturveränderungen und das Screening neuer Pumilio-Varianten die Hauptanwendungen darstellen sollen. In späteren Experimenten soll dann das Pumilio-Protein genutzt werden, um verschiedene Effektorfunktionen sequenzspezifisch an RNA zu dirigieren. Dies soll neue Wege zur sequenzspezifischen Steuerung der Genregulation sowie Transkriptom-Manipulation eröffnen.

## 6. Material

### 6.1. Geräte

**Tabelle 6.1:** Geräte.

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Kern ABJ	Kern, Balingen-Frommern, D
Autoklav Systec D-150	Systec, Wettenberg, D
ÄKTApurifier®	GE Healthcare, München, D
Brutschrank	Memmert, Schwabach, D
Elektrophoreseapparaturen:	
Agarosegele	PEQLAB, Erlangen, D
PAA-Gele (200 x 200 x 0,75 mm)	Bio-Rad, München, D
Semi-Dry-Blotter V20-SDB	Biostep, Jahnsdorf, D
Eppendorf Eporator	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Exposure Cassette</i>	Bio-Rad, München, D
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen, D
Hybridisierungssofen Compact Line OV4	Biometra, Göttingen, D
Imager VersaDoc™ MP 4000	Bio-Rad, München, D
<i>Imaging Screen K-HD, 20 x 25 cm</i>	Bio-Rad, München, D
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, D
<i>Mastercycler Gradient &amp; Personal</i>	Bio-Rad, München, D
Membranpumpe MZ 2C NT	Vacuubrand, Wertheim, D
Mikrowelle 900	Severin, Sundern, D
Molecular Imager FX	Bio-Rad, München, D
pH-Meter inolab	WTW, Weilheim, D
<i>Power Pac Basic 300 &amp; 1000</i>	Bio-Rad, München, D
Primus 25 advanced R Thermocycler	PEQLAB, Erlangen, D
Research® plus Pipetten (0,1 bis 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, D
Reinstwasseranlagen:	
<i>Milli-Q academic Q-Gard® 3</i>	Millipore, Billerica, USA
Scanner CanoScan LiDE 20	Canon, Krefeld, D
Schüttelinkubator	Infors, Bottmingen/Basel, CH
<i>Screen Eraser-K</i>	Bio-Rad, München, D
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	Bio-Rad, München, D

Tabelle wird fortgesetzt.

**Fortsetzung Tabelle 6.1**

<i>Sonifier® 250</i>	Branson, Danbury, USA
Thermomixer HLC	Digital Biomedical Imaging Systems, Pforzheim, D
TECAN Infinite® Pro M200	TECAN Group Ltd, Männedorf, CH
TECAN Infinite® Pro F200	TECAN Group Ltd, Männedorf, CH
TECAN Infinite® Pro NanoQuant	TECAN Group Ltd, Männedorf, CH
Tri-Carb 2500 TR <i>liquid scintillation counter</i>	Perkin Elmer, Rodgau, D
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
Zentrifugen 5424 R, 5415 R, 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D

**6.2. Verbrauchsmaterialien**

In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien wurden von Sarstedt (Nümbrecht, D) erworben. Verbrauchsmaterialien, die von anderen Herstellern bezogen wurden, sind in Tabelle 6.2 aufgeführt.

**Tabelle 6.2:** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Einwegspritzen (5-50 mL)	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, D
Einmalkanülen (0,9 x 40 mm)	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, D
Elektroporationsküvetten (1 mm)	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
MF-Millipore™ Membran Filter	Millipore, Billerica, USA
MoBiCol 1 mL Säule	MoBiTec, Göttingen, D
MoBiCol Filter 10 µm	MoBiTec, Göttingen, D
Nitrocellulosemembran	Roth, Karlsruhe, D
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Rotilabo®-Blottingpapier	Roth, Karlsruhe, D
Whatman® Gel-Blotting Papier	Whatman, Dassel, D
Zentrifugalfiltriereinheiten Amicon® Ultra-15	Millipore, Billerica, USA

**6.3. Chemikalien**

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (München, D) oder AppliChem (Darmstadt, D) bezogen. Die Chemikalie FLAsH-EDT<sub>2</sub> wurde von der Firma TRC (Toronto, CA) bezogen.

**6.4. Puffer, Medien und Lösungen**

Die verwendeten Puffer und Medien, welche für mikrobiologische Methoden eingesetzt wurden, wurden sterilfiltriert oder für 20 min bei 120 °C und 1,4 bar Dampfdruck autoklaviert.

**Tabelle 6.3:** Medien und Lösungen für mikrobiologische Methoden.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ampicillin-Stammlösung	100 g/L Ampicillin in 70 % (v/v) Ethanol
Kanamycin-Stammlösung	25 g/L Kanamycin in ddH <sub>2</sub> O
LB-Agar	25 g/L LB-Medium ; 15 g/L Agar
SOC-Medium	20 g/L Trypton ; 5 g/L Hefeextrakt ; 0,5 g/L NaCl ; 2,5 mM KCl ; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM Glucose ; pH 7,0
2xYT-Medium	8 g/L Trypton ; 5 g/L Hefeextrakt ; 2,5 g/L NaCl ; pH 7,0

In nachfolgender Tabelle sind Puffer und Lösungen dargestellt, welche für molekularbiologische Arbeiten verwendet wurden. Puffer oder Lösungen für die Anwendung mit RNA wurden mit Reinstwasser angesetzt.

**Tabelle 6.4:** Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ethidiumbromid-Färbelösung	4 µg/mL Ethidiumbromid in 1x TAE
DNA-Ladepuffer, 6x	Fermentas, St. Leon-Rot, D
RNA-Ladepuffer, 2x	95 % (v/v) Formamid; 0,025 % (w/v) SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 0,025 % (w/v) Xylen Cyanol FF; 0,5 mM EDTA
<i>Reaction Buffer B</i> , 10x	Solis BioDyne, Nivelles, B
TE-Puffer, 1x	10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA
TAE-Puffer, 50x	2 M Tris-HCl (pH 7,8); 0,25 M Natriumacetat; 5 mM EDTA
MOPS-Puffer	40 mM MOPS; 10 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,2
SSC, 20x	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat
Roti®-Hybri-Quick	Carl Roth, Karlsruhe, D
Transkriptionspuffer, 3x	120 mM Tris-HCl (pH 8,1); 15 mM DTT; 6 mM Spermidin; 0,03 % (v/v) Triton-X-100; 4,5 % (w/v) PEG 6000
Szintillation Lösung	Perkin Elmer, Rodgau, D

Puffer, welche für die Proteinreinigung verwendet wurden, wurden mit Reinstwasser angesetzt und durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

MATERIAL

**Tabelle 6.5:** Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	0,5 mg Lysozym /mL TE-Puffer; pH 8,0; 1 % SDS
Pumilio-Puffer:	
Pum-Puffer A	10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 µM PMSF
Pum-Puffer B	10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 300 mM Imidazol; 1 µM PMSF
Pum-Lagerungspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 mM DTT; 5 % Glycerol; 1 µM PMSF
Pum-Bindepuffer	10 mM HEPES (pH 7,4); 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,01 % Tween-20; 0,1 mg/mL BSA; 1 mM DTT
GST-Puffer B	10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 10 mM Glutathion (reduzierend); 1 µM PMSF
Nos-Puffer:	
Nos-Puffer A	50 mM HEPES (pH 7,5); 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT; 1 µM PMSF
Nos-Puffer B	50 mM HEPES; pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT, 300 mM Imidazol; 1 µM PMSF
Nos-CIEX-Puffer A	50 mM HEPES; pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT; 1 µM PMSF
Nos-CIEX-Puffer B	50 mM HEPES; pH 7,5; 1 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT; 1 µM PMSF
Nos-Bindepuffer	20 mM HEPES (pH 7,5); 100 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerol; 1 mM DTT; 1 µM PMSF
Denaturierungspuffer	9 M Urea; 5 mM DTT
Kathodenpuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,6); 100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
Anodenpuffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,9)
Probenpuffer, 3x	187,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 30 % (v/v) Glycerol, 6 % (v/v) SDS; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Coomasie-Entfärber	20 % (v/v) Essigsäure
Western-Blot Puffer:	
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Isopropanol
Blockier-Puffer	4 % (w/v) BSA in 1xPBS
PBS, 1x	140 mM NaCl; 2 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST, 1x	0,1 % (v/v) TWEEN® 20 in 1x PBS
Reaktionspuffer-AP	100 mM Tris (pH 9,5); 4 mM MgCl <sub>2</sub>
NBT-Stocklösung	50 mg/mL in 70 % (v/v) DMF
BCIP-Stocklösung	0,5 % (w/v) in 70 % (v/v) DMF

Tabelle wird fortgesetzt.

**Fortsetzung Tabelle 6.5**

Northern-Blot Puffer:

NB-Transferpuffer	10 mM NaOH; 3 M NaCl
SSC, 20x	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat
Methylenblau Lösung	0,02 % (v/v) Methylenblau in 0,3 M Essigsäure (pH 5.5)

**6.5. Enzyme und Proteine**

Alle Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, von Thermo Scientific (Schwerte, D) erworben. Die Enzyme wurden von den Herstellern mit den entsprechenden Reaktionspuffern geliefert. Proteine wurden von AppliChem (Darmstadt, D) oder New England Biolabs (Frankfurt a.M., D) erworben. In nachfolgender Tabelle sind Enzyme und Proteine angegeben, welche nicht von diesen Firmen erworben wurden.

**Tabelle 6.6:** Enzyme und Proteine.

Enzym/Protein	Hersteller
FIREPol® DNA Polymerase [5 U/μL]	Solis BioDyne, Nivelles, B
Pumilio-wt-S10-S11	S. Kellermann, Rentmeister Gruppe
T7-RNA-Polymerase	A. Rath, Rentmeister Gruppe
TEV-Protease (S129V)	nach Kapust <i>et al.</i> <sup>463</sup>

**6.6. Längenstandards**

Längenstandards zur Nukleinsäure-Gelelektrophorese wurden von Thermo Scientific (Schwerte, D) erworben. Für die SDS-PAGE wurde der *Precision Plus™ Protein Standard* von Bio-Rad (München, D) oder der *PageRuler Prestained Protein Ladder* von Thermo Scientific (Schwerte, D) verwendet.

**6.7. Kommerziell erworbene Kits und Säulen**

In nachfolgender Tabelle sind die Kits und Säulen aufgeführt, welche im Rahmen dieser Arbeit käuflich erworben wurden.

**Tabelle 6.7:** Kommerziell erworbene Kits und Säulen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Bio-Spin</i> <sup>®</sup> Säulen (P6 und P30)	Bio-Rad, München, D
<i>HiYield</i> <sup>®</sup> <i>Plasmid Mini Kit</i>	Süd-Laborbedarf, Gauting, D
HisTrap <sup>™</sup> FF 1 mL Säule	GE Healthcare, München, D
<i>NucleoSpin</i> <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
GSTrap <sup>™</sup> FF 1mL Säule	GE Healthcare, München, D
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München, D
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich, München, D

## 6.8. Nukleotide und Radionukleotide

In Tabelle 6.8 sind die verwendeten Nukleotide und Radionukleotide dargestellt.

**Tabelle 6.8:** Verwendete Nukleotide und Radionukleotide.

<b>Nukleotide</b>	<b>Hersteller</b>
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP [10 mCi/mL]	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Thermo Scientific, Schwerte, D
Ribonukleosidtriphosphate (NTP)	Thermo Scientific, Schwerte, D
2'-Fluoro-2'-dCTP	TriLink BioTechnologies, San Diego, USA
2'-Fluoro-2'-dUTP	TriLink BioTechnologies, San Diego, USA

## 6.9. Oligonukleotide

Synthetische Desoxyribooligonukleotide wurden bei Life Technologies (Darmstadt, D) erworben. Synthetische Ribooligonukleotide wurden bei Biomers (Ulm, D) erworben. eine Liste aller verwendeten synthetischen Oligonukleotide findet sich in nachfolgender Tabelle.

**Tabelle 6.9:** Liste aller verwendeten synthetische Oligonukleotide.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (in 5'→3'-Richtung)</b>
Klonierungen:	
Pum1-2_fwd	CAA GAC CAG CAT GGG <u>AAT</u> AGA TTC ATT CAG CTG
Pum1-2_rev	CAG CTG AAT GAA TCT <u>ATT</u> CCC ATG CTG GTC TTG
Pum2-1_fwd	TGG ATG TGT TTG GTA <u>GTT</u> ACG TCA TTG AGA AGT TCT TTG AAT
Pum2-1_rev	ATT CAA AGA ACT TCT <u>CAA</u> TGA CGT <u>AAC</u> TAC CAA ACA CAT CCA
Pumilio_NdeI_fwd	AGC TCA TAT GGG CCG CAG CCG CC
HsPumHD_XhoI_rev	AGC TCT CGA GCC CTA AGT CAA CAC CGT TCT TC
Pum_dGPH_fwd	CAT GAA CGA CAG TGC CTT ATA CAC CAT GAT GAA GG
Pum_dGPH_rev	ATA AGG CAC TGT CGT TCA TGG TGC ACA CCT C
L1_mut_fwd	GGC GCC TGG TTG TCT TCC CAA CAG ATG ACA TAA G
L1_mut_rev	CTT ATG TCA TCT GTT GGG AAG ACA ACC AGG CGC C
L1_mut_G_fwd	CAG GAG ACC TGG AGG GAA CAG ACC GTG AGC
L1_mut_G_rev	GCT CAC GGT CTG TTC CCT CCA GGT CTC CTG
Seq_pSK17_vor_Promoter	CGT CTA AGA AAC CAT TAT TAT CAT G
Hb-boxAB DNA	GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT AGC CCA TCA CCA TCA CCT TGT TAT TAT TAT TTA TCA CTA TTA TCA TAT AAT CCC AGA ATT GTA TAT ATT AAT TTG ATA TAT TCG TAG CAT AAG TTT TCC AAA CAT TAT TTT GTT GTC TCT AGA AGCT
Hb-boxAC DNA	GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT AGC CCA TCA CCA TCA CCT TGT TAT TAT TAT TTA TCA CTA TTA TCA TAT AAT CCC AGA ATT GTA TAT ATT AAT CCC ATA TAT TCG TAG CAT AAG TTT TCC AAA CAT TAT TTT GTT GTC TCT AGA AGC T
Northern-Blot-Sonden:	
boxAB DNA	CTA GCC CAG AAT TGT ATA TAT TAA TTT GAT ATA TTC GTC TAG
boxAC DNA	CTA GCC CAG AAT TGT ATA TAT TAA TCC CAT ATA TTC GTC TAG
Käufliche RNAs:	
boxA (NRE1-19)	GGC CAG AAU UGU AUA UAU UCG
boxL (L12s)	GGC CAG AAU UGU AUG GUU UCG
Staple A <sub>S</sub>	GGG AAU UGU AUA UAU UCG CGT GCU UUG AUA GAG AAG
Staple A <sub>U</sub>	GGG AAU UGU AUA UAU UCG CGC TGA AAC GAT AAT GGT G
Staple B	GGG AGG UGG GUC GCA UUU GAU AUA UUC G
Staple A	GGG AGG UGG GUC GCA UUG UAU AUA UUC G
Staple B <sub>S</sub>	GGG AAU UGU AUA UAU UCG CGT GCU UGU AUA GAG AAG
AS-DNA 1	CGC CCC GCA AGG GGC G
AS-DNA 2	CGC CCG GCA A

In Tabelle 6.10 findet sich eine Auflistung aller Ribonukleinsäuren, welche mittels *in vitro* Transkription hergestellt wurden.

**Tabelle 6.10:** Mittels *in vitro* Transkription hergestellte Ribonukleinsäuren.

Bezeichnung	Sequenz (in 5'→3'-Richtung)
TetFC:	
boxAB	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUA AUU UGA UAU AUU CG
boxAC	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUA AUC CCA UAU AUU CG
boxAstemb	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUC GCC CCU UGC GGG GCG UUU UUG AUA UAU UCG
boxAlinkerB	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUC GCC CCU UGC CCC CCG UUU UUG AUA UAU UCG
boxA-SR1-B	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUC GAA AGG ATG GCG GAA ACG CCA GAT GCC TTG TAA CCG AAA GGG UUU GAU AUA UUC G
boxA-SR2-B	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUG AAA GGA TGG CGG AAA CGC CAG ATG CCT TGT AAC CGA AAG GUU UGA UAU AUU CG
boxA-GR-B	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUG CAG AAG AGC ACG TAT ACG CAA GCU UUG AUA UAU UCG
24 °C-Thermom.	GGG UAU ACA AUU CAA AGA AUU GUA UAU AUU AAU UUG AUA UAU UCG
28 °C-Thermom.	GGG UAU AUA CAA UUC AAA GAA UUG UAU AUA UUA AUU UGA UAU AUU CG
RNP-FC:	
boxAC Linker 7	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UUC GAA UCC CAU AUA UUC G
boxAC Linker 1	GGG CCA GAA UUG UAU AUA UAU CCC AUA UAU UCG
Staple B <sub>c</sub>	GGG AAU AUA UGG GAU AUU UGA UAU AUU CG
Staple C <sub>c</sub>	GGG AAU AUA UGG GAU AUC CCA UAU AUU CG
Staple B <sub>x</sub>	GGG GUC AGA GAG GAC CUU UGA UAU AUU CG
boxLI	GGG AGC CAU UUG UAU GGU CCA GGA GAG ACU GCC CGC UA
boxLII	GGG AGC CAU UUG UAU GGU GGU CCU CUC UGA CGG GCG AU
Staple B <sub>i</sub>	GGG CAG UCU CUC CUG GUU UGA UAU AUU CG
Staple C <sub>i</sub>	GGG CAG UCU CUC CUG GUC CCA UAU AUU CG
boxL 25 nt	GGA GCC AUU UGU AUG GUC CAG GAG A
HIV ungespleißt	GGG AUA UUC ACC AUU AUC GUU UCA GAC CCA CCU CCC AAC CCC GAG GGG ACC
HIV gespleißt	GGG ACT CAT CAA GCU UCU CUA UCA AAG CAA CCC ACC UCC CAA CCC CGA GGG GAC C

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.10

Staple A <sub>S</sub> (2 bp)	GGG AAU UGU AUA UAU UCG GGU GCU UUG AUA GAG AAG
Staple A <sub>U</sub> (2 bp)	GGG AAU UGU AUA UAU UCG GGC UGA AAC GAU AAU GGU G
Staple A <sub>S</sub> (3 bp)	GGG AAU UGU AUA UAU UCG CGU GCU UUG AUA GAG AAG
Staple A <sub>U</sub> (3 bp)	GGG AAU UGU AUA UAU UCG CGC UGA AAC GAU AAU GGU G
Staple B	GGG AGG UGG UCG CAU UUG AUA UAU UCG
Pulldown:	
NRE+ (Sonoda)	AUU AUU UUG UUG UCG AAA AUU GUA CAU AAG CC

## 6.10. Antikörper

Die, in dieser Arbeit verwendeten, Antikörper sind in Tabelle 6.11 aufgeführt.

**Tabelle 6.11:** Antikörper.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Anti-Mouse</i> IgG AK, Antikörper gegen IgA ( $\alpha$ -Ketten-alkalische Phosphatase spezifisch), produziert in Ziege	Sigma-Aldrich, München, D
Penta-His AK Antikörper gegen den Tetra-His-Tag, produziert in Maus	5 PRIME, Hamburg, D
Anti-GFP-AK Antikörper gegen GFP, produziert in Maus	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

## 6.11. Bakterienstämme

Zur Proteinproduktion oder Klonierung wurden in dieser Arbeit verschiedene *E. coli* Stämme verwendet, welche in Tabelle 6.12 aufgeführt sind.

**Tabelle 6.12:** In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme.

<i>E. coli</i>	Genotyp	Hersteller
TOP10	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 DlacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe, D
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen, Darmstadt, D
BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3) pLysS(cm <sup>R</sup> )	Novagen, Darmstadt, D

## 6.12. Plasmide

Eine Liste der erhaltenen Plasmide, sowie deren Hersteller ist in Tabelle 6.13 aufgeführt.

**Tabelle 6.13:** Käuflich erworbene oder erhaltene Plasmide.

Bezeichnung	Hersteller/Anbieter
pCDNA3-L1	Schachner Gruppe, ZMNH, Hamburg, D
pTYB3-HsPumHD	C.-G. Cheong, Hall Gruppe, NIH, NC, USA <sup>294</sup>
pTYB3-MUT3-2	C.-G. Cheong, Hall Gruppe, NIH, NC, USA <sup>294</sup>
pTYB3-MUT6-2/7-2	C.-G. Cheong, Hall Gruppe, NIH, NC, USA <sup>294</sup>
pET22b+S10-x-HsPumHD	S. Kellermann, Rentmeister Gruppe <sup>317</sup>
pET16b+Pum6-2/7-2-x-S11	S. Kellermann, Rentmeister Gruppe <sup>317</sup>
pSK17	J. H. Urban, Vogel Gruppe, MPIIB, Berlin, D <sup>464</sup>
pRSET-B-Nos <sub>288-401</sub>	J. Sonoda, Wharton Gruppe, HHMI, NC, USA <sup>222</sup>
pET18b+GFP1-9	S. Cabantous, Waldo Gruppe, LANL, NM, USA <sup>217</sup>
pET22b+	Novagen, Darmstadt, D
pMAT-TC-Nos	GeneArt®, Life Technologies, Darmstadt, D
pGEX4T3	GE Healthcare, München, D
pSK17-NRE-5-GU23UG (pSK17-boxAB)	M. Mutas, Rentmeister Gruppe <sup>319</sup>
pSK17-NRE-5-CCC (pSK17-boxAC)	M. Mutas, Rentmeister Gruppe <sup>319</sup>

In Tabelle 6.14 sind die Plasmide aufgeführt, welche in dieser Arbeit hergestellt wurden. Die Sequenzen der Plasmide, welche in dieser Arbeit angefertigt wurden, finden sich im Anhang.

**Tabelle 6.14:** In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.

Bezeichnung	Wichtige Elemente
pET22b+HsPumHD	HsPumHD (Pumilio-wt) Gen mit C-terminalem His-Tag
pET22b+Pum3-2	MUT3-2 (Pum3-2) Gen mit C-terminalem His-Tag
pET22b+Pum-Var2	Pum1-2/2-1/3-2 (Pum-Var2) Gen mit C-terminalem His-Tag
pET22b+S10-Pum-Var2	Pum1-2/2-1/3-2 (Pum-Var2) Gen mit C-terminalem S10 und His-Tag
pRSET-A-TC-Nos	Tetra Cystein-Nos <sub>288-401</sub> (TC-Nos) Gen mit N-terminalem His-Tag
pGEX4T3-TC-Nos	Tetra Cystein-Nos <sub>288-401</sub> (TC-Nos) Gen mit N-terminalem GST-Tag
pGEX4T3-Nos	Nos <sub>288-401</sub> (Nos) Gen mit N-terminalem GST-Tag
pSK17-Hb-boxAB	boxAB (NRE-5-GU23UG) im Kontext der natürlichen Hb RNA
pSK17-Hb-boxAC	boxAC (NRE-5-CCC) im Kontext der natürlichen Hb RNA

## 6.13. Software

In dieser Arbeit wurde verschiedene Software verwendet, welche in nachfolgender Tabelle aufgelistet ist.

