

Pumilio-basierte Designerproteine zur sequenz-spezifischen Detektion von RNA

Pumilio-based designer proteins for sequence-specific RNA detection

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
Stefanie Julia Kellermann

Hamburg, Juli 2016

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Januar bis Dezember 2013 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie im Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg und von Januar 2014 bis April 2016 am Institut für Biochemie im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter Anleitung von Prof. Dr. Andrea Rentmeister durchgeführt.

Gutachter:

Prof. Dr. Andrea Rentmeister

Prof. Dr. Ulrich Hahn

Datum der Disputation: 30.09.2016

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *A FACS-based screening strategy to assess sequence-specific RNA-binding of Pumilio protein variants in E. coli*, Biological Chemistry, **2016**, DOI: 10.1515/hsz-2016-0214.

Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *A genetically encodable system for sequence-specific detection of RNAs in two colors*, ChemBioChem, **2016**, 17, 895-899.

Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *Manipulation von RNA mit Designerproteinen*, Nachrichten aus der Chemie, **2016**, 64, 297-301.

*Follow your passion,
be prepared to work hard and sacrifice,
and, above all,
don't let anyone limit your dreams.
- Donovan Bailey*

~ Für Lilly Peters ~

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abstract.....	VII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Die Pumilio Homologie-Domäne	3
1.3 Methoden zur Detektion von RNA	14
2 Zielsetzung	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Etablierung von TetFC <i>in vivo</i>	31
3.2 Erweiterung von TetFC <i>in vitro</i> anhand von Split-YFP	55
3.3 Sequenzspezifische RNA-Modifizierung	73
4 Diskussion	87
4.1 Sequenzspezifische RNA-Detektion.....	87
4.2 Sequenzspezifische RNA-Modifizierung	105
5 Ausblick.....	111
6 Material	115
6.1 Geräte, Software und Datenbanken.....	115
6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	117
6.3 Puffer, Lösungen und Nährmedien	118
6.4 Säulen, Kits und Größenstandards	121
6.5 Bakterienstämme	122
6.6 Enzyme, Proteine und Antikörper	122
6.7 Plasmide.....	124
6.8 Oligonukleotide, Nukleotide und Kappen-Analoga	126
7 Methoden	131
7.1 Mikrobiologische Methoden	131

7.2	Molekularbiologische Methoden	132
7.3	Proteinbiochemische Methoden	143
7.4	Bi- und tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC/TetFC)	149
7.5	Durchflusszytometrie und Fluss-Sortierung	151
7.6	Biochemische Methoden	152
7.7	Chemische Methoden.....	153
8	Literaturangaben	155
9	Anhang.....	i
9.1	Entsorgung.....	i
9.2	Verwendete Gefahrstoffe nach GHS	i
9.3	Plasmidsequenzen	iv
9.4	Aminosäure-Sequenzen.....	xxii
9.5	RNA-Sequenzen	xxiii
	Danksagung	xxv
	Publikationen	xxvii
	Eidesstattliche Erklärung.....	xxix

Abkürzungsverzeichnis

a. u.	Willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AdoEnYn	5'-[(<i>R/S</i>)-[(3 <i>S</i>)-3-Amino-3-carboxypropyl]pent-2-en-4-ynylsulfonio]-5'-desoxyadenosin
AdoHcy	<i>S</i> -Adenosyl-L-Homocystein
AdoMet	<i>S</i> -Adenosyl-L-Methionin
AdoPropen	5'-[(<i>R/S</i>)-[(3 <i>S</i>)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-enylsulfonio]-5'-desoxyadenosin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARCA	Anti-Reverse Kappen-Analogon ($m^7(3'-O\text{-Methyl})GpppG$)
AS	Aminosäure
ATC	Anhydrotetracyclin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BFP	blau fluoreszierendes Protein
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-(1,3)-Cycloaddition
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DC	Doxycyclin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DFHBI	(<i>Z</i>)-4-(3,5-Difluoro-4-hydroxybenzyliden)-1,2-dimethyl-1 <i>H</i> -imidazol-5(4 <i>H</i>)-on
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DmPum	<i>Drosophila melanogaster</i> Pumilio

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECHO	<i>exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotide</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	verbessertes GFP (<i>enhanced GFP</i>)
eIF4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBF	fem-3 Binfaktor (<i>fem-3 binding factor</i>)
FI	Fluoreszenzintensität
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FIT	erzwungene Interkalation (<i>forced intercalation</i>)
FIVH	Fluoreszenz- <i>in vivo</i> -Hybridisierung
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FRT	Flippase-Erkennungssequenz (<i>flippase recognition target site</i>)
<i>g</i>	Gravitation
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GFP1-9	GFP β -Faltblätter 1-9
GHS	global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
GlaTgs2-V34A	<i>Giardia lamblia</i> Trimethylguanosinsynthase 2-Variante V34A
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HsPum1	<i>H. sapiens</i> Pumilio 1
IEC	Ionenaustauschchromatographie (<i>ion exchange chromatography</i>)
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid

ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KH	K Homologie
LNA	geschlossene Nukleinsäure (<i>locked nucleic acid</i>)
LuxS	S-Ribosylhomocystein Lyase
MC	Minocyclin
MCP	Hüllprotein des Bakteriophagen MS2
miRNA	micro RNA
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MTAN	5'-Methylthioadenosin/S-Adenosylhomocystein Nukleosidase
MTRIP	<i>multiply labeled tetravalent RNA imaging probe</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
NRE	<i>nanos response elements</i>
nt	Nukleotid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCP	Hüllprotein des Bakteriophagen PP7
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIN	PilT N-Terminus
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPR	Pentatricopeptid-Repeat
PUF	Pumilio und fem-3 mRNA Bindefaktor
Pum-HD	Pumilio Homologie-Domäne
Pum-Tgs	Fusionsprotein aus Pum-HD und GlaTgs2-V34A
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR

RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RP-HPLC	Umkehrphasen (<i>reversed-phase</i>)-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
RRM	RNA Erkennungsmotiv (<i>RNA recognition motif</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S10	GFP β -Faltblatt 10
S11	GFP β -Faltblatt 11
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
sfGFP	schnell faltendes GFP (<i>superfolder GFP</i>)
SPAAC	spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition
T203Y	Aminosäuresubstitution Threonin zu Tyrosin in Position 203
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TALEN	Transkriptionsaktivator-ähnliche Effektor nuklease
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TetFC	tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung
TFA	Trifluoressigsäure
TriFC	trimolekulare Fluoreszenzkomplementierung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trm1	tRNA (Guanin-26, N^2 - N^2) Methyltransferase
U	Einheit für die Enzymaktivität (<i>unit</i>)
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
Var1, Var2	Pumilio Variante 1, Pumilio Variante 2
w/v	Gewichtsprozent
wsGFP	<i>whole-split</i> GFP
wsYFP	<i>whole-split</i> YFP
WT	Wildtyp

X. laevis

Xenopus laevis

YFP

gelb fluoreszierendes Protein (*yellow fluorescent protein*)

Abstract

The discovery of asymmetrically localized eukaryotic mRNAs in various organisms has led to an increasing interest in the underlying mechanisms. Consequently, numerous RNA detection methods have been developed. Of particular interest are genetically encoded probes that hold the potential to be rationally designed. Tetramolecular fluorescence complementation (TetFC) is a method that meets these criteria; it combines the RNA-binding protein Pumilio homology domain (Pum-HD), which can be rationally designed to bind different RNAs sequence-specifically with a three-partite split-GFP.

In this thesis, a TetFC-based strategy for high throughput screening of Pum-HD variants *in vivo* was developed. In order to integrate TetFC into *E. coli* different approaches were pursued and temporally independent production of target RNA proved to be a suitable strategy. The TetFC-based screening strategy allowed the differentiation between the presence and absence of a target RNA and even discrimination between different RNA sequences.

Additionally, TetFC was expanded to a bicolor system which enabled *in vitro* differentiation of two closely related RNA sequences using different fluorescence signals. Alteration of the output signal was achieved by introducing a single amino acid substitution to one of the GFP fragments. The limit of detection was 16-32 nM. Specific detection of RNAs was also successful in presence of eukaryotic cell lysate and an excess of non-target RNA. However, in presence of Pum-HD variants that do not bind a certain RNA, specific RNA detection was also depending on the sequence of the target RNA, leading to the conclusion that the applied Pum-HD variants need to be chosen carefully for a bicolor TetFC.

Pum-HD was also explored as binding domain for sequence-specific RNA modification using *Giardia lamblia* trimethylguanosinesynthase 2 variant V34A (GlaTgs2-V34A). GlaTgs2-V34A catalyzes the transfer of the side chain from different AdoMet analogs to the 5'-cap of eukaryotic mRNAs. Recombinant protein production as well as purification of different Pumilio-GlaTgs2-V34A fusion proteins was successful, but a sequence-specific modification could not be observed.

In summary, the results of this thesis demonstrate the potential Pum-HD holds as a binding domain for future designer proteins. Identification of new variants with optimal binding specificity should be especially important for the diverse applicability of sequence-specific RNA detection or RNA