**Tabelle 6.15:** Verwendete Software.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Chromas Lite v. 2.01	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, AU
PlasmaDNA v. 1.4.2	Alexandre Angers-Loustau, University of Helsinki, S
Quantity One® v. 4.5.0	Bio-Rad, München, D
Origin® 8.5 OG SR1	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Corel Draw® X4 v. 14.0.0.567	Corel Corporation, Ottawa, CDN
Mfold web server	M. Zuker, University at Albany, NY, USA <sup>329</sup>
LabImage 1D	Kapelan, Leipzig, D
i-control™ v. 1.7	TECAN Group Ltd, Männedorf, CH
OligoCalc web server v. 3.26	W. A. Kibbe, Northwestern University, Chicago, USA <sup>330</sup>
PyMOL v. 1.5.0.4	Schrödinger, LLC
Unicorn v. 6.3.2	GE Healthcare, München, D



## 7. Methoden

### 7.1. Mikrobiologische Methoden

Alle Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen wurden in Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 nach Grundlagen des Gesetzes zur Regelung der Gentechnik (GenTG, BGBl) durchgeführt. Vor dem Entsorgen wurden alle Abfälle bei 120 °C und 1,4 bar Dampfdruck sterilisiert.

#### 7.1.1. Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen

Die Kultivierung von *E. coli* Bakterienzellen erfolgte aerob bei 37 °C in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten mit 0,1 mg Ampicillin/mL oder 0,025 mg Kanamycin/mL. Vorkulturen aus 3-5 mL LB-Medium und einer gepickten Bakterienkolonie wurden 12 h bei 220 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Hauptkulturen wurden mit 1/100 Volumen Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Zur Bestimmung der Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) wurde die Absorption der Zellen bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

#### 7.1.2. Transformation von *E. coli* Zellen mittels Elektroporation

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Transformation und die Transformation von *E. coli* Zellen mittels Elektroporation erfolgte nach Dower *et al.*<sup>465</sup> Zu 50 µL kompetenten *E. coli* Zellen wurden ca. 10 ng DNA (oder max. 2 µL) gegeben und bei 1.800 V für ca. 6 ms gepulst. Nach Zugabe von 450 µL SOC-Medium wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Kultivierung auf LB-Agar-Platten (7.1.1).

#### 7.1.3. Dauerhafte Lagerung von *E. coli* Zellen

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli* Zellen wurden Vorkulturen (7.1.1) mit einer Endkonzentration von 26 % Glycerol (v/v) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 7.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Plasmid-DNA wurde aus 3 mL *E. coli* Vorkulturen (7.1.1) nach Herstellerangaben mit dem HiYield® Plasmid Mini Kit isoliert. Anschließend folgte die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA (7.2.4).

### **7.1.5. Isolierung von Total-RNA aus *E. coli* Zellen**

Die Isolierung von Total-RNA aus *E. coli* BL21 (DE3) Zellen erfolgte mittels heißer Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert (7.1.1) und die RNA-Produktion gegebenenfalls mit 1 mM IPTG induziert. Nach 15-60 min wurden 20 mL der Zellen auf Eis abgekühlt, durch Zentrifugation für 10 min bei 4.500 g und 4 °C pelletiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 800 µL Lyse-Puffer und Inkubation bei 65 °C für 2 min. Zur Extraktion wurde der Ansatz mit 28,5 µL Natriumacetat (3 M, pH 5.2) sowie 1 Vol. 65 °C warmem Phenol (pH<7) versetzt und unter Schütteln für 6 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis erfolgte die Phasentrennung durch 10 minütige Zentrifugation bei 4.500 g und 4 °C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Phenol-Extraktion wiederholt. Im Anschluss folgten zwei Extraktionsschritte der wässrigen Phase mit 1 Vol. Chloroform und Zentrifugation für 5 min bei 4.500 g und 4 °C. Die RNA wurde mittels Alkoholpräzipitation (7.2.3) auf ein Volumen von 50 µL konzentriert.

## **7.2. Molekularbiologische Methoden**

### **7.2.1. Trennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese**

Die Trennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Größe erfolgte mittels Agarose- oder Polyacrylamidgelelektrophorese.

#### **7.2.1.1. Agarosegelelektrophorese**

Um 1,0 %ige (w/v) Agarosegele herzustellen, wurde die jeweilige Menge Agarose in TAE-Puffer gelöst. Wurden denaturierende Agarosegele zur Auftrennung von RNA hergestellt wurde die Agarose unter Zugabe von 1,85 % (v/v) Formaldehyd in MOPS-Puffer gelöst. Die native Agarosegelelektrophorese verlief in TAE-Puffer bei 120-140 V. Die Proben wurden zuvor mit DNA Ladepuffer versetzt. Für die denaturierende Agarosegelelektrophorese wurden die Proben mit RNA Ladepuffer versetzt und die Proben auf dem Gel in MOPS-Puffer bei 4-5 V/cm für 5 h getrennt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte durch Ethidiumbromidfärbung (7.2.2.1).

#### **7.2.1.2. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde verwendet um DNA, RNA oder RNA-Proteinkomplexe anhand ihres Molekulargewichts zu trennen. Native Polyacrylamid (PAA)-Gele wurden verwendet um doppelsträngige DNA zu trennen, denaturierende PAA-Gele für RNA. Für RNA-Protein-Komplexe wurden native Gel-Shift-PAA-Gele verwendet. Die Zusammensetzungen der PAA-Gele sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 7.1:** Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele.

Denaturierende PAA-Gele, 10 %	10 % (v/v) Acrylamid/ <i>N,N'</i> - Methylbisacrylamid (19:1); 1x TAE-Puffer; 8 M Urea; 0,1 % (v/v) TEMED; 0,07 % (v/v) APS
Gel-Shift-PAA-Gele, 3,75 %	3,75 % (v/v) Acrylamid/ <i>N,N'</i> - Methylbisacrylamid (37,5:1); 1x TAE-Puffer; 0,1 % (v/v) TEMED; 0,07 % (v/v) APS

Für die denaturierende PAGE wurden die Proben zuvor mit RNA Ladepuffer versetzt und bei 80 °C für 2 min denaturiert. Vor der PAGE erfolgte ein Vorlauf der Gele bei 15 W, die PAGE verlief ebenfalls bei 15 W in TAE-Puffer.

Um RNA-Protein-Komplexe zu trennen, wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt und der Vorlauf der PAA-Gele bei 4 °C und 80 V durchgeführt. Die PAGE verlief ebenfalls bei 4 °C und 80 V in TAE für 45 min. Im Anschluss an die PAGE wurden die Nukleinsäuren entweder isoliert (7.2.2.4) oder detektiert (7.2.2).

### 7.2.2. Detektion und Isolation von Nukleinsäuren nach der PAGE

Nach der Trennung von Nukleinsäuren in Agarose- oder Polyacrylamidgelen folgte deren Detektion. Abhängig von der weiteren Verwendung der Nukleinsäuren wurden verschiedene Methoden angewendet. Gegebenenfalls wurden die Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen isoliert.

#### 7.2.2.1. Detektion von Nukleinsäuren durch Ethidiumbromidfärbung

Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurden Agarose- oder PAA-Gele nach der Gelelektrophorese (4.2.1) für wenige Minuten in der Ethidiumbromid-Färbelösung inkubiert, anschließend mittels UV-Licht angeregt und dokumentiert.

#### 7.2.2.2. Nachweis von RNA mittels Northern-Blot

Die Detektion von RNA mittels Northern-Blot erfolgte aus denaturierenden Agarosegelen (7.2.1.1) oder Polyacrylamidgelen (7.2.1.2).

##### 7.2.2.2.1. Northern-Blot aus Agarosegelen

Nach der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel einmal in ddH<sub>2</sub>O gespült und die RNA anschließend durch 20 minütige Inkubation in 200 mL NB-Transferpuffer partiell hydrolysiert. Indes wurde die positiv geladene Nylonmembran in ddH<sub>2</sub>O gespült und für 5 min in 1x SSC inkubiert. Der Transfer erfolgte mittels Kapillarblot in NB-Transferpuffer für max. 1 h. Die Membran wurde anschließend mit 6x SSC für 5 min bei RT inkubiert und daraufhin getrocknet. Optional wurde die RNA auf der Membran durch Inkubation mit Methylen Blau Lösung für 5 min angefärbt. Das Entfärben der Membran erfolgte durch Inkubation in 0,2x SSC + 1 % SDS für 30 min. Die Prähybridisierung der Membran mit 10 mL Roti®-Hybri-Quick und 100 µg

Heringssperma DNA pro mL erfolgte für 1-6 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen. Es wurden 50 pmol der, radioaktiv markierten, sequenzspezifischen Sonde hinzugegeben und ÜN bei 65 °C inkubiert. Nach Hybridisierung der Sonde wurde die Membran einmal für 10 min mit 1x SSC + 0,1 % SDS und dreimal bei 68 °C mit 0,5x SSC + 0,1 % SDS gewaschen. Die Detektion der RNA auf der Membran erfolgte mittels Autoradiographie (7.2.2.3).

#### **7.2.2.2. Northern-Blot aus PAA-Gelen**

Nach der Gelelektrophorese wurde die RNA zunächst in dem PAA-Gel mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht (7.2.2.1). Der Transfer auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte in 1x TAE mit einem semi-dry Blotter für 2 h bei 80 mA pro Gel. Im Anschluss wurde die RNA bei 254 nm und 120 mJ/cm<sup>2</sup> mit der Membran quervernetzt. Die Prähybridisierung in Roti®-Hybri-Quick und 100 µg Heringssperma DNA pro mL erfolgte für 1-6 h bei 42 °C. Zur sequenzspezifischen Detektion werden 10 pmol der radioaktiv-markierten Sonde (7.2.10) zugegeben und über Nacht bei 42 °C hybridisiert. Die Membran wurde jeweils einmal mit 2x, 1x und 0,5x SSC-Lösungen mit je 0,1 % SDS, gewaschen. Nach einem finalen Waschschrift mit 0,5x SSC und 0,1 % SDS wurde die Membran getrocknet und die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie (7.2.2.3).

#### **7.2.2.3. Detektion radioaktiver Nukleinsäuren mittels Autoradiographie**

Mit dem Isotop <sup>32</sup>P radioaktiv markierte Nukleinsäuren, wurden mit der Methode der Autoradiographie detektiert. Das PAA-Gel oder die Nylonmembran, welche die Nukleinsäuren trugen, wurde in eine *Exposure Cassette* gelegt, mit einem *Imaging Screen* bedeckt und 1-16 h exponiert. Die Exponierung von PAA-Gelen über mehrere Stunden erfolgte bei -20 °C. Die Dokumentation erfolgte mit dem Molecular Imager FX.

#### **7.2.2.4. Diffusionselution von RNA aus Polyacrylamidgelen**

Zum Nachweis von RNA in PAA-Gelen wurde das UV-*Shadowing* verwendet. Das PAA-Gel wurde auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Anschließend wurde die RNA mittels Inkubation für 1 h in 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) bei 37 °C und 1.000 rpm aus dem PAA-Gel eluiert. Zur Konzentrierung der RNA auf 20 µL erfolgte eine Alkoholpräzipitation (7.2.3).

#### **7.2.3. Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren**

Die Alkoholpräzipitation erfolgte in 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 50 % (v/v) Isopropanol oder 70 % (v/v) Ethanol bei -20 °C für mindestens 1 h. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C für 30 min pelletiert und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Nukleinsäurepellet getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **7.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei 260 nm unter Verwendung des TECAN Infinite® Pro M200 Geräts und der Infinite® PRO NanoQuant Platte und der Software i-control™.

#### **7.2.5. Gel-Shift**

Die Methode des Gel-Shifts (oder auch *Electrophoretic Mobility Shift Assays*, EMSA) wurde verwendet, um die Interaktion von RNA und Proteinen zu analysieren. Die RNA wurde mittels *in vitro* Transkription hergestellt (7.2.9) und radioaktiv markiert (7.2.10). Die RNA wurde auf 5.000 cpm/μL mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt und 1:100 in Bindepuffer verdünnt. 20 μL dieser RNA Lösung wurden mit 5 μL der Proteinlösung absteigender Konzentration für 30 min bei RT in 96-well Platten inkubiert. Nach Zugabe von 5 μL DNA-Ladepuffer (6x) wurden 10-20 μL mit nativer Gel-Shift-PAGE aufgetrennt (7.2.1.2) und mittels Autoradiographie detektiert (7.2.2.3).

#### **7.2.6. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um DNA-Fragmente zu vervielfältigen und gegebenenfalls terminale Desoxyribonukleotide anzufügen. Eine Standard-PCR wurde mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase nach den Herstellerangaben angesetzt. Die Annealingtemperatur wurde, wie vom Hersteller empfohlen, aus der Schmelztemperatur der verwendeten Primer berechnet. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden 5-10 μL des Ansatzes gelelektrophoretisch getrennt (7.2.1) und die DNA mittels Ethidiumbromidfärbung detektiert (7.2.2.1).

##### **7.2.6.1. Kolonie-PCR**

Um zu identifizieren, ob *E. coli* Zellen bestimmte Plasmide trugen, wurde eine Kolonie-PCR angefertigt. Die PCR wurde mit der FIREPol® DNA Polymerase in einem 20 μL Ansatz nach Herstellerangaben angesetzt. Als Template dienten dabei 3 μL einer Suspension aus 10 μL ddH<sub>2</sub>O und einer gepickten Bakterienkolonie. Die Annealingtemperatur entsprach dabei der Schmelztemperatur der Primer, welche so gewählt wurden, dass ein Produkt nur bei Vorhandensein des neu klonierten Vektors entstehen kann.

#### **7.2.7. Klonierung von Plasmid-DNA**

Um Plasmide zu klonieren, wurden 1-3 μg des Plasmids mit Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben geschnitten, mit der FastAP *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert und mit dem NucleoSpin® *Gel and PCR Clean-up* Kit nach optionaler Agarosegelelektrophorese (7.2.1.1) gereinigt. Die Insert-DNA bestand aus gekauften Oligonukleotiden oder wurde mittels PCR (7.2.6) bzw. Assemblierungs-PCR (7.2.8.1) hergestellt

oder durch Restriktion eines Ursprungsplasmids gewonnen. Die Reinigung erfolgte ebenfalls mit dem Nucleo Spin® *Gel and PCR Clean-up* Kit. Für die Ligation beider Fragmente wurden zwei Ansätze mit 3- bzw. 5-fachem molaren Überschuss von Insert zu Vektor angefertigt. Die Ligation verlief mit der T4-DNA Ligase nach Herstellerangaben bei 22 °C über Nacht. Im Anschluss folgte die Transformation von *E. coli* Zellen mit 2 µL der Ligationsprodukte (7.1.2). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR und abschließender Sequenzierung der Plasmid-DNA von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, D) überprüft.

### **7.2.8. Mutagenese Methoden**

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um Mutationen in Gene einzufügen.

#### **7.2.8.1. Assemblierungs-PCR**

Die Mutation wurde in ein Gen mittels zweier PCRs (7.2.6) und Primern, welche die gewünschte Mutation enthielten, eingebracht. Um beide PCR Fragmente miteinander zu verbinden wurde eine Assemblierungs-PCR durchgeführt. Dazu wurden beide PCR-Produkte im äquimolaren Verhältnis für eine PCR eingesetzt, zu welcher erst nach 7 Zyklen die terminalen Primer zugegeben wurden. Das Gen wurde im Anschluss mittels Restriktion und Ligation in das gewünschte Plasmid kloniert (7.2.7).

#### **7.2.8.2. MEGA-primer PCR of whole plasmid (MEGA-WHOP)**

Um Restriktion und Ligation zu umgehen, wurden Mutationen mittels *MEGA-primer PCR of whole plasmid* (MEGA-WHOP)<sup>466</sup> in Gene eingeführt, welche in Plasmiden vorlagen. Dazu wurde zuerst ein mindestens 100 bp langer MEGA-Primer mittels Mutagenese-Primern und PCR (7.2.6) hergestellt, welcher im Anschluss für eine Synthese des ganzen Plasmids verwendet wurde. Das Ursprungsplasmid wurde durch Inkubation mit DpnI nach Herstellerangaben abgebaut und mit 2 µL dieses Reaktionsansatzes *E. coli* Zellen transformiert (7.1.2).

### **7.2.9. In vitro Transkription**

RNA wurde mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen 7 mittels *in vitro* Transkription hergestellt. Als Templat für die Transkription diente DNA, welche am 5'-Ende die doppelsträngige T7-Promoterregion enthielt. Diese DNA wurde entweder mittels PCR (7.2.6) oder durch Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide hergestellt. Für die Hybridisierung wurden je 5 µM der DNA-Fragmente in einem 100 µL Ansatz in 1x PCR-Puffer bei 80 °C denaturiert und mit 1 °C pro min auf 20 °C abgekühlt. Der Reaktionsansatz der *in vitro* Transkription ist in nachfolgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 7.2:** Reaktionsansatz der *in vitro* Transkription.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA-Template	2 µL PCR-Produkt oder 10 µL Hybridisierung	-/- 0,5 µM
NTPs [25 mM]	10 µL	2,5 mM
Transkriptions-Puffer, 3x	33 µL	1x
MgOAc <sub>2</sub> [500 mM]	3 µL	15 mM
T7-RNA-Polymerase [2 µM]	5 µL	0,1 µM
ddH <sub>2</sub> O	Ad 100 µL	

Sollten modifizierte Nukleotide eingebaut werden, wurden diese anstelle der normalen Nukleotide eingesetzt und die Variante Y639F der T7-RNA-Polymerase verwendet.

Die Reaktion verlief für 1,5 h bei 37 °C. Die vorhandene DNA wurde durch Inkubation des Ansatzes in Gegenwart von DNaseI abgebaut und die RNA im Anschluss mit Ethanol präzipitiert (7.2.3). Zur Reinigung wurde die RNA mittels denaturierender PAGE (7.2.1.2) getrennt, mittels Diffusionselution (7.2.2.4) aus dem Gel extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die Qualitätskontrolle der RNA erfolgte mittels denaturierender PAGE (7.2.1.2.). Eine Liste aller, mittels *in vitro* Transkription hergestellter, RNAs findet sich in Tabelle 6.10.

### 7.2.10. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

In dieser Arbeit wurden synthetische Oligonukleotide oder mittels *in vitro* Transkription hergestellte (7.2.9) RNA-Moleküle an ihrem 5'-Terminus radioaktiv markiert. RNA-Moleküle wurden vor der Markierung mit der FastAP *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Die Markierung erfolgte mit der T4-Polynukleotidkinase und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP in der *forward reaction* nach Herstellerangaben. Die Menge des eingesetzten [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATPs wurde der Dauer der Lagerung nach Lieferung angepasst. Es ist zu beachten, dass die Reaktion bei der Markierung von RNA nicht durch Erhitzen gestoppt wurde, sondern durch Zugabe von RNA-Ladepuffer. Die markierten DNA-Fragmente wurden mit P6 oder P30 *Bio-Spin*® Säulen gereinigt. Die RNA-Fragmente wurden mittels denaturierender PAGE getrennt (7.2.1.2) und durch Diffusionselution (7.2.2.4) mit anschließender Alkoholpräzipitation (7.2.3) gereinigt. Der Erfolg der Markierung wurde durch gelelektrophoretische Trennung (7.2.1) und Autoradiographie (7.2.2.3) überprüft. Um markierte RNA vergleichen zu können, wurden die cpm (*counts per minute*) bestimmt. Dazu wurde 1 µL der RNA zu 1 mL Szintillation Lösung gegeben und in dem *liquid scintillation counter* vermessen.

## 7.3. Proteinbiochemische Methoden

### 7.3.1. Trennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde verwendet, um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts zu trennen. Die PAA-Gele bestanden aus einem Trenn- sowie einem Sammelgel. Die Zusammensetzungen der SDS-PAA-Gele sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 7.3:** Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.

Trenngel	5-10 % (v/v) Acrylamid/ <i>N,N'</i> - Methylen-bis-(acrylamid) (37,5:1); 10 % (v/v) Glycerol; 1 M Tris-HCl (pH 8,45); 0,1 % (w/v) SDS; 0,05 % (v/v) APS; 0,05 % (v/v) TEMED
Sammelgel	4 % (v/v) Acrylamid/ <i>N,N'</i> - Methylen-bis-(acrylamid) (37,5:1); 2 M Tris-HCl (pH 8,45); 0,2 % (w/v) SDS; 0,06 % (v/v) APS; 0,06 % (v/v) TEMED

Die SDS-PAGE erfolgte bei 130 V in Kathoden- und Anodenpuffer bis die Lauffront das Gelende erreichte. Die native PAGE zur Trennung von Proteinen erfolgte bei 100 V ohne SDS im Gel und den Puffern. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot, Coomassie-Färbung oder Fluoreszenzmessung detektiert (7.3.2).

### 7.3.2. Detektion von Proteinen aus SDS-PAA-Gelen

#### 7.3.2.1. Coomassie Färbung

Zur Visualisierung von Proteinen in SDS-PAA-Gelen wurden diese in der Coomassie-Färbelösung für min. 20 min geschwenkt. Zur Entfärbung wurde das Gel mehrfach in Entfärberlösung kurz in der Mikrowelle erhitzt und bei RT inkubiert.

#### 7.3.2.2. Western-Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde die Methode des semi-dry Western-Blots verwendet. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (7.3.1) und mit einem semi-dry Blotter auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Der Transfer erfolgte für 45 min bei 80 mA pro Gel in Transferpuffer. Wurden Proteine aus nativen PAA-Gelen transferiert, erfolgte der Transfer für 10 h bei 50 mA pro Gel in Transferpuffer. Nach Inkubation mit Blockpuffer für 30-45 min bei RT wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-His 1:5.000 in PBS, 4 % BSA; Anti-GFP 1:1.000 in PBS, 4 % BSA) erfolgte für 1 h bei RT. Nach drei Waschschritten mit PBST wurde der Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG 1:30.000 in PBS) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Der Immunprint erfolgte

nach dreimaligem Waschen mit PBST und einmaligem Waschen mit Reaktionspuffer durch Zugabe von 10 mL Reaktionspuffer und je 100 µL der Substrat-Lösungen NBT und BCIP. Nach Bandenentwicklung wurde die Membran mit ddH<sub>2</sub>O gespült und luftgetrocknet.

### 7.3.2.3. Fluoreszenzmessung

Um, mit dem Fluoreszenzfarbstoff FLaSH markierte, Proteine in SDS-PAA-Gelen (7.3.1) nachzuweisen, wurden die Gele analog zur Ethidumbromidfärbung von Nukleinsäuren (7.2.2.1) mit UV-Licht angeregt und mit der Geldokumentationsanlage dokumentiert.

Zur Detektion des fluoreszierenden Proteins GFP in nativen PAA-Gelen (7.3.1) wurde das Gel mittels blauer LED angeregt und mit dem VersaDoc™ MP 4000 Imager und einem 530 nm BP Filter dokumentiert.

### 7.3.3. Rekombinante Proteinproduktion in *E. coli* Zellen

Proteine wurden in *E. coli* BL21 (DE3) oder *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen (für TC-Nos löslich) produziert. Dazu wurden die *E. coli* Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und kultiviert (7.1.1., 7.1.2). Die Proteinproduktion wurde durch die Zugabe von IPTG induziert und die Zellen im Anschluss weiter kultiviert. In Tabelle 7.4 sind die Bedingungen zur Produktion aller rekombinant hergestellten Proteine dargestellt.

**Tabelle 7.4:** Bedingungen der Proteinproduktion. Proteinproduktion erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, außer für TC-Nos löslich wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS verwendet. EK: Einschlusskörperchen.

Protein	Medium	Ansatzgröße	OD <sub>600</sub>	IPTG	Proteinproduktion
Pumilos	2xYT + Amp	200 mL	0,4	0,18 mM	3 h bei 37 °C
TC-Nos löslich	2xYT + Amp	200 mL	0,8	1,8 mM	ÜN bei 17 °C
TC-Nos EK	2xYT + Amp	500 mL	nach 4 h 0,18 mM		ÜN bei 17 °C
GFP1-9	LB + Kan	500 mL	nach 2,5 h 1,8 mM		5 h bei 37 °C
GST-Nos	2xYT + Amp	200 mL	0,6	1,8 mM	ÜN bei 17 °C
GST	2xYT + Amp	200 mL	0,4	0,18 mM	3 h bei 37 °C

Anschließend wurden die Zellen bei 4.000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, und das Zellpellet bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

### 7.3.4. Reinigung von Proteinen aus Zelllysat

Die Zellpellets wurden in 10 mL Bindepuffer aufgenommen (siehe nachfolgende Tabelle) und 3x 3 min (*duty cycle* 30 %, *output control* 30 %) sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C von dem Lysat getrennt, welches im Anschluss mit einem 0.2 µM Filter sterilfiltriert wurde.

Die Proteinreinigung erfolgte mit Hilfe des Geräts ÄKTApurifier und abhängig von dem Protein-Tag mit einer HisTrap™ oder GSTrap™ Säule über Affinitätschromatographie. Die Säule wurde

mit Bindepuffer äquilibriert und im Anschluss das Lysat aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit Imidazol- oder Glutathion-haltigem Elutionspuffer. In Tabelle 7.5 sind die verwendeten Puffer für die verschiedenen Proteine sowie die Konzentration des Elutionspuffers für die Elution aufgetragen. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (7.3.1) analysiert und die Proteine mittels Coomassie-Färbung (7.3.2.1) und Western-Blot visualisiert (7.3.2.2). Die Proteine wurden mit Hilfe der Amicon® Ultra-15 Zentrifugalfiltriereinheiten in den Pum-Lagerungspuffer dialysiert und auf ca. 200 µL konzentriert.

**Tabelle 7.5:** Affinitätschromatographie.

Protein	Säule	Bindepuffer	Elution	Lagerungspuffer
Pumilios	HisTrap™	Pum-Puffer A	50 % Pum-Puffer B	Pum-Lagerungspuffer
(TC-)Nos	HisTrap™	Nos-Puffer A	7 + 10 % Nos-Puffer B	-/-
GST-Nos	GSTrap™	Pum-Puffer A	50 % GST-Puffer B	Pum-Lagerungspuffer
GST	GSTrap™	Pum-Puffer A	50 % GST-Puffer B	Pum-Lagerungspuffer

Als zweiter Reinigungsschritt nach der Affinitätschromatographie wurde für das Protein TC-Nos ein Kationenaustauscher verwendet. Dazu wurde das gereinigte Protein in Nos-CIEX-Puffer A dialysiert und mittels des Systems ÄKTApurifier und einer HiTrap™ Heparin FF Säule gereinigt. Die Elution erfolgte mit 5 % Nos-CIEX-Puffer B (50 mM NaCl). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (7.3.1) und Coomassie Färbung (7.3.2.1) analysiert und das Protein in Nos-Bindepuffer dialysiert, auf ca. 100 µL konzentriert und bei -20 °C gelagert.

### 7.3.5. Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörperchen

Die Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) erfolgte nach Cabantous *et al.*<sup>353</sup> Die, nach der Proteinproduktion (7.3.3), erhaltenen Bakterienpellets wurden in 15 mL TNG-Puffer aufgenommen, dreimal für 2 min sonifiziert (*duty cycle* 50 %, *output control* 30 %) und für 60 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Schritt einmal wiederholt. Im Anschluss wurde das Pellet in 5 mL TNG-Puffer resuspendiert, dreimal für 2 min sonifiziert (*duty cycle* 50 %, *output control* 30 %) und für 20 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde gewogen und in einer finalen Konzentration von 75 mg/mL in TNG-Puffer resuspendiert. Nach vortexen wurde die Lösung à 1 mL aliquotiert und für 10 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet mit den Einschlusskörperchen wurde bei -80 °C gelagert. Dieses wurde anschließend in 1 mL Denaturierungspuffer oder Pum-Puffer A mit 6 M Urea resuspendiert und bei 37 °C unter Schütteln gelöst. Dadurch wurden die Einschlusskörperchen sowie die enthaltenen Proteine denaturiert. Um Proteinaggregate zu entfernen wurde diese Lösung für 1 min bei 16.000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proteine im Überstand rückgefaltet (7.3.6).

### 7.3.6. Proteinrückfaltung

Die Proteinrückfaltung nach der Reinigung aus Einschlusskörperchen (7.3.5) erfolgte mittels zwei verschiedener Methoden. Die einfache Rückfaltung nach Cabantous *et al.*<sup>353</sup> erfolgte durch Zugabe der denaturierten Proteine, gelöst in Denaturierungspuffer, zu 25 mL TNG-Puffer. Nach Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Filter wurde diese Proteinlösung à 1 mL aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die zweite Methode der Rückfaltung erfolgte nach Immobilisierung des Proteins auf einem Trägermaterial. Dazu wurden die denaturierten Proteine in 10 mL Pumilio Puffer A mit 6 M Urea aufgenommen und auf einer Nickel-Säule, welche zuvor mit diesem Puffer äquilibriert wurde, immobilisiert. Es wurde entweder eine HisTrap™ Säule verwendet, welche an dem System ÄKTApurifier angeschlossen wurde, oder eine 1 mL Matrix aus Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarosebeads, welche von Hand befüllt wurde. Nach Immobilisierung des Proteins wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen Pum-Puffer A gespült, um die Rückfaltung des Proteins zu ermöglichen. Das Protein wurde im Anschluss durch zunehmende Imidazol-Konzentration mit Pum-Puffer B eluiert.

### 7.3.7. TEV-Spaltung des GST-Nos Proteins

Um das Protein GST-Nos zu spalten und die Proteinfragmente GST und Nos zu erhalten, wurde das mittels Affinitätschromatographie gereinigte GST-Nos Protein in Pumilio Puffer A dialysiert und auf 500 µL konzentriert. Nach Zugabe von 0,6 µM TEV-Protease (S129V) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteinfragmente mittels Gelfiltration getrennt. Dazu wurde des System ÄKTApurifier und die Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule verwendet. Die Säule wurde in Pum-Puffer A äquilibriert und die Proteine mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min getrennt. Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE (7.3.1) und Coomassie Färbung (7.3.2.1) analysiert.

### 7.3.8. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde aus SDS-PAA-Gelen (7.3.1) bestimmt. Neben den Proteinen wurde auch eine BSA-Standardreihe von 2-0,1 mg/mL aufgetragen. Nach Coomassie-Färbung der Proteine (7.3.2.1) wurde deren Konzentration mit Hilfe der Software LabImage 1D berechnet.

### 7.3.9. Proteinstrukturanalyse mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD)

Um die Pumilio-Proteine mittels CD zu vermessen wurden sie auf 1 mg/mL mit 10 mM Tris (pH 7.4) verdünnt und in eine 1 mm Glasküvette gegeben. Die Messung verlief mit dem J-815 CD-Spektrometer und die Auswertung mit der Spectra Manager Software. Zur Bestimmung der molaren Elliptizität pro Aminosäure wurde folgende Formel verwendet:

$$\theta [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}] = \theta * 10^5 / (c \cdot d \cdot N_A)$$

Wobei  $\theta$  in [mdeg] angegeben wurde (Rohdaten des Spektrometers),  $c$  der Konzentration des Proteins in [ $\mu\text{M}$ ] und  $d$  dem Weg des Lichtstrahls in [cm] entsprach.  $N_A$  gibt die Anzahl der Aminosäuren in dem vermessenen Protein an.

Um den Schmelzpunkt zu bestimmen, wurden die Proteine von 20 auf 90 °C mit 1 ° pro min erhitzt, wobei alle 2 ° die Elliptizität bei 222 nm vermessen wurden.

### 7.3.10. UV-Crosslinking von Proteinen und RNA

Um Proteine und RNA mit einander zu vernetzen, wurden 5-40  $\mu\text{L}$  der Protein-RNA-Lösung auf eine Glasplatte pipettiert und mit 120 mJ bestrahlt.

## 7.4. Interaktionsstudien der Proteine Pumilio und Nanos

Interaktionen zwischen den Proteinen Pumilio-wt und Nanos wurden über Pulldown-Experimente und mittels Fluoreszenzpolarisation nachgewiesen. Um Fluoreszenzpolarisation messen zu können, wurde das Nanos Protein mit einem Tetra Cystein-Tag versehen und mittels FLAsH markiert. Für Pulldown-Experimente wurde das Nanos Protein mit einem GST-Tag versehen, welcher Immobilisierung auf einer Matrix erlaubt.

### 7.4.1. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Tetra Cystein-Tag

Um eine Fluoreszenz des Farbstoffes vor Bindung an den Tetra Cystein-Tag zu verhindern, wurde der Farbstoff FLAsH-EDT<sub>2</sub> zunächst mit Ethandithiol (EDT) in einem Verhältnis 1:10 für 15 min inkubiert. Zur anschließenden Proteinmarkierung wurden 5  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Proteins zu 10  $\mu\text{M}$  FLAsH und 100  $\mu\text{M}$  EDT gegeben und in einem Endvolumen von 10  $\mu\text{L}$  bei RT für mindestens 30 min inkubiert. Es wurden MOPS Puffer, Pum-Puffer A oder Pum-Bindepuffer ohne DTT oder Glycerol verwendet.

Die Analyse der Fluoreszenzmarkierung erfolgte entweder mittels SDS-PAGE und Fluoreszenzdetektion (7.3.2.3) oder mittels des Geräts TECAN Infinite® PRO F100. Dazu wurden die 10  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz in einer schwarzen 384-well Platte vermessen. Nach Anregung bei 508 nm wurde die Fluoreszenz bei 530 nm für 1 h alle 20 s bei 530 nm vermessen (Verstärkung: optimal, 20 Blitze).

Um das optimale Verhältnis von FLAsH zu Protein zu bestimmen, wurden verschiedene Mengen des Proteins TC-Nos (25-0.0016  $\mu\text{M}$ ) für 90 min mit FLAsH inkubiert und der Anstieg der Fluoreszenzintensität verfolgt. Das Verhältnis von TC-Nos zu FLAsH betrug dabei 1:0,1 bis 1:10.

### 7.4.2. Fluoreszenzpolarisation

Zur Messung der Fluoreszenzpolarisation wurden die Proteine in Pum-Bindepuffer ohne DTT dialysiert. Das Protein TC-Nos wurde, wie beschrieben, mit dem Farbstoff FLAsH markiert

(7.4.1). Proben mit dem FLAsH-EDT<sub>2</sub> alleine dienten bei der Messung als Referenz für den G-Faktor, welcher bei jeder Messung neu berechnet wurde. Als Leerprobe diente der Pum-Bindepuffer. Die Messung der parallelen und perpendicularen Fluoreszenz der Proben bei 590 nm (Bandbreite 20 nm) erfolgte mit dem TECAN Infinite® PRO F100 Gerät nach Anregung bei 530 nm (Bandbreite 25 nm). Die Messung erfolgte mit folgenden Einstellungen: Verstärkung optimal, Blitze 20, Referenzwert 20 mP. Die Werte für die Polarisation und Totalintensitäten wurden von dem Programm iControl berechnet.

### **7.4.3. Pulldown-Experimente**

Um Interaktionen mit GST-Nos zu untersuchen, wurden 1 µM des Pum-wt oder Pum-wt<sup>AGPH</sup> Proteins mit 2 µM der Target-RNA in Pum-Bindepuffer für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 3 µM des GST-Nos Proteins zugegeben und weitere 5 min bei RT und 30 min bei 4 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden Proben angefertigt, welchen entweder eines der Proteine oder die RNA fehlte. Ebenfalls wurde als Kontrolle nur GST verwendet. Nach der Interaktion der Proteine wurden 10 µL Glutathion-Beads in Pum-Bindepuffer zu den 20 µL Proteinlösung gegeben und die Proteine durch Inkubation für 30 min bei 4 °C unter Schütteln immobilisiert. Um nicht-immobilisierte Proteine zu entfernen, wurde der Ansatz in MoBiCol Säulen mit 10 µm Filter gegeben und bei 1.000 g für 1 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 30 µL Pum-Bindepuffer wurden optional 1 µM TEV-Protease in 30 µL Bindepuffer zugegeben, für 1 h bei 4 °C inkubiert und abgespaltene Proteine mittels Zentrifugation eluiert. Die Elution des immobilisierten Proteinkomplexes erfolgte durch Zugabe von 30 µL Probenpuffer und 3 min Aufkochen der Beads bei 95 °C. Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE (7.3.1) getrennt und durch Coomassie-Färbung (7.3.2.1) sowie Western-Blot (7.3.2.2) analysiert.

## 7.5. Fluoreszenzkomplementierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die tetramolekulare und Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung vermessen.

### 7.5.1. Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC)

In einer schwarzen 384-*well* Platte wurden 5  $\mu\text{L}$  einer Proteinlösung mit je 2,5  $\mu\text{M}$  der Fusionsproteine S10-Pum-wt (oder S10-Pum-Var2) und Pum-Var1-S11 vorgelegt und im Anschluss mit 2,5  $\mu\text{L}$  der zu untersuchenden RNA-Lösung mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 42,5  $\mu\text{L}$  einer unverdünnten GFP1-9-Lösung (4,9-12  $\mu\text{M}$ ) wurde die Komplementierung initiiert. Die Endkonzentration der Pumilio-Proteine und der RNA betragen 250 nM. Die Platte wurde in dem Gerät TECAN Infinite® Pro M200 vermessen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm und die Emission wurde bei 530 nm detektiert. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde für die erste Stunde in einem kinetischen Intervall von 10 min vermessen, danach für weitere 14-16 h in einem Intervall von 1 h.

Wurde eine RNA vermessen, welche eine charakteristische Sekundärstruktur aufwies, so wurde diese vor der Zugabe zu den Pumilio-Proteinen für 2 min bei 80 °C denaturiert und optional mit 1 °C/min auf RT abgekühlt.

#### 7.5.1.1. Temperaturabhängige TetFC

Um die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzkomplementierung zu bestimmen, wurden 250  $\mu\text{L}$  Ansätze in Reaktionsgefäßen bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Die jeweiligen Komponenten wurden bei den entsprechenden Temperaturen vor inkubiert. Die RNA und Pumilio Endkonzentration betrug dabei jeweils 125 nM. Um die Fluoreszenzintensität zu bestimmen, wurden zum jeweiligen Zeitpunkt 50  $\mu\text{L}$  des Ansatzes entnommen und in einer schwarzen 384-*well* Platte, wie unter 7.5.1 beschrieben, vermessen.

#### 7.5.1.2. TetFC in Total-RNA

In dieser Arbeit wurde die TetFC verwendet, um *in vitro* hergestellte RNA nach Zugabe von kompetierender Total-RNA zu detektieren oder *in vivo* transkribierte RNA nachzuweisen, welche sich in der isolierten Total-RNA befand. Zur Detektion der *in vitro* transkribierten RNA wurden Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen dieser RNA (62,5-1 nM) und äquimolaren Mengen der Pumilio-Proteine angesetzt und jeweils 10  $\mu\text{g}$  der bakteriellen Total-RNA zugegeben (7.1.5). Die TetFC erfolgte wie unter 7.5.1 beschrieben.

Um RNA nachzuweisen, welche *in vivo* produziert und mit der Total-RNA isoliert wurde (7.1.5), erfolgte eine Messung mit 250 nM der Pumilio-Proteine und 20-40  $\mu\text{g}$  der jeweiligen Total-RNA (enthielt 10-68 nM Target-RNA). Als Kontrolle diente jeweils Total-RNA, welche die Target-RNA

nicht enthielt. Bei diesen Messungen konnten die Volumina, welche in 7.5.1 beschrieben wurden, nicht eingehalten werden, so dass 3,4-6  $\mu\text{L}$  RNA mit 4-7,4  $\mu\text{L}$  der Proteine inkubiert und im Anschluss mit dem GFP1-9-Detektor auf ein finales Volumen von 50  $\mu\text{L}$  ergänzt wurden.

### **7.5.1.3. Metabolitinduzierte TetFC**

Die TetFC wurde auch zur Detektion einer metabolitinduzierten strukturellen Veränderung von RNA eingesetzt. Dazu wurde die zu untersuchende RNA für 2 min bei 80 °C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die RNA wurde mit dem Metabolit im Verhältnis 1:1.000 bei 37 °C für 15 min inkubiert und die Komplementierung im Anschluss, wie unter 7.5.1 beschrieben, gestartet.

### **7.5.2. Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung (RNP-FC)**

Die Ribonukleoprotein-Fluoreszenzkomplementierung erfolgte ähnlich zu der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung (7.5.1).

In der schwarzen 384-*well* Platte wurden 5  $\mu\text{L}$  der Protein-Lösung (3,5  $\mu\text{M}$ ) vorgelegt und mit 1  $\mu\text{L}$  der Staple-RNA (Konzentration 12,5  $\mu\text{M}$ ) und 2,5  $\mu\text{L}$  der 5  $\mu\text{M}$  Target-RNA-Lösung für 30 min inkubiert. Für die RNP-FC mit zwei Staple-RNAs wurden 5  $\mu\text{L}$  der Pumilio-Proteine (je 3,5  $\mu\text{M}$ ) zunächst für 30 min mit 2,5  $\mu\text{L}$  einer Staple-RNA-Lösung (je 5  $\mu\text{M}$ , RNA gekauft bei Biomers) inkubiert und im Anschluss 1  $\mu\text{L}$  der Target-RNA (12,5  $\mu\text{M}$ ) zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Die Zugabe von 41,5  $\mu\text{L}$  der GFP1-9-Lösung startete die Komplementierung. Die Vermessung der Fluoreszenz erfolgte wie in 7.5.1 beschrieben.



## 8. Literaturangaben

- 1 Martin, K. C. & Ephrussi, A. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719-730, (2009).
- 2 Palacios, I. M. How does an mRNA find its way? Intracellular localisation of transcripts. *Seminars in cell & developmental biology* **18**, 163-170, (2007).
- 3 Shav-Tal, Y. & Singer, R. H. RNA localization. *Journal of cell science* **118**, 4077-4081, (2005).
- 4 Mili, S., Moissoglu, K. & Macara, I. G. Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature* **453**, 115-119, (2008).
- 5 Becalska, A. N. & Gavis, E. R. Lighting up mRNA localization in Drosophila oogenesis. *Development* **136**, 2493-2503, (2009).
- 6 King, M. L., Messitt, T. J. & Mowry, K. L. Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **97**, (2005).
- 7 Lecuyer, E. *et al.* Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**, 174-187, (2007).
- 8 Meignin, C. & Davis, I. Transmitting the message: intracellular mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 112-119, (2010).
- 9 Singer, R. H. Highways for mRNA transport. *Cell* **134**, 722-723, (2008).
- 10 Wang, D. O. *et al.* Synapse- and stimulus-specific local translation during long-term neuronal plasticity. *Science* **324**, 1536-1540, (2009).
- 11 Bramham, C. R. & Wells, D. G. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* **8**, 776-789, (2007).
- 12 Brechbiel, J. L. & Gavis, E. R. Spatial regulation of nanos is required for its function in dendrite morphogenesis. *Current biology : CB* **18**, 745-750, (2008).
- 13 Kiebler, M. A. & Bassell, G. J. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* **51**, 685-690, (2006).
- 14 Lin, A. C. & Holt, C. E. Function and regulation of local axonal translation. *Current opinion in neurobiology* **18**, 60-68, (2008).
- 15 Martin, K. C. & Zukin, R. S. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* **26**, 7131-7134, (2006).
- 16 Brenner, H. R., Witzemann, V. & Sakmann, B. Imprinting of acetylcholine receptor messenger RNA accumulation in mammalian neuromuscular synapses. *Nature* **344**, (1990).
- 17 Hou, H. Y. *et al.* Stripy Ftz target genes are coordinately regulated by Ftz-F1. *Developmental biology* **335**, 442-453 (2009).
- 18 Schroeder, M. D. *et al.* Transcriptional control in the segmentation gene network of Drosophila. *PLoS biology* **2**, E271, (2004).

- 19 Simon, A. M., Hoppe, P. & Burden, S. J. Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development* **114**, 545-553 (1992).
- 20 Bergsten, S. E. & Gavis, E. R. Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development* **126**, 659-669 (1999).
- 21 Ding, D., Parkhurst, S. M., Halsell, S. R. & Lipshitz, H. D. Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Molecular and cellular biology* **13**, 3773-3781 (1993).
- 22 Forrest, K. M. & Gavis, E. R. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Current biology : CB* **13**, 1159-1168 (2003).
- 23 Chang, P. *et al.* Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* **15**, 4669-4681, (2004).
- 24 Paquin, N. & Chartrand, P. Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends in cell biology* **18**, 105-111, (2008).
- 25 Bullock, S. L. Translocation of mRNAs by molecular motors: think complex? *Seminars in cell & developmental biology* **18**, 194-201, (2007).
- 26 Hachet, O. & Ephrussi, A. Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**, 959-963, (2004).
- 27 Nelson, W. J. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-774, (2003).
- 28 Horne-Badovinac, S. & Bilder, D. Dynein regulates epithelial polarity and the apical localization of stardust A mRNA. *PLoS genetics* **4**, e8, (2008).
- 29 Van de Bor, V. & Davis, I. mRNA localisation gets more complex. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 300-307, (2004).
- 30 Wilkie, G. S. & Davis, I. *Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. *Cell* **105**, 209-219 (2001).
- 31 Bullock, S. L., Zicha, D. & Ish-Horowicz, D. The *Drosophila* hairy RNA localization signal modulates the kinetics of cytoplasmic mRNA transport. *The EMBO journal* **22**, 2484-2494, (2003).
- 32 Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X. & Bullock, S. L. Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes & development* **23**, 1546-1558, (2009).
- 33 Cha, B. J., Koppetsch, B. S. & Theurkauf, W. E. In vivo analysis of *Drosophila* bicoid mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway. *Cell* **106**, 35-46, (2001).
- 34 Delanoue, R. & Davis, I. Dynein anchors its mRNA cargo after apical transport in the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell* **122**, 97-106, (2005).
- 35 Delanoue, R., Herpers, B., Soetaert, J., Davis, I. & Rabouille, C. *Drosophila* Squid/hnRNP helps Dynein switch from a gurken mRNA transport motor to an ultrastructural static anchor in sponge bodies. *Developmental cell* **13**, 523-538, (2007).
- 36 Weil, T. T., Forrest, K. M. & Gavis, E. R. Localization of bicoid mRNA in late oocytes is maintained by continual active transport. *Developmental cell* **11**, 251-262, (2006).

- 37 Muller, M. *et al.* Formation of She2p tetramers is required for mRNA binding, mRNP assembly, and localization. *RNA* **15**, 2002-2012, (2009).
- 38 Bookwalter, C. S., Lord, M. & Trybus, K. M. Essential features of the class V myosin from budding yeast for ASH1 mRNA transport. *Molecular biology of the cell* **20**, 3414-3421, (2009).
- 39 Messitt, T. J. *et al.* Multiple kinesin motors coordinate cytoplasmic RNA transport on a subpopulation of microtubules in *Xenopus* oocytes. *Developmental cell* **15**, 426-436, (2008).
- 40 Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A. & Feldbrugge, M. Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *Journal of cell science* **125**, 2740-2752, (2012).
- 41 Vollmeister, E. *et al.* Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS microbiology reviews* **36**, 59-77, (2012).
- 42 Condeelis, J. & Singer, R. H. How and why does beta-actin mRNA target? *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **97**, 97-110, (2005).
- 43 Oleynikov, Y. & Singer, R. H. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Current biology : CB* **13**, 199-207 (2003).
- 44 Fusco, D. *et al.* Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Current biology : CB* **13**, 161-167 (2003).
- 45 Latham, V. M., Yu, E. H., Tullio, A. N., Adelstein, R. S. & Singer, R. H. A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes beta-actin mRNA in fibroblasts. *Current biology : CB* **11**, 1010-1016 (2001).
- 46 Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules. *The Journal of cell biology* **172**, 803-808, (2006).
- 47 Vessey, J. P. *et al.* Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules. *J Neurosci* **26**, 6496-6508, (2006).
- 48 Chekulaeva, M., Hentze, M. W. & Ephrussi, A. Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* **124**, 521-533, (2006).
- 49 Napoli, I. *et al.* The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell* **134**, 1042-1054, (2008).
- 50 Nakamura, A., Sato, K. & Hanyu-Nakamura, K. *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Developmental cell* **6**, 69-78 (2004).
- 51 Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D. & Singer, R. H. A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes & development* **18**, 1452-1465, (2004).
- 52 Deng, Y., Singer, R. H. & Gu, W. Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes & development* **22**, 1037-1050, (2008).
- 53 Wells, D. G. RNA-binding proteins: a lesson in repression. *J Neurosci* **26**, 7135-7138, (2006).
- 54 Huttelmaier, S. *et al.* Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512-515, (2005).
- 55 Hake, L. E. & Richter, J. D. CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* **79**, 617-627 (1994).

- 56 Huang, Y. S., Kan, M. C., Lin, C. L. & Richter, J. D. CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *The EMBO journal* **25**, 4865-4876, (2006).
- 57 Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R. & Richter, J. D. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Molecular cell* **4**, 1017-1027 (1999).
- 58 Barnard, D. C., Ryan, K., Manley, J. L. & Richter, J. D. Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* **119**, 641-651, (2004).
- 59 Kim, J. H. & Richter, J. D. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Molecular cell* **24**, 173-183, (2006).
- 60 Cao, Q. & Richter, J. D. Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *The EMBO journal* **21**, 3852-3862, (2002).
- 61 Mendez, R. & Richter, J. D. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 521-529, (2001).
- 62 Besse, F. & Ephrussi, A. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 971-980, (2008).
- 63 Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683-696 (2001).
- 64 Tennyson, V. M. The fine structure of the axon and growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo. *The Journal of cell biology* **44**, 62-79 (1970).
- 65 Yamada, K. M., Spooner, B. S. & Wessells, N. K. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *The Journal of cell biology* **49**, 614-635 (1971).
- 66 Bunge, M. B. Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *The Journal of cell biology* **56**, 713-735 (1973).
- 67 Zheng, J. Q. *et al.* A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J Neurosci* **21**, 9291-9303 (2001).
- 68 Steward, O. & Levy, W. B. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* **2**, 284-291 (1982).
- 69 Steward, O. & Reeves, T. M. Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J Neurosci* **8**, 176-184 (1988).
- 70 Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B. & Harris, K. M. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* **35**, 535-545 (2002).
- 71 Willett, M., Pollard, H. J., Vlasak, M. & Morley, S. J. Localization of ribosomes and translation initiation factors to talin/beta3-integrin-enriched adhesion complexes in spreading and migrating mammalian cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **102**, 265-276, (2010).
- 72 Chicurel, M. E., Singer, R. H., Meyer, C. J. & Ingber, D. E. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature* **392**, 730-733, (1998).

- 73 Khandjian, E. W. *et al.* Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, (2004).
- 74 Stefani, G., Fraser, C. E., Darnell, J. C. & Darnell, R. B. Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J Neurosci* **24**, 7272-7276, (2004).
- 75 Bassell, G. J. *et al.* Actin filaments and the spatial positioning of mRNAs. *Advances in experimental medicine and biology* **358**, 183-189 (1994).
- 76 Bassell, G. J. & Warren, S. T. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* **60**, 201-214, (2008).
- 77 Vainer, G. *et al.* A role for VICKZ proteins in the progression of colorectal carcinomas: regulating lamellipodia formation. *The Journal of pathology* **215**, 445-456, (2008).
- 78 Jeffery, W. R., Tomlinson, C. R. & Brodeur, R. D. Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Developmental biology* **99**, 408-417 (1983).
- 79 Akam, M. E. The location of Ultrabithorax transcripts in Drosophila tissue sections. *The EMBO journal* **2**, 2075-2084 (1983).
- 80 Edgar, B. A., Odell, G. M. & Schubiger, G. Cytoarchitecture and the patterning of fushi tarazu expression in the Drosophila blastoderm. *Genes & development* **1**, 1226-1237 (1987).
- 81 Bauman, J. G., Wiegant, J., Borst, P. & van Duijn, P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Experimental cell research* **128**, 485-490 (1980).
- 82 Pante, N. *et al.* Visualizing nuclear export of different classes of RNA by electron microscopy. *RNA* **3**, 498-513 (1997).
- 83 Dworetzky, S. I. & Feldherr, C. M. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *The Journal of cell biology* **106**, 575-584 (1988).
- 84 Herpers, B. & Rabouille, C. mRNA localization and ER-based protein sorting mechanisms dictate the use of transitional endoplasmic reticulum-golgi units involved in gurken transport in Drosophila oocytes. *Molecular biology of the cell* **15**, 5306-5317, (2004).
- 85 Trucco, A., Gaspar, I. & Ephrussi, A. Assembly of endogenous oskar mRNA particles for motor-dependent transport in the Drosophila oocyte. *Cell* **139**, 983-998, (2009).
- 86 Lawrence, J. B., Singer, R. H. & Marselle, L. M. Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. *Cell* **57**, 493-502 (1989).
- 87 Femino, A. M., Fogarty, K., Lifshitz, L. M., Carrington, W. & Singer, R. H. Visualization of single molecules of mRNA in situ. *Methods in enzymology* **361**, 245-304 (2003).
- 88 Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K. & Singer, R. H. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* **280**, 585-590 (1998).
- 89 Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A. & Tyagi, S. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods* **5**, 877-879, (2008).
- 90 Zenklusen, D., Larson, D. R. & Singer, R. H. Single-RNA counting reveals alternative modes of gene expression in yeast. *Nature structural & molecular biology* **15**, 1263-1271, (2008).

- 91 Hughes, S. C. & Krause, H. M. Double labeling with fluorescence in situ hybridization in *Drosophila* whole-mount embryos. *BioTechniques* **24**, 530-532 (1998).
- 92 Sigrist, S. J. *et al.* Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* **405**, 1062-1065, (2000).
- 93 Miller, O. L. & Bakken, A. H. Morphological Studies of Transcription. *Acta Endocrinol-Cop*, 155-& (1972).
- 94 Yisraeli, J. K., Sokol, S. & Melton, D. A. A 2-Step Model for the Localization of Maternal Messenger-Rna in *Xenopus* Oocytes - Involvement of Microtubules and Microfilaments in the Translocation and Anchoring of Vg1 Messenger-Rna. *Development* **108**, 289-298 (1990).
- 95 Yisraeli, J. K. & Melton, D. A. The Maternal Messenger-Rna Vg1 Is Correctly Localized Following Injection into *Xenopus* Oocytes. *Nature* **336**, 592-595, (1988).
- 96 Glotzer, J. B., Saffrich, R., Glotzer, M. & Ephrussi, A. Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in *Drosophila* oocytes. *Current Biology* **7**, 326-337, (1997).
- 97 Lall, S. *et al.* Squid hnRNP protein promotes apical cytoplasmic transport and localization of *Drosophila* pair-rule transcripts. *Cell* **98**, 171-180, (1999).
- 98 Wilkie, G. S. & Davis, I. *Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. *Cell* **105**, 209-219, (2001).
- 99 Bullock, S. L. & Ish-Horowicz, D. Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature* **414**, 611-616, (2001).
- 100 Dirks, R. W., Molenaar, C. & Tanke, H. J. Methods for visualizing RNA processing and transport pathways in living cells. *Histochem Cell Biol* **115**, 3-11 (2001).
- 101 Weil, T. T., Parton, R. M. & Davis, I. Making the message clear: visualizing mRNA localization. *Trends in cell biology* **20**, 380-390, (2010).
- 102 Knowles, R. B. *et al.* Translocation of RNA granules in living neurons. *Journal of Neuroscience* **16**, 7812-7820 (1996).
- 103 Molenaar, C., Abdulle, A., Gena, A., Tanke, H. J. & Dirks, R. W. Poly(A)+ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *The Journal of cell biology* **165**, 191-202, (2004).
- 104 Molenaar, C. *et al.* Linear 2' O-Methyl RNA probes for the visualization of RNA in living cells. *Nucleic acids research* **29**, E89-89 (2001).
- 105 Santangelo, P. J. Molecular beacons and related probes for intracellular RNA imaging. *Wires Nanomed Nanobi* **2**, 11-19, (2010).
- 106 Tsuji, A. *et al.* Direct observation of specific messenger RNA in a single living cell under a fluorescence microscope. *Biophys J* **78**, 3260-3274 (2000).
- 107 Okabe, K. *et al.* Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear antisense 2'-O-methyl RNA probes in living cells. *Nucleic acids research* **39**, e20, (2011).
- 108 Xu, Y., Karalkar, N. B. & Kool, E. T. Nonenzymatic autoligation in direct three-color detection of RNA and DNA point mutations. *Nature biotechnology* **19**, 148-152, (2001).

- 109 Abe, H. & Kool, E. T. Flow cytometric detection of specific RNAs in native human cells with quenched autologating FRET probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 263-268, (2006).
- 110 Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology* **14**, 303-308, (1996).
- 111 Bao, G., Tsourkas, A. & Santangelo, P. J. Engineering nanostructured probes for sensitive intracellular gene detection. *Mechanics & chemistry of biosystems : MCB* **1**, 23-36 (2004).
- 112 Bratu, D. P. Molecular beacons: Fluorescent probes for detection of endogenous mRNAs in living cells. *Methods Mol Biol* **319**, 1-14, (2006).
- 113 Santangelo, P. J. *et al.* Single molecule-sensitive probes for imaging RNA in live cells. *Nature methods* **6**, 347-349, (2009).
- 114 Santangelo, P. J. & Bao, G. Dynamics of filamentous viral RNPs prior to egress. *Nucleic acids research* **35**, 3602-3611, (2007).
- 115 Santangelo, P. J., Nitin, N. & Bao, G. Direct visualization of mRNA colocalization with mitochondria in living cells using molecular beacons. *Journal of biomedical optics* **10**, 44025, (2005).
- 116 Bratu, D. P., Cha, B. J., Mhlanga, M. M., Kramer, F. R. & Tyagi, S. Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13308-13313, (2003).
- 117 Chen, A. K., Behlke, M. A. & Tsourkas, A. Sub-cellular trafficking and functionality of 2'-O-methyl and 2'-O-methyl-phosphorothioate molecular beacons. *Nucleic acids research* **37**, (2009).
- 118 Vargas, D. Y., Raj, A., Marras, S. A., Kramer, F. R. & Tyagi, S. Mechanism of mRNA transport in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17008-17013, (2005).
- 119 Joshi, K. B., Vlachos, A., Mikat, V., Deller, T. & Heckel, A. Light-activatable molecular beacons with a caged loop sequence. *Chem Commun (Camb)* **48**, 2746-2748, (2012).
- 120 Lifland, A. W., Zurla, C. & Santangelo, P. J. Single molecule sensitive multivalent polyethylene glycol probes for RNA imaging. *Bioconjugate chemistry* **21**, 483-488, (2010).
- 121 Santangelo, P. J., Alonas, E., Jung, J., Lifland, A. W. & Zurla, C. in *Methods in enzymology*, **505**, 383-399 (2012).
- 122 Ikeda, S. *et al.* Design and synthesis of caged fluorescent nucleotides and application to live-cell RNA imaging. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **12**, 2871-2880, (2011).
- 123 Ikeda, S., Kubota, T., Yanagisawa, H., Yuki, M. & Okamoto, A. Synthesis of exciton-controlled fluorescent probes for RNA imaging. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 155-156, (2009).
- 124 Ikeda, S. *et al.* Hybridization-sensitive fluorescent DNA probe with self-avoidance ability. *Organic & biomolecular chemistry* **8**, 546-551, (2010).
- 125 Kubota, T., Ikeda, S., Yanagisawa, H., Yuki, M. & Okamoto, A. Hybridization-sensitive fluorescent probe for long-term monitoring of intracellular RNA. *Bioconjugate chemistry* **20**, 1256-1261, (2009).

- 126 Kubota, T., Ikeda, S., Yanagisawa, H., Yuki, M. & Okamoto, A. Sets of RNA repeated tags and hybridization-sensitive fluorescent probes for distinct images of RNA in a living cell. *PLoS one* **5**, e13003, (2010).
- 127 Köhler, O., Jarikote, D. V. & Seitz, O. Forced Intercalation Probes (FIT Probes): Thiazole Orange as a Fluorescent Base in Peptide Nucleic Acids for Homogeneous Single-Nucleotide-Polymorphism Detection. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **6**, 69-77, (2005).
- 128 Kummer, S. *et al.* Fluorescence imaging of influenza H1N1 mRNA in living infected cells using single-chromophore FIT-PNA. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 1931-1934, (2011).
- 129 Hövelmann, F., Gaspar, I., Ephrussi, A. & Seitz, O. Brightness Enhanced DNA FIT-Probes for Wash-Free RNA Imaging in Tissue. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 19025-19032, (2013).
- 130 Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7297-7301 (1995).
- 131 Nitin, N. & Bao, G. NLS peptide conjugated molecular beacons for visualizing nuclear RNA in living cells. *Bioconjugate chemistry* **19**, 2205-2211, (2008).
- 132 Chen, A. K., Behlke, M. A. & Tsourkas, A. Efficient cytosolic delivery of molecular beacon conjugates and flow cytometric analysis of target RNA. *Nucleic acids research* **36**, (2008).
- 133 Spiller, D. G., Giles, R. V., Grzybowski, J., Tidd, D. M. & Clark, R. E. Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cells: a comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation. *Blood* **91**, 4738-4746 (1998).
- 134 Nitin, N., Santangelo, P. J., Kim, G., Nie, S. & Bao, G. Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells. *Nucleic acids research* **32**, e58, (2004).
- 135 Chen, A. K., Behlke, M. A. & Tsourkas, A. Avoiding false-positive signals with nuclease-vulnerable molecular beacons in single living cells. *Nucleic acids research* **35**, e105, (2007).
- 136 Mhlanga, M. M., Vargas, D. Y., Fung, C. W., Kramer, F. R. & Tyagi, S. tRNA-linked molecular beacons for imaging mRNAs in the cytoplasm of living cells. *Nucleic acids research* **33**, 1902-1912, (2005).
- 137 Tyagi, S. & Alsmadi, O. Imaging native beta-actin mRNA in motile fibroblasts. *Biophys J* **87**, 4153-4162, (2004).
- 138 Paillason, S. *et al.* In situ hybridization in living cells: detection of RNA molecules. *Experimental cell research* **231**, 226-233, (1997).
- 139 Rhee, W. J., Santangelo, P. J., Jo, H. & Bao, G. Target accessibility and signal specificity in live-cell detection of BMP-4 mRNA using molecular beacons. *Nucleic acids research* **36**, e30, (2008).
- 140 Utley, T. J. *et al.* Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10209-10214, (2008).
- 141 Qiu, L. *et al.* A targeted, self-delivered, and photocontrolled molecular beacon for mRNA detection in living cells. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 12952-12955, (2013).

- 142 Waki, R., Yamayoshi, A., Kobori, A. & Murakami, A. Development of a system to sensitively and specifically visualize c-fos mRNA in living cells using bispyrene-modified RNA probes. *Chem Commun (Camb)* **47**, 4204-4206, (2011).
- 143 Paige, J. S., Wu, K. Y. & Jaffrey, S. R. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* **333**, 642-646, (2011).
- 144 Strack, R. L., Disney, M. D. & Jaffrey, S. R. A superfolding Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. *Nature methods* **10**, 1219-1224, (2013).
- 145 Sunbul, M. & Jaschke, A. Contact-mediated quenching for RNA imaging in bacteria with a fluorophore-binding aptamer. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**, 13401-13404, (2013).
- 146 Motorin, Y. *et al.* Expanding the chemical scope of RNA:methyltransferases to site-specific alkynylation of RNA for click labeling. *Nucleic acids research* **39**, 1943-1952, (2011).
- 147 Schulz, D., Holstein, J. M. & Rentmeister, A. A chemo-enzymatic approach for site-specific modification of the RNA cap. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**, 7874-7878, (2013).
- 148 Holstein, J. M., Schulz, D. & Rentmeister, A. Bioorthogonal site-specific labeling of the 5'-cap structure in eukaryotic mRNAs. *Chemical Communications*, (2014).
- 149 Tomkuviene, M., Clouet-d'Orval, B., Cerniauskas, I., Weinhold, E. & Klimasauskas, S. Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. *Nucleic acids research* **40**, 6765-6773, (2012).
- 150 Bertrand, E. *et al.* Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Molecular cell* **2**, 437-445 (1998).
- 151 Fouts, D. E., True, H. L. & Celandier, D. W. Functional recognition of fragmented operator sites by R17/MS2 coat protein, a translational repressor. *Nucleic acids research* **25**, 4464-4473 (1997).
- 152 Valegard, K. *et al.* The three-dimensional structures of two complexes between recombinant MS2 capsids and RNA operator fragments reveal sequence-specific protein-RNA interactions. *J Mol Biol* **270**, 724-738, (1997).
- 153 LeCuyer, K. A., Behlen, L. S. & Uhlenbeck, O. C. Mutagenesis of a stacking contact in the MS2 coat protein-RNA complex. *The EMBO journal* **15**, 6847-6853 (1996).
- 154 Golding, I. & Cox, E. C. RNA dynamics in live *Escherichia coli* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11310-11315, (2004).
- 155 Wu, B., Chao, J. A. & Singer, R. H. Fluorescence fluctuation spectroscopy enables quantitative imaging of single mRNAs in living cells. *Biophys J* **102**, 2936-2944, (2012).
- 156 Daigle, N. & Ellenberg, J. LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nature methods* **4**, 633-636, (2007).
- 157 Hocine, S., Raymond, P., Zenklusen, D., Chao, J. A. & Singer, R. H. Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nature methods* **10**, 119-121, (2013).
- 158 Larson, D. R., Zenklusen, D., Wu, B., Chao, J. A. & Singer, R. H. Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. *Science* **332**, 475-478, (2011).

- 159 Chen, J. *et al.* High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13535-13540, (2009).
- 160 Darzacq, X. *et al.* In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature structural & molecular biology* **14**, 796-806, (2007).
- 161 Huranova, M. *et al.* In vivo detection of RNA-binding protein interactions with cognate RNA sequences by fluorescence resonance energy transfer. *RNA* **15**, 2063-2071, (2009).
- 162 Kemler, I., Meehan, A. & Poeschla, E. M. Live-cell coimaging of the genomic RNAs and Gag proteins of two lentiviruses. *Journal of virology* **84**, 6352-6366, (2010).
- 163 Lange, S. *et al.* Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging. *Traffic* **9**, 1256-1267, (2008).
- 164 Moore, M. D. *et al.* Probing the HIV-1 genomic RNA trafficking pathway and dimerization by genetic recombination and single virion analyses. *PLoS pathogens* **5**, (2009).
- 165 Baumann, S., Konig, J., Koepke, J. & Feldbrugge, M. Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO reports* **15**, 94-102, (2014).
- 166 Brodsky, A. S. & Silver, P. A. Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *RNA* **6**, 1737-1749 (2000).
- 167 Chubb, J. R., Trcek, T., Shenoy, S. M. & Singer, R. H. Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Current biology : CB* **16**, 1018-1025, (2006).
- 168 Rook, M. S., Lu, M. & Kosik, K. S. CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci* **20**, 6385-6393 (2000).
- 169 Yunger, S., Rosenfeld, L., Garini, Y. & Shav-Tal, Y. Single-allele analysis of transcription kinetics in living mammalian cells. *Nature methods* **7**, 631-633, (2010).
- 170 Janicki, S. M. *et al.* From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* **116**, 683-698 (2004).
- 171 Mor, A. *et al.* Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells. *Nature cell biology* **12**, 543-552, (2010).
- 172 Boireau, S. *et al.* The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells. *The Journal of cell biology* **179**, 291-304, (2007).
- 173 Fang, Y. & Spector, D. L. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Current biology : CB* **17**, 818-823, (2007).
- 174 Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y. & Watanabe, Y. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. *Plant & cell physiology* **48**, 1243-1253, (2007).
- 175 Zhang, F. & Simon, A. E. A novel procedure for the localization of viral RNAs in protoplasts and whole plants. *Plant J* **35**, 665-673 (2003).
- 176 Schonberger, J., Hammes, U. Z. & Dresselhaus, T. In vivo visualization of RNA in plants cells using the lambdaN(2)(2) system and a GATEWAY-compatible vector series for candidate RNAs. *Plant J* **71**, 173-181, (2012).

- 177 Lionnet, T. *et al.* A transgenic mouse for in vivo detection of endogenous labeled mRNA. *Nature methods* **8**, 165-170, (2011).
- 178 Park, H. Y. *et al.* Visualization of Dynamics of Single Endogenous mRNA Labeled in Live Mouse. *Science* **343**, 422-424, (2014).
- 179 Yoshimura, H., Inaguma, A., Yamada, T. & Ozawa, T. Fluorescent Probes for Imaging Endogenous  $\beta$ -Actin mRNA in Living Cells Using Fluorescent Protein-Tagged Pumilio. *ACS Chemical Biology* **7**, 999-1005, (2012).
- 180 Ben-Ari, Y. *et al.* The life of an mRNA in space and time. *Journal of cell science* **123**, 1761-1774, (2010).
- 181 Calapez, A. *et al.* The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive. *The Journal of cell biology* **159**, 795-805, (2002).
- 182 Jaramillo, A. M., Weil, T. T., Goodhouse, J., Gavis, E. R. & Schupbach, T. The dynamics of fluorescently labeled endogenous gurken mRNA in Drosophila. *Journal of cell science* **121**, 887-894, (2008).
- 183 Larson, D. R. *et al.* Direct observation of frequency modulated transcription in single cells using light activation. *eLife* **2**, e00750 (2013).
- 184 Shav-Tal, Y. *et al.* Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science* **304**, 1797-1800, (2004).
- 185 Zhang, H. L. *et al.* Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNA complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**, 261-275 (2001).
- 186 Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, J. Characterization by in Vitro Complementation of a Peptide Corresponding to an Operator-Proximal Segment of Beta-Galactosidase Structural Gene of Escherichia Coli. *J Mol Biol* **24**, 339-&, (1967).
- 187 Johnsson, N. & Varshavsky, A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10340-10344 (1994).
- 188 Rossi, F., Charlton, C. A. & Blau, H. M. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8405-8410 (1997).
- 189 Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L. E. & Michnick, S. W. beta-Lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein-protein interactions. *Nature biotechnology* **20**, 619-622, (2002).
- 190 Paulmurugan, R. & Gambhir, S. S. Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal. Chem.* **75**, (2003).
- 191 Luker, K. E. *et al.* Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12288-12293, (2004).
- 192 Wehr, M. C. *et al.* Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nature methods* **3**, 985-993, (2006).

- 193 Ghosh, I., Hamilton, A. D., Regan, L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 5658-5659 (2000).
- 194 Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S. & Miyawaki, A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3197-3202, (2001).
- 195 Jiang, Y. *et al.* Split Renilla luciferase protein fragment-assisted complementation (SRL-PFAC) to characterize Hsp90-Cdc37 complex and identify critical residues in protein/protein interactions. *The Journal of biological chemistry* **285**, 21023-21036, (2010).
- 196 Rackham, O. & Brown, C. M. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *The EMBO journal* **23**, 3346-3355, (2004).
- 197 Schmidt, U., Richter, K., Berger, A. B. & Lichter, P. In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *The Journal of cell biology* **172**, 373-381, (2006).
- 198 Valencia-Burton, M., McCullough, R. M., Cantor, C. R. & Broude, N. E. RNA visualization in live bacterial cells using fluorescent protein complementation. *Nature methods* **4**, 421-427, (2007).
- 199 Andou, T., Endoh, T., Mie, M. & Kobatake, E. Direct detection of RNAs in living cells using peptide-inserted Renilla luciferase. *The Analyst* **136**, 2446-2449, (2011).
- 200 Ozawa, T., Natori, Y., Sato, M. & Umezawa, Y. Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells. *Nature methods* **4**, 413-419, (2007).
- 201 Wu, B., Chen, J. H. & Singer, R. H. Background free imaging of single mRNAs in live cells using split fluorescent proteins. *Scientific reports* **4**, (2014).
- 202 Schmidt, U. *et al.* Assembly and mobility of exon-exon junction complexes in living cells. *RNA* **15**, 862-876, (2009).
- 203 Yamada, T., Yoshimura, H., Inaguma, A. & Ozawa, T. Visualization of Nonengineered Single mRNAs in Living Cells Using Genetically Encoded Fluorescent Probes. *Anal. Chem.* **83**, 5708-5714, (2011).
- 204 Tilsner, J. *et al.* Live-cell imaging of viral RNA genomes using a Pumilio-based reporter. *Plant J* **57**, 758-770, (2009).
- 205 Valencia-Burton, M. *et al.* Spatiotemporal patterns and transcription kinetics of induced RNA in single bacterial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16399-16404 (2009).
- 206 Milev, M. P., Brown, C. M. & Moulard, A. J. Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1. *Retrovirology* **7**, 41, (2010).
- 207 Ortega, A. D., Willers, I. M., Sala, S. & Cuezva, J. M. Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Journal of cell science* **123**, 2685-2696, (2010).
- 208 Furman, J. L. *et al.* Toward a General Approach for RNA-Templated Hierarchical Assembly of Split-Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 11692-11701, (2010).
- 209 Yiu, H.-W., Demidov, V. V., Toran, P., Cantor, R. C. & Broude, N. E. RNA Detection in Live Bacterial Cells Using Fluorescent Protein Complementation Triggered by Interaction of Two RNA Aptamers with Two RNA-Binding Peptides. *Pharmaceuticals* **4**, 494-508, (2011).

- 210 Yin, J. *et al.* Imaging of mRNA-Protein Interactions in Live Cells Using Novel mCherry Trimolecular Fluorescence Complementation Systems. *PLoS one* **8**, e80851, (2013).
- 211 Porter, J. R., Stains, C. I., Jester, B. W. & Ghosh, I. A general and rapid cell-free approach for the interrogation of protein-protein, protein-DNA, and protein-RNA interactions and their antagonists utilizing split-protein reporters. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 6488-6497, (2008).
- 212 Ghoujal, B., Milev, M. P., Ajamian, L., Abel, K. & Mouland, A. J. ESCRT-II's involvement in HIV-1 genomic RNA trafficking and assembly. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **104**, 706-721, (2012).
- 213 Kodama, Y. & Hu, C. D. An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio. *BioTechniques* **49**, 793-805, (2010).
- 214 Shyu, Y. J., Suarez, C. D. & Hu, C. D. Visualization of AP-1 NF-kappaB ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 151-156, (2008).
- 215 Saka, Y., Hagemann, A. I., Piepenburg, O. & Smith, J. C. Nuclear accumulation of Smad complexes occurs only after the midblastula transition in *Xenopus*. *Development* **134**, 4209-4218, (2007).
- 216 Kellermann, S. J., Rath, A. K. & Rentmeister, A. Tetramolecular Fluorescence Complementation for Detection of Specific RNAs in Vitro. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **14**, 200-204, (2013).
- 217 Cabantous, S. *et al.* A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association. *Scientific reports* **3**, 2854, (2013).
- 218 Quenault, T., Lithgow, T. & Traven, A. PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends in cell biology* **21**, 104-112, (2011).
- 219 Wickens, M., Bernstein, D. S., Kimble, J. & Parker, R. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* **18**, 150-157, (2002).
- 220 Zhang, B. *et al.* A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* **390**, 477-484, (1997).
- 221 Zamore, P. D., Williamson, J. R. & Lehmann, R. The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *RNA* **3**, 1421-1433 (1997).
- 222 Sonoda, J. & Wharton, R. P. Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes & development* **13**, 2704-2712 (1999).
- 223 Murata, Y. & Wharton, R. P. Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell* **80**, 747-756, (1995).
- 224 Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5857-5864 (1998).
- 225 Letunic, I., Doerks, T. & Bork, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research* **40**, D302-305, (2012).
- 226 Tam, P. P. *et al.* The Puf family of RNA-binding proteins in plants: phylogeny, structural modeling, activity and subcellular localization. *BMC plant biology* **10**, 44, (2010).

- 227 Wharton, R. P. & Aggarwal, A. K. mRNA regulation by Puf domain proteins. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2006**, pe37, (2006).
- 228 Wreden, C., Verrotti, A. C., Schisa, J. A., Lieberfarb, M. E. & Strickland, S. Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development* **124**, 3015-3023 (1997).
- 229 Gamberi, C., Peterson, D. S., He, L. & Gottlieb, E. An anterior function for the *Drosophila* posterior determinant Pumilio. *Development* **129**, 2699-2710 (2002).
- 230 Cho, P. F. *et al.* Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos. *Current biology : CB* **16**, 2035-2041, (2006).
- 231 Sonoda, J. & Wharton, R. P. *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes & development* **15**, 762-773, (2001).
- 232 Prinz, S., Aldridge, C., Ramsey, S. A., Taylor, R. J. & Galitski, T. Control of signaling in a MAP-kinase pathway by an RNA-binding protein. *PloS one* **2**, e249, (2007).
- 233 Forbes, A. & Lehmann, R. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* **125**, 679-690 (1998).
- 234 Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K. & Kobayashi, S. Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nature cell biology* **1**, 431-437, (1999).
- 235 Crittenden, S. L. *et al.* A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **417**, 660-663, (2002).
- 236 Lamont, L. B., Crittenden, S. L., Bernstein, D., Wickens, M. & Kimble, J. FBF-1 and FBF-2 regulate the size of the mitotic region in the *C. elegans* germline. *Developmental cell* **7**, 697-707, (2004).
- 237 Bachorik, J. L. & Kimble, J. Redundant control of the *Caenorhabditis elegans* sperm/oocyte switch by PUF-8 and FBF-1, two distinct PUF RNA-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10893-10897, (2005).
- 238 Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H. & Wharton, R. P. Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development* **134**, 1519-1527, (2007).
- 239 Lee, M. H. *et al.* Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins. *PLoS genetics* **3**, e233, (2007).
- 240 Dubnau, J. *et al.* The *staufer/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Current biology : CB* **13**, 286-296 (2003).
- 241 Dubnau, J., Chiang, A. S. & Tully, T. Neural substrates of memory: from synapse to system. *Journal of neurobiology* **54**, 238-253, (2003).
- 242 Menon, K. P. *et al.* The translational repressor Pumilio regulates presynaptic morphology and controls postsynaptic accumulation of translation factor eIF-4E. *Neuron* **44**, 663-676, (2004).
- 243 Mee, C. J., Pym, E. C., Moffat, K. G. & Baines, R. A. Regulation of neuronal excitability through pumilio-dependent control of a sodium channel gene. *J Neurosci* **24**, 8695-8703, (2004).
- 244 Ye, B. *et al.* Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons. *Current biology : CB* **14**, 314-321, (2004).

- 245 Vessey, J. P. *et al.* Mammalian Pumilio 2 regulates dendrite morphogenesis and synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3222-3227, (2010).
- 246 Muraro, N. I. *et al.* Pumilio binds para mRNA and requires Nanos and Brat to regulate sodium current in *Drosophila* motoneurons. *J Neurosci* **28**, 2099-2109, (2008).
- 247 Seay, D., Hook, B., Evans, K. & Wickens, M. A three-hybrid screen identifies mRNAs controlled by a regulatory protein. *RNA* **12**, 1594-1600, (2006).
- 248 Traven, A., Lo, T. L., Lithgow, T. & Heierhorst, J. The yeast PUF protein Puf5 has Pop2-independent roles in response to DNA replication stress. *PLoS one* **5**, e10651, (2010).
- 249 Garcia-Rodriguez, L. J., Gay, A. C. & Pon, L. A. Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *The Journal of cell biology* **176**, 197-207, (2007).
- 250 Saint-Georges, Y. *et al.* Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS one* **3**, e2293, (2008).
- 251 Eliyahu, E. *et al.* Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Molecular and cellular biology* **30**, 284-294, (2010).
- 252 Kershner, A. M. & Kimble, J. Genome-wide analysis of mRNA targets for *Caenorhabditis elegans* FBF, a conserved stem cell regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3936-3941, (2010).
- 253 Pique, M., Lopez, J. M., Foissac, S., Guigo, R. & Mendez, R. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell* **132**, 434-448, (2008).
- 254 Suh, N. *et al.* FBF and Its Dual Control of *gld-1* Expression in the *Caenorhabditis elegans* Germline. *Genetics* **181**, 1249-1260, (2009).
- 255 Kaye, J. A., Rose, N. C., Goldsworthy, B., Goga, A. & L'Etoile, N. D. A 3' UTR Pumilio-Binding Element Directs Translational Activation in Olfactory Sensory Neurons. *Neuron* **61**, 57-70, (2009).
- 256 Archer, S. K., Luu, V. D., de Queiroz, R. A., Brems, S. & Clayton, C. *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. *PLoS pathogens* **5**, e1000565, (2009).
- 257 Gu, W., Deng, Y. F., Zenklusen, D. & Singer, R. H. A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes & development* **18**, 1452-1465, (2004).
- 258 Zipor, G. *et al.* Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19848-19853, (2009).
- 259 Chritton, J. J. & Wickens, M. Translational repression by PUF proteins in vitro. *RNA* **16**, 1217-1225, (2010).
- 260 Goldstrohm, A. C., Hook, B. A., Seay, D. J. & Wickens, M. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nature structural & molecular biology* **13**, 533-539, (2006).
- 261 Goldstrohm, A. C., Seay, D. J., Hook, B. A. & Wickens, M. PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p. *The Journal of biological chemistry* **282**, 109-114, (2007).

- 262 Lee, D. *et al.* PUF3 acceleration of deadenylation in vivo can operate independently of CCR4 activity, possibly involving effects on the PAB1-mRNP structure. *J Mol Biol* **399**, 562-575, (2010).
- 263 Tucker, M. *et al.* The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**, 377-386 (2001).
- 264 Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, D. A. & Jacobson, A. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* **453**, 1276-1280, (2008).
- 265 Goldstrohm, A. C. & Wickens, M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 337-344, (2008).
- 266 Preiss, T., Muckenthaler, M. & Hentze, M. W. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control. *RNA* **4**, 1321-1331 (1998).
- 267 Collier, J. & Parker, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**, 875-886, (2005).
- 268 Maillet, L. & Collart, M. A. Interaction between Not1p, a component of the Ccr4-not complex, a global regulator of transcription, and Dhh1p, a putative RNA helicase. *The Journal of biological chemistry* **277**, 2835-2842, (2002).
- 269 Chagnovich, D. & Lehmann, R. Poly(A)-independent regulation of maternal hunchback translation in the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11359-11364, (2001).
- 270 Hook, B. A., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *The Journal of biological chemistry* **282**, 15430-15438, (2007).
- 271 Cho, P. F. *et al.* A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* **121**, 411-423, (2005).
- 272 Cao, Q., Padmanabhan, K. & Richter, J. D. Pumilio 2 controls translation by competing with eIF4E for 7-methyl guanosine cap recognition. *RNA* **16**, 221-227, (2010).
- 273 Kedde, M. *et al.* A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. *Nature cell biology* **12**, 1014-1020, (2010).
- 274 Nolde, M. J., Saka, N., Reinert, K. L. & Slack, F. J. The *Caenorhabditis elegans* pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1. *Developmental biology* **305**, 551-563, (2007).
- 275 Galgano, A. *et al.* Comparative Analysis of mRNA Targets for Human PUF Family Proteins Suggests Extensive Interaction with the miRNA Regulatory System. *PloS one* **3**, 16, (2008).
- 276 Tautz, D. Regulation of the *Drosophila* segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres. *Nature* **332**, 281-284, (1988).
- 277 Barker, D. D., Wang, C., Moore, J., Dickinson, L. K. & Lehmann, R. Pumilio is essential for function but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant Nanos. *Genes & development* **6**, 2312-2326 (1992).
- 278 Wang, C., Dickinson, L. K. & Lehmann, R. Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **199**, 103-115, (1994).

- 279 Curtis, D. *et al.* A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. *Embo Journal* **16**, 834-843, (1997).
- 280 Curtis, D., Apfeld, J. & Lehmann, R. nanos is an evolutionarily conserved organizer of anterior-posterior polarity. *Development* **121**, 1899-1910 (1995).
- 281 Wang, C. & Lehmann, R. Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila. *Cell* **66**, 637-647 (1991).
- 282 Kraemer, B. *et al.* NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in Caenorhabditis elegans. *Current biology : CB* **9**, 1009-1018 (1999).
- 283 Nakahata, S. *et al.* Biochemical identification of Xenopus Pumilio as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **276**, 20945-20953, (2001).
- 284 Lai, F., Zhou, Y., Luo, X., Fox, J. & King, M. L. Nanos1 functions as a translational repressor in the Xenopus germline. *Mechanisms of Development* **128**, 153-163, (2011).
- 285 Spassov, D. S. & Jurecic, R. Cloning and comparative sequence analysis of PUM1 and PUM2 genes, human members of the Pumilio family of RNA-binding proteins. *Gene* **299**, 195-204, (2002).
- 286 Moore, F. L. *et al.* Human Pumilio-2 is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 538-543, (2003).
- 287 Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer, B., Kimble, J. & Wickens, M. CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in C. elegans. *Genes & development* **14**, 2596-2609 (2000).
- 288 Wang, X., Zamore, P. D. & Hall, T. M. Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Molecular cell* **7**, 855-865, (2001).
- 289 Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P. D. & Hall, T. M. Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* **110**, 501-512 (2002).
- 290 Edwards, T. A., Trincao, J., Escalante, C. R., Wharton, R. P. & Aggarwal, A. K. Crystallization and characterization of Pumilo: a novel RNA binding protein. *J Struct Biol* **132**, 251-254, (2000).
- 291 Main, E. R., Jackson, S. E. & Regan, L. The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 482-489 (2003).
- 292 Forrer, P., Binz, H. K., Stumpp, M. T. & Pluckthun, A. Consensus design of repeat proteins. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **5**, 183-189, (2004).
- 293 Main, E. R., Lowe, A. R., Mochrie, S. G., Jackson, S. E. & Regan, L. A recurring theme in protein engineering: the design, stability and folding of repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 464-471, (2005).
- 294 Cheong, C. G. & Hall, T. M. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13635-13639, (2006).
- 295 Bernstein, D., Hook, B., Hajarnavis, A., Opperman, L. & Wickens, M. Binding specificity and mRNA targets of a C. elegans PUF protein, FBF-1. *RNA* **11**, 447-458, (2005).
- 296 Gerber, A. P., Herschlag, D. & Brown, P. O. Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS biology* **2**, E79, (2004).

- 297 Macdonald, P. M. The *Drosophila pumilio* gene: an unusually long transcription unit and an unusual protein. *Development* **114**, 221-232 (1992).
- 298 Opperman, L., Hook, B., DeFino, M., Bernstein, D. S. & Wickens, M. A single spacer nucleotide determines the specificities of two mRNA regulatory proteins. *Nature structural & molecular biology* **12**, 945-951, (2005).
- 299 Stumpf, C. R., Kimble, J. & Wickens, M. A *Caenorhabditis elegans* PUF protein family with distinct RNA binding specificity. *RNA* **14**, 1550-1557, (2008).
- 300 Dong, S. *et al.* Specific and Modular Binding Code for Cytosine Recognition in Pumilio/FBF (PUF) RNA-binding Domains. *The Journal of biological chemistry* **286**, 26732-26742, (2011).
- 301 Filipovska, A., Razif, M. F., Nygard, K. K. & Rackham, O. A universal code for RNA recognition by PUF proteins. *Nature chemical biology* **7**, 425-427, (2011).
- 302 Lu, G. & Hall, T. M. T. Alternate Modes of Cognate RNA Recognition by Human PUMILIO Proteins. *Structure* **19**, 361-367, (2011).
- 303 Koh, Y. Y. *et al.* Stacking interactions in PUF-RNA complexes. *RNA* **17**, 718-727, (2011).
- 304 Gupta, Y. K., Nair, D. T., Wharton, R. P. & Aggarwal, A. K. Structures of human Pumilio with noncognate RNAs reveal molecular mechanisms for binding promiscuity. *Structure* **16**, 549-557, (2008).
- 305 Wang, Y., Cheong, C. G., Hall, T. M. & Wang, Z. Engineering splicing factors with designed specificities. *Nature methods* **6**, 825-830, (2009).
- 306 Miller, M. T., Higgin, J. J. & Hall, T. M. Basis of altered RNA-binding specificity by PUF proteins revealed by crystal structures of yeast Puf4p. *Nature structural & molecular biology* **15**, 397-402, (2008).
- 307 Ryder, S. P. Pumilio RNA Recognition: The Consequence of Promiscuity. *Structure* **19**, 277-279 (2011).
- 308 Zhu, D., Stumpf, C. R., Krahn, J. M., Wickens, M. & Hall, T. M. A 5' cytosine binding pocket in Puf3p specifies regulation of mitochondrial mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20192-20197, (2009).
- 309 Choudhury, R., Tsai, Y. S., Dominguez, D., Wang, Y. & Wang, Z. Engineering RNA endonucleases with customized sequence specificities. *Nature communications* **3**, 1147, (2012).
- 310 Wang, Y., Opperman, L., Wickens, M. & Hall, T. M. Structural basis for specific recognition of multiple mRNA targets by a PUF regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20186-20191, (2009).
- 311 SenGupta, D. J. *et al.* A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8496-8501 (1996).
- 312 Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B. & Wickens, M. RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA* **11**, 227-233, (2005).
- 313 Causier, B. & Davies, B. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant molecular biology* **50**, 855-870 (2002).
- 314 Lu, G., Dolgner, S. J. & Hall, T. M. Understanding and engineering RNA sequence specificity of PUF proteins. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 110-115, (2009).

- 315 Cooke, A., Prigge, A., Opperman, L. & Wickens, M. Targeted translational regulation using the PUF protein family scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011).
- 316 Morris, A. R., Mukherjee, N. & Keene, J. D. Ribonomic analysis of human Pum1 reveals cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets. *Molecular and cellular biology* **28**, 4093-4103, (2008).
- 317 Kellermann, S. J. *Etablierung einer Methode zur Detektion von RNA in vitro basierend auf Split-GFP und Pumilio*, Universität Hamburg, (2012).
- 318 Pieken, W. A., Olsen, D. B., Benseker, F., Aurup, H. & Eckstein, F. Kinetic Characterization of Ribonuclease-Resistant 2'-Modified Hammerhead Ribozymes. *Science* **253**, 314-317, (1991).
- 319 Mutas, M. *Nachweis von in vivo produzierter RNA mittels Pumilio und Split-GFP.*, Universität Hamburg, (2013).
- 320 Mironov, A. S. *et al.* Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**, 747-756 (2002).
- 321 Winkler, W., Nahvi, A. & Breaker, R. R. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**, 952-956, (2002).
- 322 Nahvi, A. *et al.* Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & biology* **9**, 1043 (2002).
- 323 Wahl, M. C., Will, C. L. & Luhrmann, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-718, (2009).
- 324 Mitra, K. & Frank, J. Ribosome dynamics: insights from atomic structure modeling into cryo-electron microscopy maps. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **35**, 299-317, (2006).
- 325 Carafa, Y. D., Brody, E. & Thermes, C. Prediction of Rho-Independent Escherichia-Coli Transcription Terminators - a Statistical-Analysis of Their Rna Stem-Loop Structures. *J Mol Biol* **216**, 835-858, (1990).
- 326 von Hippel, P. H. & Yager, T. D. Transcript elongation and termination are competitive kinetic processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2307-2311 (1991).
- 327 Han, H. & Dervan, P. B. Sequence-specific recognition of double helical RNA and RNA.DNA by triple helix formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3806-3810 (1993).
- 328 Narberhaus, F., Waldminghaus, T. & Chowdhury, S. RNA thermometers. *FEMS microbiology reviews* **30**, 3-16, (2006).
- 329 Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**, 3406-3415 (2003).
- 330 Kibbe, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research* **35**, W43-46, (2007).
- 331 Montange, R. K. & Batey, R. T. Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Annual review of biophysics* **37**, 117-133, (2008).

- 332 Lu, C. *et al.* Crystal structures of the SAM-III/S(MK) riboswitch reveal the SAM-dependent translation inhibition mechanism. *Nature structural & molecular biology* **15**, (2008).
- 333 Batey, R. T., Gilbert, S. D. & Montange, R. K. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* **432**, 411-415, (2004).
- 334 Paige, J. S., Nguyen-Duc, T., Song, W. & Jaffrey, S. R. Fluorescence imaging of cellular metabolites with RNA. *Science* **335**, 1194, (2012).
- 335 Andou, T., Endoh, T., Mie, M. & Kobatake, E. Development of an RNA detection system using bioluminescence resonance energy transfer. *Sensors and Actuators B: Chemical* **152**, 277-284, (2011).
- 336 Rothmund, P. W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **440**, 297-302, (2006).
- 337 Kenwrick, S., Watkins, A. & De Angelis, E. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Human molecular genetics* **9**, 879-886 (2000).
- 338 Thelen, K. *et al.* The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* **22**, 4918-4931 (2002).
- 339 Loers, G. *et al.* The interaction between cell adhesion molecule L1, matrix metalloproteinase 14, and adenine nucleotide translocator at the plasma membrane regulates L1-mediated neurite outgrowth of murine cerebellar neurons. *J Neurosci* **32**, 3917-3930, (2012).
- 340 Buhusi, M., Schlatter, M. C., Demyanenko, G. P., Thresher, R. & Maness, P. F. L1 interaction with ankyrin regulates mediolateral topography in the retinocollicular projection. *J Neurosci* **28**, 177-188, (2008).
- 341 Meier, F. *et al.* The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **119**, 549-555, (2006).
- 342 Eberwine, J., Miyashiro, K., Kacharina, J. E. & Job, C. Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7080-7085, (2001).
- 343 Conze, T. *et al.* Single molecule analysis of combinatorial splicing. *Nucleic acids research* **38**, e163, (2010).
- 344 Wang, E. T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470-476, (2008).
- 345 Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. & Blencowe, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics* **40**, 1413-1415, (2008).
- 346 Kammler, S. *et al.* The strength of the HIV-1 3' splice sites affects Rev function. *Retrovirology* **3**, 89, (2006).
- 347 Stoltzfus, C. M. & Madsen, J. M. Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr HIV Res* **4**, 43-55, (2006).
- 348 Karn, J. & Stoltzfus, C. M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006916, (2012).

- 349 Cullen, B. R. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in biochemical sciences* **28**, 419-424, (2003).
- 350 Perrin, F. Polarisation de la Lumière de Fluorescence. *Journal de Physique* **7**, 390-401 (1926).
- 351 Griffin, B. A., Adams, S. R., Jones, J. & Tsien, R. Y. Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FAsH. *Methods in enzymology* **327**, 565-578 (2000).
- 352 Griffin, B. A., Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269-272 (1998).
- 353 Cabantous, S. & Waldo, G. S. In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP. *Nature methods* **3**, 845-854, (2006).
- 354 Hashimoto, H. *et al.* Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. *EMBO reports* **11**, 848-853, (2010).
- 355 Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400, (2008).
- 356 Studier, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**, 37-44 (1991).
- 357 Patra, A. *et al.* 2'-Fluoro RNA shows increased Watson-Crick H-bonding strength and stacking relative to RNA: evidence from NMR and thermodynamic data. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 11863-11866, (2012).
- 358 Pallan, P. S. *et al.* Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA. *Nucleic acids research* **39**, 3482-3495, (2011).
- 359 Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* **326**, (2009).
- 360 Boch, J. *et al.* Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* **326**, 1509-1512, (2009).
- 361 Yang, B., Zhu, W. G., Johnson, L. B. & White, F. F. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9807-9812, (2000).
- 362 Boch, J. & Bonas, U. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 419-436, (2010).
- 363 Scholze, H. & Boch, J. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr Opin Microbiol* **14**, 47-53, (2011).
- 364 Miller, J. C. *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotech* **29**, 143-148, (2011).
- 365 Christian, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761, (2010).
- 366 Hockemeyer, D. *et al.* Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature biotechnology* **29**, 731-734, (2011).
- 367 Tesson, L. *et al.* Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature biotechnology* **29**, 695-696, (2011).

- 368 Li, L. *et al.* Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant molecular biology* **78**, 407-416, (2012).
- 369 Mahfouz, M. M. *et al.* Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. *Plant molecular biology* **78**, 311-321, (2012).
- 370 Wood, A. J. *et al.* Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* **333**, 307, (2011).
- 371 Huang, P. *et al.* Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature biotechnology* **29**, 699-700, (2011).
- 372 Sander, J. D. *et al.* Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature biotechnology* **29**, 697-698, (2011).
- 373 Mercer, A. C., Gaj, T., Fuller, R. P. & Barbas, C. F., 3rd. Chimeric TALE recombinases with programmable DNA sequence specificity. *Nucleic acids research* **40**, 11163-11172, (2012).
- 374 Zimyanin, V. L. *et al.* In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* **134**, 843-853, (2008).
- 375 Weil, T. T., Parton, R., Davis, I. & Gavis, E. R. Changes in bicoid mRNA anchoring highlight conserved mechanisms during the oocyte-to-embryo transition. *Current biology : CB* **18**, 1055-1061, (2008).
- 376 Reid, B. G. & Flynn, G. C. Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. *Biochemistry* **36**, 6786-6791, (1997).
- 377 Greenberg, J. R. Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic acids research* **6**, 715-732 (1979).
- 378 Ule, J. *et al.* CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**, 1212-1215, (2003).
- 379 Kraynov, V. S. *et al.* Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* **290**, 333-337 (2000).
- 380 Kobitski, A. Y. *et al.* Single-molecule FRET studies of RNA folding: a Diels-Alderase ribozyme with photolabile nucleotide modifications. *The journal of physical chemistry. B* **117**, 12800-12806, (2013).
- 381 Karunatilaka, K. S. & Rueda, D. Post-transcriptional modifications modulate conformational dynamics in human U2-U6 snRNA complex. *RNA* **20**, 16-23, (2014).
- 382 Keller, B. G., Kobitski, A. Y., Jaeschke, A., Nienhaus, G. U. & Noé, F. Complex RNA folding kinetics revealed by single molecule FRET and hidden Markov models. *Journal of the American Chemical Society*, (2014).
- 383 Subach, F. V. *et al.* Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. *Nature chemical biology* **5**, 118-126, (2009).
- 384 Khmelinskii, A. *et al.* Tandem fluorescent protein timers for in vivo analysis of protein dynamics. *Nature biotechnology* **30**, 708-714, (2012).
- 385 Laboria, N., Wieneke, R. & Tampe, R. Control of nanomolar interaction and in situ assembly of proteins in four dimensions by light. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**, 848-853, (2013).

- 386 Reining, A. *et al.* Three-state mechanism couples ligand and temperature sensing in riboswitches. *Nature* **499**, 355-359, (2013).
- 387 Lusvardi, S. *et al.* The HIV-2 Rev-response element: determining secondary structure and defining folding intermediates. *Nucleic acids research* **41**, 6637-6649, (2013).
- 388 Ritchie, D. B., Soong, J., Sikkema, W. K. A. & Woodside, M. T. Anti-frameshifting Ligand Reduces the Conformational Plasticity of the SARS Virus Pseudoknot. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 2196-2199, (2014).
- 389 Jiang, Z., Cote, J., Kwon, J. M., Goate, A. M. & Wu, J. Y. Aberrant splicing of tau pre-mRNA caused by intronic mutations associated with the inherited dementia frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17. *Molecular and cellular biology* **20**, 4036-4048 (2000).
- 390 Biffi, G., Di Antonio, M., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nat Chem* **6**, 75-80, (2014).
- 391 Mortimer, S. A. & Weeks, K. M. A fast-acting reagent for accurate analysis of RNA secondary and tertiary structure by SHAPE chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 4144-4145, (2007).
- 392 Deigan, K. E., Li, T. W., Mathews, D. H. & Weeks, K. M. Accurate SHAPE-directed RNA structure determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 97-102, (2009).
- 393 Wilkinson, K. A., Merino, E. J. & Weeks, K. M. RNA SHAPE chemistry reveals nonhierarchical interactions dominate equilibrium structural transitions in tRNA(Asp) transcripts. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4659-4667, (2005).
- 394 Merino, E. J., Wilkinson, K. A., Coughlan, J. L. & Weeks, K. M. RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4223-4231, (2005).
- 395 Weeks, K. M. Advances in RNA structure analysis by chemical probing. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 295-304, (2010).
- 396 Mathews, D. H. *et al.* Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7287-7292, (2004).
- 397 Tijerina, P., Mohr, S. & Russell, R. DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes. *Nature protocols* **2**, 2608-2623, (2007).
- 398 Fritz, J. J. *et al.* Development of hammerhead ribozymes to modulate endogenous gene expression for functional studies. *Methods* **28**, 276-285 (2002).
- 399 Ehresmann, C. *et al.* Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic acids research* **15**, 9109-9128 (1987).
- 400 Lavery, R. & Pullman, A. A new theoretical index of biochemical reactivity combining steric and electrostatic factors. An application to yeast tRNA<sup>Phe</sup>. *Biophysical chemistry* **19**, 171-181 (1984).
- 401 Karaduman, R., Fabrizio, P., Hartmuth, K., Urlaub, H. & Luhrmann, R. RNA structure and RNA-protein interactions in purified yeast U6 snRNPs. *J Mol Biol* **356**, 1248-1262, (2006).

- 402 Tullius, T. D. & Greenbaum, J. A. Mapping nucleic acid structure by hydroxyl radical cleavage. *Current opinion in chemical biology* **9**, 127-134, (2005).
- 403 Gopinath, S. C. Mapping of RNA-protein interactions. *Analytica chimica acta* **636**, 117-128, (2009).
- 404 Mulhbachter, J. & Lafontaine, D. A. Ligand recognition determinants of guanine riboswitches. *Nucleic acids research* **35**, 5568-5580, (2007).
- 405 Regulski, E. E. & Breaker, R. R. In-line probing analysis of riboswitches. *Methods Mol Biol* **419**, 53-67, (2008).
- 406 Furtig, B., Richter, C., Wohnert, J. & Schwalbe, H. NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **4**, 936-962, (2003).
- 407 Freifelder, D. & Davison, P. F. Hyperchromicity and strand separation in bacterial DNA. *Biophys J* **2**, 249-256 (1962).
- 408 Kypr, J., Kejnovska, I., Renciuik, D. & Vorlickova, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic acids research* **37**, 1713-1725, (2009).
- 409 Vorlickova, M. *et al.* Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods* **57**, 64-75, (2012).
- 410 Watson, J. D. & Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738 (1953).
- 411 Zhao, R. & Rueda, D. RNA folding dynamics by single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **49**, 112-117, (2009).
- 412 Zhao, C. J. *et al.* Conformational heterogeneity of the protein-free human spliceosomal U2-U6 snRNA complex. *Rna-a Publication of the Rna Society* **19**, 561-573, (2013).
- 413 Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G. & Barkan, A. Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2010).
- 414 Wilusz, J. E. *et al.* A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes & development* **26**, 2392-2407, (2012).
- 415 Collie, G. W., Haider, S. M., Neidle, S. & Parkinson, G. N. A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex. *Nucleic acids research* **38**, 5569-5580, (2010).
- 416 Egea, P. F., Stroud, R. M. & Walter, P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Current opinion in structural biology* **15**, 213-220, (2005).
- 417 Henras, A. K., Dez, C. & Henry, Y. RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Current opinion in structural biology* **14**, 335-343, (2004).
- 418 Yip, W. S., Vincent, N. G. & Baserga, S. J. Ribonucleoproteins in archaeal pre-rRNA processing and modification. *Archaea* **2013**, 614735, (2013).
- 419 Cech, T. R. Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* **116**, 273-279 (2004).
- 420 Gilson, E. & Geli, V. How telomeres are replicated. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 825-838, (2007).
- 421 Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349, (2004).
- 422 Jinek, M. & Doudna, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**, 405-412 (2009).

- 423 Cech, T. R. The efficiency and versatility of catalytic RNA: implications for an RNA world. *Gene* **135**, 33-36 (1993).
- 424 Altman, S. Nobel lecture. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Bioscience reports* **10**, 317-337 (1990).
- 425 Valadkhan, S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Current opinion in chemical biology* **9**, 603-608, (2005).
- 426 Byrne, E. M., Connell, G. J. & Simpson, L. Guide RNA-directed uridine insertion RNA editing in vitro. *The EMBO journal* **15**, 6758-6765 (1996).
- 427 Wassarman, D. A. & Steitz, J. A. Interactions of small nuclear RNA's with precursor messenger RNA during in vitro splicing. *Science* **257**, 1918-1925 (1992).
- 428 Lourenco, S. & Roy, P. In vitro reconstitution of Bluetongue virus infectious cores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13746-13751, (2011).
- 429 Yunus, M. & Shaila, M. S. Establishment of an in vitro transcription system for Peste des petits ruminant virus. *Virology journal* **9**, 302, (2012).
- 430 Hirose, T., Shu, M. D. & Steitz, J. A. Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells. *Molecular cell* **12**, 113-123 (2003).
- 431 Qiao, F. & Cech, T. R. Triple-helix structure in telomerase RNA contributes to catalysis. *Nature structural & molecular biology* **15**, 634-640, (2008).
- 432 Lebo, K. J. & Zappulla, D. C. Stiffened yeast telomerase RNA supports RNP function in vitro and in vivo. *RNA* **18**, 1666-1678, (2012).
- 433 Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823, (2013).
- 434 Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823-826, (2013).
- 435 Yang, H. *et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **154**, 1370-1379, (2013).
- 436 Dubel, S. Reconstitution of human pancreatic RNase from two separate fragments fused to different single chain antibody fragments: On the way to binary immunotoxins. *Tumor Target* **4**, 37-46 (1999).
- 437 Sancho, J. & Fersht, A. R. Dissection of an Enzyme by Protein Engineering - the N-Terminal and C-Terminal Fragments of Barnase Form a Native-Like Complex with Restored Enzymatic-Activity. *J Mol Biol* **224**, 741-747, (1992).
- 438 Remy, I., Campbell-Valois, F. X. & Michnick, S. W. Detection of protein-protein interactions using a simple survival protein-fragment complementation assay based on the enzyme dihydrofolate reductase. *Nature protocols* **2**, 2120-2125, (2007).
- 439 Remy, I., Ghaddar, G. & Michnick, S. W. Using the beta-lactamase protein-fragment complementation assay to probe dynamic protein-protein interactions. *Nature protocols* **2**, 2302-2306, (2007).
- 440 Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L. E. & Michnick, S. W. beta-Lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein-protein interactions. *Nature biotechnology* **20**, 619-622, (2002).

- 441 Pelletier, J. N., Campbell-Valois, F. X. & Michnick, S. W. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12141-12146, (1998).
- 442 Stroffekova, K., Proenza, C. & Beam, K. G. The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **442**, 859-866 (2001).
- 443 Nazarenko, I. *et al.* Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic acids research* **30**, e37 (2002).
- 444 Nazarenko, I., Pires, R., Lowe, B., Obaidy, M. & Rashtchian, A. Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic acids research* **30**, 2089-2195 (2002).
- 445 Seidel, C. A. M., Schulz, A. & Sauer, M. H. M. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. *The Journal of Physical Chemistry* **100**, 5541-5553, (1996).
- 446 Horn, T., Chang, C. A. & Urdea, M. S. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. *Nucleic acids research* **25**, 4842-4849 (1997).
- 447 Narayanan, M. *et al.* Differential fluorescence quenching of fluorescent nucleic acid base analogues by native nucleic acid monophosphates. *The journal of physical chemistry. B* **114**, 5953-5963, (2010).
- 448 Harper, S. & Speicher, D. W. Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase. *Protein Chromatography: Methods and Protocols* **681**, 259-280 (2011).
- 449 Maurer, J., Jose, J. & Meyer, T. F. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **179**, 794-804 (1997).
- 450 Owicki, J. C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer. *Journal of biomolecular screening* **5**, 297-306 (2000).
- 451 Spagnuolo, C. C., Vermeij, R. J. & Jares-Erijman, E. A. Improved photostable FRET-competent biarsenical-tetracysteine probes based on fluorinated fluoresceins. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 12040-12041, (2006).
- 452 Magde, D., Elson, E. & Webb, W. W. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters* **29**, 705-708 (1972).
- 453 Capoulade, J., Wachsmuth, M., Hufnagel, L. & Knop, M. Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells. *Nature biotechnology* **29**, 835-842, (2011).
- 454 Schwille, P., Meyer-Almes, F. J. & Rigler, R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J* **72**, 1878-1886, (1997).
- 455 Bacia, K., Kim, S. A. & Schwille, P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nature methods* **3**, 83-89, (2006).

- 456 Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J. & Herzenberg, L. A. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* **166**, 747-749 (1969).
- 457 Do, K. & Boxer, S. G. GFP Variants with Alternative  $\beta$ -Strands and Their Application as Light-driven Protease Sensors: A Tale of Two Tails. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 10226-10229, (2013).
- 458 Valente, L. & Nishikura, K. ADAR gene family and A-to-I RNA editing: diverse roles in posttranscriptional gene regulation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **79**, 299-338, (2005).
- 459 Luciano, D. J., Mirsky, H., Vendetti, N. J. & Maas, S. RNA editing of a miRNA precursor. *RNA* **10**, 1174-1177, (2004).
- 460 Doria, M., Neri, F., Gallo, A., Farace, M. G. & Michienzi, A. Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection. *Nucleic acids research* **37**, 5848-5858, (2009).
- 461 Paz, N. *et al.* Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome research* **17**, 1586-1595, (2007).
- 462 Bulina, M. E. *et al.* A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotech* **24**, 95-99, (2006).
- 463 Kapust, R. B. *et al.* Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein engineering* **14**, 993-1000 (2001).
- 464 Urban, J. H. & Vogel, J. Translational control and target recognition by Escherichia coli small RNAs in vivo. *Nucleic acids research* **35**, 1018-1037, (2007).
- 465 Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* **16**, 6127-6145 (1988).
- 466 Miyazaki, K. & Takenouchi, M. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid. *BioTechniques* **33**, 1033-1034, 1036-1038 (2002).

## **9. Anhang**

### **9.1. Entsorgung**

Die Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden entsprechend ihrer H- und P-Sätze (siehe 9.2) gehandhabt und gemäß der Gefahrgutverordnung entsorgt.

Lösungsmittel sowie kontaminierte Betriebsmittel wurden in entsprechend gekennzeichneten Behältern gesammelt und Ethidiumbromidabfälle getrennt entsorgt.

Mit gentechnisch veränderten Organismen kontaminierter Abfall wurde gemäß dem Gentechnikgesetz vor der Entsorgung unter 5 bar Druck für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

## 9.2. Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS

In der nachfolgenden Tabelle sind Reagenzien und Lösungsmittel aufgelistet, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, und mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen gemäß §6 der Gefahrstoffverordnung versehen waren.

**Tabelle 9.1: Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS**

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	 	301-312-315-317- 319-332-340-350- 361f-372	201-280-302+352- 305+ 351 +338
Ampicillin	 	315-317-319-334- 335	261-280- 305+351+338-342-311
APS	  	272-302-315-317- 319-334-335	280-305+351+338- 302+352-304+341- 342+311
Bisacrylamid		302	
DTT		302-315-319	302+352-305+351+338
EDT	 	226-301-310-330	210-271-280-309+310-304+340-302+352
EDTA		319	305-351-338
Ethanol		225	210
Ethidiumbromid	 	332-341	281-308+313
FLAsH	 	331-301-410	
Formaldehyd	  	301-311-314-317-351	301+310-303+361+353-305+351+338-361-405-505
Formamid		360D	308+313
Imidazol	  	302-314-361d	280-301+330+331-305+ 351+338
Isopropanol	 	225-319-326	210-233- 305+351+338

Tabelle wird fortgesetzt.

**Fortsetzung Tabelle 8.1**

Kanamycinsulfat		360	201-308+313
MOPS		315-335-319	261-280-302+352
NaOH		314-290	280-301+330+331- 305+ 351+338
Nickelsulfat		350i-341360D-372- 332- 302-315-334-317- 410	201-280-273- 308+313-342+311- 302+352
Nickel-NTA- Agarose		226-317-373	210-233-261-272- 280-302+352- 333+313-363-403+ 235
Phenol		331-301-311-314-341- 373	280-302+352- 301+330+331-309- 310-305+351+338
PMSF		301-314	280-305+351+338-310
Salzsäure		290-314-335	280-301+330+331- 305+351+338
SDS		228-311-302-335-315- 319	210-280-304+340- 305+351+338- 309+310
TEMED		225-302-314-332	210-233-280- 301+330+331- 305+351+338
Trichlormethan		302-315-351-373	302+352-314
TRIS		315-319-335	261-305+351+338

### 9.3. Plasmidsequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzen der, im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, Plasmide aufgeführt. Der kodierende Bereich innerhalb der Plasmide wurde unterstrichen. Für den pET22b+ Vektor, welcher für mehrere Pumilio Konstrukte verwendet wurde, ist nur für das erste Plasmid die gesamte Sequenz dargestellt. Für die folgenden Plasmide ist nur der kodierende Bereich zwischen den NdeI und XhoI Schnittstellen aufgeführt. Für die pSK17-Hb-boxAB bzw. -boxAC Plasmide ist der Bereich zwischen den Schnittstellen NheI und XbaI unterstrichen, welcher den eingefügten Bereich für das entsprechende Transkript enthält.

#### pET22b+HsPumHD

```

1  TATGGGCCGC AGCCGCCTTT TGGAAGATTT TCGAAACAAC CGGTACCCCA
51  ATTTACAAC TCGGGAGATT GCTGGACATA TAATGGAATT TTCCAAGAC
101 CAGCATGGGT CCAGATTCAT TCAGCTGAAA CTGGAGCGTG CCACACCAGC
151 TGAGCGCCAG CTTGTCTTCA ATGAAATCCT CCAGGCTGCC TACCAACTCA
201 TGGTGGATGT GTTTGGTAAT TACGTCATTC AGAAGTTCTT TGAATTTGGC
251 AGTCTTGAAC AGAAGCTGGC TTTGGCAGAA CGGATTCGAG GCCACGTCCT
301 GTCATTGGCA CTACAGATGT ATGGCTGCCG TGTATCCAG AAAGCTCTTG
351 AGTTTATTCC TTCAGACCAG CAGAATGAGA TGGTTCGGGA ACTAGATGGC
401 CATGTCTTGA AGTGTGTGAA AGATCAGAAT GGCAATCACG TGGTTCAGAA
451 ATGCATTGAA TGTGTACAGC CCCAGTCTTT GCAATTTATC ATCGATGCGT
501 TTAAGGGACA GGTATTTGCC TTATCCACAC ATCCTTATGG CTGCCGAGTG
551 ATTCAGAGAA TCCTGGAGCA CTGTCTCCCT GACCAGACAC TCCCTATTTT
601 AGAGGAGCTT CACCAGCACA CAGAGCAGCT TGTACAGGAT CAATATGGAA
651 ATTATGTAAT CCAACATGTA CTGGAGCACG GTCGTCCTGA GGATAAAAGC
701 AAAATTGTAG CAGAAATCCG AGGCAATGTA CTTGTATTGA GTCAGACAAA
751 ATTTGCAAGC AATGTTGTGG AGAAGTGTGT TACTCACGCC TCACGTACGG
801 AGCGCGCTGT GTCATCGAT GAGGTGTGCA CCATGAACGA CGGTCCCCAC
851 AGTGCCTTAT ACACCATGAT GAAGGACCAG TATGCCAACT ACGTGGTCCA
901 GAAGATGATT GACGTGGCGG AGCCAGGCCA GCGGAAGATC GTCATGCATA
951 AGATCCGGCC CCACATCGCA ACTCTTCGTA AGTACACCTA TGGCAAGCAC
1001 ATTCTGGCCA AGCTGGAGAA GTACTACATG AAGAACGGTG TTGACTTAGG
1051 GCTCGAGCAC CACCACCACC ACCACTGAGA TCCGGCTGCT AACAAAAGCC
1101 GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA
1151 CCCCTTGGGG CCTCTAAACG GGTCTTGAGG GGTTTTTTGC TGAAAGGAGG
1201 AACTATATCC GGATTCTTTT CTTTGGCGAA TGGGACGCGC CCTGTAGCGG
1251 CGCATTAAAG CCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC
1301 TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTTC CTTTCTTCCC TTCTTTCTC
1351 GCCACGTTTC CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GGCTCCCTTT
1401 AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCCAAA AAACCTTGATT ->

```

ANHANG

1451 AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTTCGC  
1501 CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC  
1551 TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA  
1601 TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA  
1651 TTTAACGCGA ATTTTAACAA AATATTAACG TTTACAATTT CAGGTGGCAC  
1701 TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC  
1751 ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT AACCCTGATA AATGCTTCAA  
1801 TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT CAACATTTCC GTGTCGCCCT  
1851 TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC TGTTTTTGCT CACCCAGAAA  
1901 CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT  
1951 TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTTCGCC  
2001 CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTGGCG  
2051 CGGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG AGCAACTCGG TCGCCGATA  
2101 CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC TCACCAGTCA CAGAAAAGCA  
2151 TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT ATGCAGTGCT GCCATAACCA  
2201 TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC TGACAACGAT CGGAGGACCG  
2251 AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG GGGGATCATG TAACTCGCCT  
2301 TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC CATACCAAAC GACGAGCGTG  
2351 ACACCACGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA CGTTGCGCAA ACTATTAACT  
2401 GGCGAACTAC TTA CTCTAGC TTCCC GGCAA CAATTAATAG ACTGGATGGA  
2451 GGCGGATAAA GTTG CAGGAC CACTTCTGCG CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT  
2501 GGTTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG AGCGTGGGTC TCGCGGTATC  
2551 ATTG CAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC TCCCGTATCG TAGTTATCTA  
2601 CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGCTG  
2651 AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT AACTGTCAGA CCAAGTTTAC  
2701 TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACTT CATTTTTAAT TTAAAAAGGAT  
2751 CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT GACCAAAATC CCTTAACGTG  
2801 AGTTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG TAGAAAAGAT CAAAGGATCT  
2851 TCTTGAGATC CTTTTTTTTCT GCGCGTAATC TGCTGCTTGC AAACAAAAAA  
2901 ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC GGATCAAGAG CTACCAACTC  
2951 TTTTTCCGAA GGTA ACTGGC TTCAGCAGAG CGCAGATACC AAATACTGTC  
3001 CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC TTCAAGAACT CTGTAGCACC  
3051 GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG  
3101 GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT CAAGACGATA GTTACCGGAT  
3151 AAGGCGCAGC GGTGCGGCTG AACGGGGGGT TCGTGCACAC AGCCCAGCTT  
3201 GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCTATGAG  
3251 AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAAG CGGACAGGTA TCCGGTAAGC  
3301 GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG GAGCTTCCAG GGGGAAACGC  
3351 CTGGTATCTT TATAGTCTG TCGGGTTTCG CCACCTCTGA CTTGAGCGTC  
3401 GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATGGAA AAACGCCAGC  
3451 AACGCGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT  
3501 GTTCTTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT GGATAACCGT ATTACCGCCT

->

ANHANG

3551 TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGCAGCC GAACGACCGA GCGCAGCGAG  
3601 TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC  
3651 GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATA TGGTGCACCTC TCAGTACAAT  
3701 CTGCTCTGAT GCCGCATAGT TAAGCCAGTA TACTACTCCGC TATCGCTACG  
3751 TGA CTGGGTC ATGGCTGCGC CCCGACACCC GCCAACACCC GCTGACGCGC  
3801 CCTGACGGGC TTGTCTGCTC CCGGCATCCG CTTACAGACA AGCTGTGACC  
3851 GTCTCCGGGA GCTGCATGTG TCAGAGGTTT TCACCGTCAT CACCGAAACG  
3901 CGCGAGGCAG CTGCGGTA AAA GCTCATCAGC GTGGTTCGTGA AGCGATTAC  
3951 AGATGTCTGC CTGTTTCATCC GCGTCCAGCT CGTTGAGTTT CTCCAGAAGC  
4001 GTTAATGTCT GGCTTCTGAT AAAGCGGGCC ATGTTAAGGG CGGTTTTTTTC  
4051 CTGTTTGGTC ACTGATGCCT CCGTGTAAGG GGGATTTCTG TTCATGGGGG  
4101 TAATGATACC GATGAAACGA GAGAGGATGC TCACGATACG GGTTACTGAT  
4151 GATGAACATG CCCGGTTACT GGAACGTTGT GAGGGTAAAC AACTGGCGGT  
4201 ATGGATGCGG CGGGACCAGA GAAAAATCAC TCAGGGTCAA TGCCAGCGCT  
4251 TCGTTAATAC AGATGTAGGT GTTCCACAGG GTAGCCAGCA GCATCCTGCG  
4301 ATGCAGATCC GGAACATAAT GGTGCAGGGC GCTGACTTCC GCGTTTCCAG  
4351 ACTTTACGAA ACACGGAAAC CGAAGACCAT TCATGTTGTT GCTCAGGTCG  
4401 CAGACGTTTT GCAGCAGCAG TCGCTTACG TTCGCTCGCG TATCGGTGAT  
4451 TCATTCTGCT AACCAGTAAG GCAACCCCGC CAGCCTAGCC GGGTCCCAA  
4501 CGACAGGAGC ACGATCATGC GCACCCGTGG GGCCGCCATG CCGGCGATAA  
4551 TGGCCTGCTT CTCGCCGAAA CGTTTTGGTGG CGGGACCAGT GACGAAGGCT  
4601 TGAGCGAGGG CGTGCAAGAT TCCGAATACC GCAAGCGACA GGCCGATCAT  
4651 CGTCGCGCTC CAGCGAAAGC GGTCTCTGCC GAAAATGACC CAGAGCGCTG  
4701 CCGGCACCTG TCCTACGAGT TGCATGATAA AGAAGACAGT CATAAGTGCG  
4751 GCGACGATAG TCATGCCCCG CGCCCACCGG AAGGAGCTGA CTGGGTTGAA  
4801 GGCTCTCAAG GGCATCGGTC GAGATCCCGG TGCTAATGA GTGAGCTAAC  
4851 TTACATTAAT TGCCTTGC GC TCACTGCCCG CTTTCCAGTC GGGAAACCTG  
4901 TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT  
4951 GCGTATTGGG CGCCAGGGTG GTTTTTCTTT TCACCAGTGA GACGGGCAAC  
5001 AGCTGATTGC CCTTCACCGC CTGGCCCTGA GAGAGTTGCA GCAAGCGGTC  
5051 CACGCTGGTT TGCCCCAGCA GGCAGAAAATC CTGTTTGTATG GTGGTTAACG  
5101 GCGGGATATA ACATGAGCTG TCTTCGGTAT CGTCGTATCC CACTACCGAG  
5151 ATATCCGCAC CAACGCGCAG CCCGGACTCG GTAATGGCGC GCATTGCGCC  
5201 CAGCGCCATC TGATCGTTGG CAACCAGCAT CGCAGTGGGA ACGATGCCCT  
5251 CATTACAGCAT TTGCATGGTT TGTTGAAAAC CGGACATGGC ACTCCAGTCG  
5301 CCTTCCCCTT CCGCTATCGG CTGAATTTGA TTGCGAGTGA GATATTTATG  
5351 CCAGCCAGCC AGACGCAGAC GCGCCGAGAC AGAACTTAAT GGGCCCCTA  
5401 ACAGCGCGAT TTGCTGGTGA CCCAATGCGA CCAGATGCTC CACGCCAGT  
5451 CGCGTACCGT CTTTCATGGGA GAAAATAATA CTGTTGATGG GTGTCTGGTC  
5501 AGAGACATCA AGAAATAACG CCGGAACATT AGTGCAGGCA GCTTCCACAG  
5551 CAATGGCATC CTGGTCATCC AGCGGATAGT TAATGATCAG CCCACTGACG  
5601 CGTTGCGCGA GAAGATTGTG CACCGCCGCT TTACAGGCTT CGACGCCGCT

->

5651 TCGTTCTACC ATCGACACCA CCACGCTGGC ACCCAGTTGA TCGGCGCGAG  
 5701 ATTTAATCGC CGCGACAATT TGCGACGGCG CGTGCAGGGC CAGACTGGAG  
 5751 GTGGCAACGC CAATCAGCAA CGACTGTTTG CCCGCCAGTT GTTGTGCCAC  
 5801 GCGGTTGGGA ATGTAATTCA GCTCCGCCAT CGCCGCTTCC ACTTTTTTCCC  
 5851 GCGTTTTTCGC AGAAACGTGG CTGGCCTGGT TCACCACGCG GGAAACGGTC  
 5901 TGATAAGAGA CACCGGCATA CTCTGCGACA TCGTATAACG TTTACTGGTTT  
 5951 CACATTACCC ACCCTGAATT GACTCTCTTC CGGGCGCTAT CATGCCATAC  
 6001 CGCGAAAGGT TTTGCGCCAT TCGATGGTGT CCGGGATCTC GACGCTCTCC  
 6051 CTTATGCGAC TCCTGCATTA GGAAGCAGCC CAGTAGTAGG TTGAGGCCGT  
 6101 TGAGCACCGC CGCCGCAAGG AATGGTGCAT GCAAGGAGAT GGCGCCCAAC  
 6151 AGTCCCCCGG CCACGGGGCC TGCCACCATA CCCACGCCGA AACAAAGCGT  
 6201 CATGAGCCCG AAGTGGCGAG CCCGATCTTC CCCATCGGTG ATGTCGGCGA  
 6251 TATAGGCGCC AGCAACCGCA CCTGTGGCGC CGGTGATGCC GGCCACGATG  
 6301 CGTCCGGCGT AGAGGATCGA GATCTCGATC CCGCGAAATT AATACGACTC  
 6351 ACTATAGGGG AATTGTGAGC GGATAACAAT TCCCCTCTAG AAATAATTTT  
 6401 GTTTAACTTT AAGAAGGAGA TATACA

**pET22b+Pum3-2**

1 TATGGGCCGC AGCCGCCTTT TGGAAGATTT TCGAAACAAC CGGTACCCCA  
 51 ATTTACAAC TCGGGGAGATT GCTGGACATA TAATGGAATT TTCCCAAGAC  
 101 CAGCATGGGT CCAGATTCAT TCAGCTGAAA CTGGAGCGTG CCACACCAGC  
 151 TGAGCGCCAG CTTGTCTTCA ATGAAATCCT CCAGGCTGCC TACCAACTCA  
 201 TGGTGGATGT GTTTGGTAAT TACGTCATTC AGAAGTTCTT TGAATTTGGC  
 251 AGTCTTGAAC AGAAGCTGGC TTTGGCAGAA CGGATTCGAG GCCACGTCTT  
 301 GTCATTGGCA CTACAGATGT ATGGCAGCCG TGTTATCGAG AAAGCTCTTG  
 351 AGTTTATTCC TTCAGACCAG CAGAATGAGA TGGTTCGGGA ACTAGATGGC  
 401 CATGTCTTGA AGTGTGTGAA AGATCAGAAT GGCAATCACG TGGTTCAGAA  
 451 ATGCATTGAA TGTGTACAGC CCCAGTCTTT GCAATTTATC ATCGATGCGT  
 501 TTAAGGGACA GGTATTTGCC TTATCCACAC ATCCTTATGG CTGCCGAGTG  
 551 ATTCAGAGAA TCCTGGAGCA CTGTCTCCCT GACCAGACAC TCCCTATTTT  
 601 AGAGGAGCTT CACCAGCACA CAGAGCAGCT TGTACAGGAT CAATATGGAA  
 651 ATTATGTAAT CCAACATGTA CTGGAGCACG GTCGTCCTGA GGATAAAAGC  
 701 AAAATTGTAG CAGAAATCCG AGGCAATGTA CTTGTATTGA GTCAGCACAA  
 751 ATTTGCAAGC AATGTTGTGG AGAAGTGTGT TACTCACGCC TCACGTACGG  
 801 AGCGCGCTGT GTCATCGAT GAGGTGTGCA CCATGAACGA CGGTCCCCAC  
 851 AGTGCCTTAT ACACCATGAT GAAGGACCAG TATGCCAACT ACGTGGTCCA  
 901 GAAGATGATT GACGTGGCGG AGCCAGGCCA GCGGAAGATC GTCATGCATA  
 951 AGATCCGGCC CCACATCGCA ACTCTTCGTA AGTACACCTA TGGCAAGCAC  
 1001 ATTCTGGCCA AGCTGGAGAA GTACTACATG AAGAACGGTG TTGACTTAGG

**pET22b+Pum-Var2 (Pum1-2/2-1/3-2)**

1 TATGGGCCGC AGCCGCCTTT TGGAAGATTT TCGAAACAAC CGGTACCCCA  
 51 ATTTACAAC TCGGGGAGATT GCTGGACATA TAATGGAATT TTCCCAAGAC  
 101 CAGCATGGGA ATAGATTCAT TCAGCTGAAA CTGGAGCGTG CCACACCAGC  
 151 TGAGCGCCAG CTTGTCTTCA ATGAAATCCT CCAGGCTGCC TACCAACTCA  
 201 TGGTGGATGT GTTTGGTAGT TACGTCATTG AGAAGTTCTT TGAATTTGGC  
 251 AGTCTTGAAC AGAAGCTGGC TTTGGCAGAA CGGATTCGAG GCCACGTCTT  
 301 GTCATTGGCA CTACAGATGT ATGGCAGCCG TGTATCGAG AAAGCTCTTG  
 351 AGTTTATTCC TTCAGACCAG CAGAATGAGA TGGTTCGGGA ACTAGATGGC  
 401 CATGTCTTGA AGTGTGTGAA AGATCAGAAT GGCAATCACG TGGTTCAGAA  
 451 ATGCATTGAA TGTGTACAGC CCCAGTCTTT GCAATTTATC ATCGATGCGT  
 501 TTAAGGGACA GGTATTTGCC TTATCCACAC ATCCTTATGG CTGCCGAGTG  
 551 ATTCAGAGAA TCCTGGAGCA CTGTCTCCCT GACCAGACAC TCCCTATTTT  
 601 AGAGGAGCTT CACCAGCACA CAGAGCAGCT TGTACAGGAT CAATATGGAA  
 651 ATTATGTAAT CCAACATGTA CTGGAGCACG GTCGTCCTGA GGATAAAAGC  
 701 AAAATTGTAG CAGAAATCCG AGGCAATGTA CTTGTATTGA GTCAGCACAA  
 751 ATTTGCAAGC AATGTTGTGG AGAAGTGTGT TACTCACGCC TCACGTACGG  
 801 AGCGCGCTGT GTCATCGAT GAGGTGTGCA CCATGAACGA CGGTCCCCAC  
 851 AGTGCCTTAT ACACCATGAT GAAGGACCAG TATGCCAACT ACGTGGTCCA  
 901 GAAGATGATT GACGTGGCGG AGCCAGGCCA GCGGAAGATC GTCATGCATA  
 951 AGATCCGGCC CCACATCGCA ACTCTTCGTA AGTACACCTA TGGCAAGCAC  
 1001 ATTCTGGCCA AGCTGGAGAA GTACTACATG AAGAACGGTG TTGACTTAGG

**pET22b+S10-Pum-Var2**

1 TATGGAAGAT TTACCAGACG ACCATTACCT GTCGACACAA ACTATCCTTT  
 51 CGAAAGATCT CAACGGTACC GACGTTGGGT CTGGCGGTGG CTCCATGGGC  
 101 CGCAGCCGCC TTTTGGGAAGA TTTTCGAAAC AACCGGTACC CCAATTTACA  
 151 ACTGCGGGAG ATTGCTGGAC ATATAATGGA ATTTTCCCAA GACCAGCATG  
 201 GGAATAGATT CATTAGCTG AAACCTGGAGC GTGCCACACC AGCTGAGCGC  
 251 CAGCTTGTCT TCAATGAAAT CCTCCAGGCT GCCTACCAAC TCATGGTGGG  
 301 TGTGTTTGGT AGTTACGTCA TTGAGAAGTT CTTTGAATTT GGCAGTCTTG  
 351 AACAGAAGCT GGCTTTGGCA GAACGGATTC GAGGCCACGT CCTGTCATTG  
 401 GCACTACAGA TGTATGGCAG CCGTGTATC CAGAAAGCTC TTGAGTTTAT  
 451 TCCTTCAGAC CAGCAGAATG AGATGGTTTCG GGAAGTAGAT GGCCATGTCT  
 501 TGAAGTGTGT GAAAGATCAG AATGGCAATC ACGTGGTTCA GAAATGCATT  
 551 GAATGTGTAC AGCCCCAGTC TTTGCAATTT ATCATCGATG CGTTTAAGGG  
 601 ACAGGTATTT GCCTTATCCA CACATCCTTA TGGCTGCCGA GTGATTCAGA  
 651 GAATCCTGGA GCACTGTCTC CCTGACCAGA CACTCCCTAT TTTAGAGGAG  
 701 CTTACCAGC ACACAGAGCA GCTTGTACAG GATCAATATG GAAATTATGT  
 751 AATCCAACAT GTACTGGAGC ACGGTCGTCC TGAGGATAAA AGCAAAATTG  
 801 TAGCAGAAAT CCGAGGCAAT GTACTTGTAT TGAGTCAGCA CAAATTTGCA

-&gt;

---

851 AGCAATGTTG TGGAGAAGTG TGTTACTCAC GCCTCACGTA CGGAGCGCGC  
 901 TGTGCTCATC GATGAGGTGT GCACCATGAA CGACGGTCCC CACAGTGCCT  
 951 TATACACCAT GATGAAGGAC CAGTATGCCA ACTACGTGGT CCAGAAAGATG  
 1001 ATTGACGTGG CGGAGCCAGG CCAGCGGAAG ATCGTCATGC ATAAGATCCG  
 1051 GCCCCACATC GCAACTCTTC GTAAGTACAC CTATGGCAAG CACATTCTGG  
 1101 CCAAGCTGGA GAAGTACTAC ATGAAGAACG GTGTTGACTT AGG

---

**pRSET-A-TC-Nos (Nos 288-401 opt)**

1 TATGCGGGT TCTCATCATC ATCATCATCA TGGTATGGCT AGCATGACTG  
 51 GTGGACAGCA AATGGGTCCG GATCTGTACG ACGATGACGA TAAGGATCGA  
 101 TGGGGATCCT GTTGTCCGGG TTGTTGCGGT GGTGGTAAAC TGCTGCGTGG  
 151 TGCAAGCAAT AGCAGCAATA ATAACAACAA TAACAATAAA GTGTACAAAC  
 201 GCTATAACAG CAAAGCCAAA GAAATTTTAC GTCACTGCGT TTTTGTGCGAG  
 251 AATAACAATG AACCGGAAGC CGTGATTAAT AGCCATAGCG TTCGTGATAA  
 301 CTTTAATCGT GTTCTGTGTC CGAACTGCG TACCTATGTT TGTCCGATTT  
 351 GTGGTGCCAG CGGTGATAGC GCACATACCA TCAAATATTG TCCGAAAAAA  
 401 CCGATCATCA CCATGGAAGA TGCAATTAAA GCAGAAAGTT TTCGTCTGGC  
 451 AAAAAGCAGC TATTACAAAC AGCAGATGAA AGTGTAACTC GAGATCTGCA  
 501 GCTGGTACCA TGGAATTCGA AGCTTGATCC GGCTGCTAAC AAAGCCCAGAA  
 551 AGGAAGCTGA GTTGGCTGCT GCCACCGCTG AGCAATAACT AGCATAACCC  
 601 CTTGGGGCCT CTAAACGGGT CTTGAGGGGT TTTTGTGCTGA AAGGAGGAAC  
 651 TATATCCGGA TCTGGCGTAA TAGCGAAGAG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC  
 701 CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG GGACCGGCCC TGTAGCGGCG  
 751 CATTAAAGCGC GCGGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAC CGCTACACTT  
 801 GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC TCCTTTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTTCTCGC  
 851 CACGTTTCGCC GGCTTTCCCC GTCAAGCTCT AAATCGGGGG CTCCCTTTAG  
 901 GGTTCCGATT TAGTGCTTTA CGGCACCTCG ACCCAAATAA ACTTGATTAG  
 951 GGTGATGGTT CACGTAGTGG GCCATCGCCC TGATAGACGG TTTTTCGCCC  
 1001 TTTGACGTTG GAGTCCACGT TCTTTAATAG TGGACTCTTG TTCCAAACTG  
 1051 GAACAACACT CAACCCTATC TCGGTCTATT CTTTTGATTT ATAAGGGATT  
 1101 TTGCCGATTT CGGCCTATTG GTTAAAAAAT GAGCTGATTT AACAAAAATT  
 1151 TAACGCGAAT TTTAACAAAA TATTAACGCT TACAATTTAG GTGGCACTTT  
 1201 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTT TAAATACATT  
 1251 CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA  
 1301 TATTGAAAAA GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT  
 1351 TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC  
 1401 TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC  
 1451 ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA  
 1501 AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG  
 1551 TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCT CCGCATAAC  
 1601 TATTCTCAGA ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT  
 1651 TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA

->

ANHANG

1701 GTGATAACAC TGC GGCCAAC TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG  
 1751 GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA  
 1801 TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA  
 1851 CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT TGC GCAAAC TTTAACTGGC  
 1901 GAACTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC  
 1951 GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT  
 2001 TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT  
 2051 GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC  
 2101 GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA  
 2151 TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA  
 2201 TATATACTTT AGATTGATTT AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA  
 2251 GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT  
 2301 TTTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT  
 2351 TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAACC  
 2401 ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT  
 2451 TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAA TACTGTTCTT  
 2501 CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC  
 2551 TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG  
 2601 ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG  
 2651 GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGTTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA  
 2701 GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA  
 2751 GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC  
 2801 AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG  
 2851 GTATCTTTAT AGTCCTGTGC GGTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT  
 2901 TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC  
 2951 GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT  
 3001 CTTTCCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG  
 3051 AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA  
 3101 GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA GCGCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC  
 3151 GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGGATCTC GATCCC CGGA AATTAATACG  
 3201 ACTCACTATA GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTAGAAAT AATTTTGTFT  
 3251 AACTTTAAGA AGGAGATATA CA

**pGEX4T3-Nos**

1 CATGTCCCCT AACTAGGTT ATTGGAAAAT TAAGGGCCTT GTGCAACCCA  
 51 CTCGACTTCT TTTGGAATAT CTTGAAGAAA AATATGAAGA GCATTTGTAT  
 101 GAGCGCGATG AAGGTGATAA ATGGCGAAAC AAAAAGTTTG AATTGGGTTT  
 151 GGAGTTTCCC AATCTTCCTT ATTATATTGA TGGTGATGTT AAATTAACAC  
 201 AGTCTATGGC CATCATACGT TATATAGCTG ACAAGCACAA CATGTTGGGT  
 251 GGTTGTCCAA AAGAGCGTGC AGAGATTTCA ATGCTTGAAG GAGCGGTTTT  
 301 GGATATTAGA TACGGTGTTT CGAGAATTGC ATATAGTAAA GACTTTGAAA  
 351 CTCTCAAAGT TGATTTTCTT AGCAAGCTAC CTGAAATGCT GAAAATGTTC

->

ANHANG

---

401	GAAGATCGTT	TATGTCATAA	AACATATTTA	AATGGTGATC	ATGTAACCCA
451	TCCTGACTTC	ATGTTGTATG	ACGCTCTTGA	TGTTGTTTTA	TACATGGACC
501	CAATGTGCCT	GGATGCGTTC	CCAAAATTAG	TTTGTTTTAA	AAAACGTATT
551	GAAGCTATCC	CACAAATTGA	TAAGTACTTG	AAATCCAGCA	AGTATATAGC
601	ATGGCCTTTG	CAGGGCTGGC	AAGCCACGTT	TGGTGGTGGC	GACCATCCTC
651	CAAAATCGGA	TCTGGTTCCG	CGTGGATCCG	AGAATTTGTA	TTTTCAGGGT
701	CTGCGCGGAG	CTTCCAATTC	CAGTAACAAT	AATAACAACA	ACAAGGTGTA
751	CAAGCGTTAC	AACAGCAAGG	CCAAAGAGAT	CAGCCGCCAC	TGCGTCTTTT
801	GTGAGAATAA	CAACGAACCA	GAGGCGGTTA	TCAATAGCCA	CTCAGTGCGA
851	GATAACTTTA	ACCGAGTGCT	GTGCCCAAAA	CTACGCACCT	ACGTGTGCCC
901	CATCTGCGGG	GCATCTGGGG	ACTCGGCGCA	CACGATTAAG	TACTGCCCCA
951	AGAAGCCGAT	CATCACCATG	GAGGATGCGA	TCAAGGCGGA	ATCGTTCCGC
1001	CTAGCCAAGA	GCAGTTACTA	CAAGCAACAG	ATGAAGGTTT	AGCTCGAGCG
1051	GCCGCATCGT	GACTGACTGA	CGATCTGCCT	CGCGCGTTTC	GGTGATGACG
1101	GTGAAAACCT	CTGACACATG	CAGCTCCCGG	AGACGGTCAC	AGCTTGTCTG
1151	TAAGCGGATG	CCGGGAGCAG	ACAAGCCCGT	CAGGGCGCGT	CAGCGGGTGT
1201	TGGCGGGTGT	CGGGGCGCAG	CCATGACCCA	GTCACGTAGC	GATAGCGGAG
1251	TGTATAATTC	TTGAAGACGA	AAGGGCCTCG	TGATACGCCT	ATTTTTATAG
1301	GTTAATGTCA	TGATAATAAT	GGTTTCTTAG	ACGTCAGGTG	GCACTTTTCG
1351	GGGAAATGTG	CGCGGAACCC	CTATTTGTTT	ATTTTTCTAA	ATACATTCAA
1401	ATATGTATCC	GCTCATGAGA	CAATAACCCT	GATAAATGCT	TCAATAATAT
1451	TGAAAAGGA	AGAGTATGAG	TATTCAACAT	TTCCGTGTCTG	CCCTTATFCC
1501	CTTTTTTGCG	GCATTTTGCC	TTCTGTGTTT	TGCTCACCCA	GAAACGCTGG
1551	TGAAAGTAAA	AGATGCTGAA	GATCAGTTGG	GTGCACGAGT	GGGTTACATC
1601	GAAGTGGATC	TCAACAGCGG	TAAGATCCTT	GAGAGTTTTT	GCCCCGAAGA
1651	ACGTTTTCCA	ATGATGAGCA	CTTTTAAAGT	TCTGCTATGT	GGCGCGGTAT
1701	TATCCCGTGT	TGACGCCGGG	CAAGAGCAAC	TCGGTCGCCG	CATACACTAT
1751	TCTCAGAATG	ACTTGGTTGA	GTACTCACCA	GTCACAGAAA	AGCATCTTAC
1801	GGATGGCATG	ACAGTAAGAG	AATTATGCAG	TGCTGCCATA	ACCATGAGTG
1851	ATAACACTGC	GGCCAACCTA	CTTCTGACAA	CGATCGGAGG	ACCGAAGGAG
1901	CTAACCGCTT	TTTTGCACAA	CATGGGGGAT	CATGTAATCT	GCCTTGATCG
1951	TTGGGAACCG	GAGCTGAATG	AAGCCATACC	AAACGACGAG	CGTGACACCA
2001	CGATGCCTGC	AGCAATGGCA	ACAACGTTGC	GCAAATATT	AACTGGCGAA
2051	CTACTTACTC	TAGCTTCCCG	GCAACAATTA	ATAGACTGGA	TGGAGGCGGA
2101	TAAAGTTGCA	GGACCACTTC	TGCGCTCGGC	CCTTCCGGCT	GGCTGGTTTA
2151	TTGCTGATAA	ATCTGGAGCC	GGTGAGCGTG	GGTCTCGCGG	TATCATTGCA
2201	GCACTGGGGC	CAGATGGTAA	GCCCTCCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACACGAC
2251	GGGGAGTCAG	GCAACTATGG	ATGAAACGAAA	TAGACAGATC	GCTGAGATAG
2301	GTGCCTCACT	GATTAAGCAT	TGGTAACTGT	CAGACCAAGT	TTACTCATAT
2351	ATACTTTAGA	TTGATTTAAA	ACTTCATTTT	TAATTTAAAA	GGATCTAGGT
2401	GAAGATCCTT	TTTGATAATC	TCATGACCAA	AATCCCTTAA	CGTGAGTTTT
2451	CGTTCCACTG	AGCGTCAGAC	CCCGTAGAAA	AGATCAAAGG	ATCTTCTTGA

->

ANHANG

2501 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC  
2551 GCTACCAGCG GTGGTTTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTTC  
2601 CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCTTCTA  
2651 GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC  
2701 ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA  
2751 AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG  
2801 CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG  
2851 AACGACCTAC ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAAGCG  
2901 CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG  
2951 GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA  
3001 TCTTTATAGT CCTGTGCGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT  
3051 TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG  
3101 GCCTTTTTTAC GGTTCCCTGGC CTTTTGCTGG CTTTTTGCTC ACATGTTCTT  
3151 TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT  
3201 GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG  
3251 AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG TATTTTCTCC TTACGCATCT  
3301 GTGCGGTATT TCACACCGCA TAAATTCCGA CACCATCGAA TGGTGCAAAA  
3351 CCTTTGCGCG TATGGCATGA TAGCGCCCGG AAGAGAGTCA ATTCAGGGTG  
3401 GTGAATGTGA AACCAGTAAC GTTATACGAT GTCGCAGAGT ATGCCGGTGT  
3451 CTCTTATCAG ACCGTTTCCC GCGTGGTGAA CCAGGCCAGC CACGTTTCTG  
3501 CGAAAACGCG GGAAAAAGTG GAAGCGGCGA TGGCGGAGCT GAATTACATT  
3551 CCCAACCGCG TGGCACAACA ACTGGCGGGC AAACAGTCGT TGCTGATTGG  
3601 CGTTGCCACC TCCAGTCTGG CCCTGCACGC GCCGTCGAA ATTGTCGCGG  
3651 CGATTAAATC TCGCGCCGAT CAACTGGGTG CCAGCGTGGT GGTGTCGATG  
3701 GTAGAACGAA GCGGCGTCGA AGCCTGTAAA GCGGCGGTGC ACAATCTTCT  
3751 CGCGCAACGC GTCAGTGGGC TGATCATTA A CTATCCGCTG GATGACCAGG  
3801 ATGCCATTGC TGTGGAAGCT GCCTGCACTA ATGTTCCGGC GTTATTTCTT  
3851 GATGTCTCTG ACCAGACACC CATCAACAGT ATTATTTTCT CCCATGAAGA  
3901 CGGTACGCGA CTGGGCGTGG AGCATCTGGT CGCATTGGGT CACCAGCAAA  
3951 TCGCGCTGTT AGCGGGCCCA TTAAGTTCTG TCTCGGCGCG TCTGCGTCTG  
4001 GCTGGCTGGC ATAAATATCT CACTCGCAAT CAAATTCAGC CGATAGCGGA  
4051 ACGGGAAGGC GACTGGAGTG CCATGTCCGG TTTTCAACAA ACCATGCAAA  
4101 TGCTGAATGA GGGCATCGTT CCCACTGCGA TGCTGGTTGC CAACGATCAG  
4151 ATGGCGCTGG GCGCAATGCG CGCCATTACC GAGTCCGGGC TGCGCGTTGG  
4201 TGCGGATATC TCGGTAGTGG GATACGACGA TACCGAAGAC AGCTCATGTT  
4251 ATATCCCGCC GTTAACCACC ATCAAACAGG ATTTTCGCCT GCTGGGGCAA  
4301 ACCAGCGTGG ACCGCTTGCT GCAACTCTCT CAGGGCCAGG CGGTGAAGGG  
4351 CAATCAGCTG TTGCCCGTCT CACTGGTGAA AAGAAAAACC ACCCTGGCGC  
4401 CCAATACGCA AACCGCCTCT CCCC GCGCGT TGGCCGATTC ATTAATGCAG  
4451 CTGGCACGAC AGGTTTCCCG ACTGGAAAGC GGGCAGTGAG CGCAACGCAA  
4501 TTAATGTGAG TTAGCTCACT CATTAGGCAC CCCAGGCTTT ACACTTTATG  
4551 CTTCCGGCTC GTATGTTGTG TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTACAC

->

4601 AGGAAACAGC TATGACCATG ATTACGGATT CACTGGCCGT CGTTTTACAA  
 4651 CGTCGTGACT GGGAAAACCC TGGCGTTACC CAACTTAATC GCCTTGCAGC  
 4701 ACATCCCCCT TTCGCCAGCT GGC GTAATAG CGAAGAGGCC CGCACCGATC  
 4751 GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGCG CTTTGCCTGG  
 4801 TTTCCGGCAC CAGAAGCGGT GCCGGAAAGC TGGCTGGAGT GCGATCTTCC  
 4851 TGAGGCCGAT ACTGTCTGTCG TCCCCTCAAA CTGGCAGATG CACGGTTACG  
 4901 ATGCGCCCAT CTACACCAAC GTAACCTATC CCATTACGGT CAATCCGCCG  
 4951 TTTGTTCCCA CGGAGAATCC GACGGGTTGT TACTCGCTCA CATTTAATGT  
 5001 TGATGAAAGC TGGCTACAGG AAGGCCAGAC GCGAATTATT TTTGATGGCG  
 5051 TTGGAATTAC GTTATCGACT GCACGGTGCA CCAATGCTTC TGGCGTCAGG  
 5101 CAGCCATCGG AAGCTGTGGT ATGGCTGTGC AGGTCGTAAA TCACTGCATA  
 5151 ATTCGTGTCTG CTCAAGGCGC ACTCCCGTTC TGGATAATGT TTTTTCGCC  
 5201 GACATCATAA CGGTTCTGGC AAATATTCTG AAATGAGCTG TTGACAATTA  
 5251 ATCATCGGCT CGTATAATGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTACACA  
 5301 CAGGAAACAG TATT

**pSK17-Hb-boxAB**

1 GCTAGCCCAT CACCATCACC TTGTTATTAT TATTTATCAC TATTATCATA  
 51 TAATCCCAGA ATTGTATATA TTAATTTGAT ATATTTCGTAG CATAAGTTTT  
 101 CCAAACATTA TTTTGTGTC TCTAGAGGCA TCAAATAAAA CGAAAGGCTC  
 151 AGTCGAAAGA CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTGTTGTC GGTGAACGCT  
 201 CTCCTGAGTA GGACAAATCC GCCGCCCTAG ACCTAGGCGT TCGGCTGCGG  
 251 CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC  
 301 AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA  
 351 GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC  
 401 CCTGACGAGC ATCACA AAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGC GAAACCC  
 451 GACAGGACTA TAAAGATAACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC  
 501 GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC  
 551 CTTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG  
 601 TTCGGTGTAG GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG  
 651 TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC  
 701 CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT  
 751 TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC  
 801 CTA ACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG  
 851 AAGCCAGTTA CCTTCG GAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA  
 901 AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC  
 951 GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT  
 1001 GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGACTAG  
 1051 TGCTTG GATT CTCACCAATA AAAAACGCC GCGGCAACC GAGCGTCTG  
 1101 AACAAATCCA GATGGAGTTC TGAGGTCATT ACTGGATCTA TCAACAGGAG  
 1151 TCCAAGCGAG CTCGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT  
 1201 GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG

->

ANHANG

---

1251 ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC  
1301 CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA  
1351 TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC  
1401 AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG  
1451 TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGC GCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA  
1501 GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG  
1551 TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG  
1601 CGGTTAGCTC CTTCCGGTCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA  
1651 GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TFACTGTGAT  
1701 GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT  
1751 TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA  
1801 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTTG  
1851 AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT  
1901 CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT  
1951 ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC  
2001 AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC  
2051 TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA  
2101 TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC  
2151 ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA  
2201 CATTACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCACCTC  
2251 GAGAATTGTG AGCGGATAAC AATTGACATT GTGAGCGGAT AACCAAGATAC  
2301 TGAGCAC

**pSK17-Hb-boxAC**

1 GCTAGCCCAT CACCATCACC TTGTTATTAT TATTTATCAC TATTATCATA  
51 TAATCCCAGA ATTGTATATA TTAATCCCAT ATATTCGTAG CATAAGTTTT  
101 CCAAACATTA TTTTGTGTC TCTAGA

## 10. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Andrea Rentmeister für die Aufnahme – als erste Doktorandin – in ihre damals neue Arbeitsgruppe in Hamburg. Ich danke ihr für das Vertrauen und die Unterstützung, die Sie mir hat zukommen lassen. Ihre fachlichen Ratschläge und Diskussionen haben mir immer sehr geholfen und mich weit voran gebracht. Andrea, ich wünsche dir weiterhin viel Erfolg an der WWU Münster!

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Uli Hahn dafür bedanken, dass er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und unsere Arbeitsgruppe immer unterstützt hat. Dank seiner stets aufmunternden Kommentare („Na, ihr Zuckerpuppen!“) wurde uns nie langweilig. Außerdem danke ich ihm für die Erstellung des Zweitgutachtens dieser Arbeit!

Dem gesamten AK Rentmeister sage ich natürlich auch tausendmal Danke! Dr. Daniela Schulz, Stephanie Besztejan, Julia Sandberg-Meinhardt, Stefanie Kellermann, Josephin Holstein und Dénes Haase verdanke ich eine tolle Zeit. Ich habe von euch allen immer Unterstützung erfahren und konnte mich auf jeden Einzelnen verlassen. Ich könnte mir keine besseren Kollegen vorstellen! Steffi und Josie, ich habe mit Freude beobachtet, wie ihr jetzt auch „groß“ geworden seid. ☺ Ich wünsche euch viel Erfolg in Münster und bei euren Doktorarbeiten! Daniela und Steph, ihr wisst, ihr seid mir beide sehr ans Herz gewachsen! Wir haben uns stets mit Eistee oder *minty chocolate* über Wasser gehalten und konnten auch außerhalb der Uni immer aufeinander zählen. Ich freue mich schon auf Mitternachtspartys in Münster und die nächste Tortenschlacht. Auf die Plätzchen fertig los!

Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des AK Hahns, besonders Dr. Katrin Seelhorst, Dr. Katja Eydeler-Haeder und Dr. Kirstin Gerstle, möchte ich auch ein riesiges Dankeschön aussprechen. Ihr habt uns alle immer mit offenen Armen aufgenommen, und besonders mich in der chaotischen Anfangsphase stets mit Rat, Chemikalien oder netten Worten unterstützt. Auch die gemeinsamen Vorträge und Ausflüge werde ich so schnell nicht vergessen! Ein besonderer Dank geht an Dr. Eileen Magbanua und Dr. Tijana Živković. Ihr habt mich durch die ganze Zeit begleitet, stets aufgemuntert und seid mir immer gute Freundinnen gewesen!

Dem gesamten Biochemie-Institut möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und selbstverständlichen Hilfeleistungen danken. Dabei danke ich besonders Daniela Otto, Thorsten Mix und Margot Binnewies, sowie Florian Mittelberger, Sven Kruspe, Marco Klinge, Dr. Sven Falke und Dr. Raphael Eberle.

Ein großer Dank geht an alle BTA-Schüler, Praktikanten und Bachelor-Studenten, die mir während meiner Doktorandenzeit geholfen haben und an meinen Projekten mitgearbeitet haben. Ich danke Patrick Lieske, Marc Willenberg, Jan Römer, Fabienne Hamester, Kimberley Dreger, Oliver Kolde, Lena von Ehrenstein, Jenny Wigger, Tobias Lichtenberg, Annika Mergner, Nadja Haberz, Clare Hoy, Stefanie Kellermann, Josephin Holstein, Joanna Fafinska, Katharina Berg, David Schütz, Bente Eisenlohr, Pascal Steffen und Serge Kliewer. Besonders Marina Mutas danke ich für ihre stets fröhliche Art, ihre unermüdliche Hilfe bei unserem Projekt und so manchen schönen Moment. Marina, ohne dich wäre es möglich gewesen! ☺

Ich danke Prof. T. Hall, Dr. Gaby Loers und Dr. G. Waldo für die Bereitstellung der Plasmide. Außerdem bedanke ich mich bei ProExzellenzia für die Aufnahme in das Stipendiatinnenprogramm.

Meinen Uni-Mädels Nina, Sonja und Brigitte danke ich für die schöne Zeit während des Studiums. Meinen liebsten Freundinnen Susanne und Katja danke ich dafür, dass sie mich immer ertragen haben, mit mir durch Höhen und Tiefen gegangen sind und mich daran erinnert haben, was wirklich im Leben zählt!

Last but not least danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung! Mama, Matthi und Chrissi, ihr habt mir die ganze Zeit zur Seite gestanden. Ihr habt immer an mich geglaubt und es erst ermöglicht, dass ich soweit gekommen bin. Ich danke euch für euer Vertrauen und eure Liebe!

## **11. Lebenslauf**

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen



## 12. Veröffentlichungen

### Publikationen

Rath, A. K., Kellermann, S. J., Rentmeister, A. (2014), „Programmable Design of functional Ribonucleoprotein-Complexes“, Chemistry-An Asian Journal, DOI: 10.1002/asia.201402220

Kellermann, S. J.\*, Rath, A. K.\*, Rentmeister, A. (2013), "Tetramolecular Fluorescence Complementation for Detection of Specific RNAs in Vitro", Chembiochem **14**(2): 200-204.

\* geteilte Erstautorenschaft

### Video

Rath, A. K., Kellermann, S. J., Rentmeister, A. (2013) „Tetramolecular Fluorescence Complementation“ BeilsteinTV

### Poster

Molecular Life Sciences 2013, Frankfurt, Deutschland, 2013  
„Tetramolecular Fluorescence Complementation“

RNA2013, Davos, Schweiz, 2013  
“Tetramolecular Fluorescence Complementation”

UHH-SDU-AU Meeting, Sandbjerg, Dänemark, 2011  
„Novel Approaches for RNA Imaging in Living Cells“

### **13. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die wörtlich oder inhaltlich benutzten Quellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich habe mit dieser oder einer anderen Dissertation keine früheren Promotionsversuche unternommen. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsstelle vorgelegen. Ich bin damit einverstanden, dass diese Arbeit ab dem 31.12.2014 veröffentlicht und der Bibliothek für die Ausleihe zur Verfügung gestellt wird.

Hamburg, 16. April 2014

---

Anna Katharina Rath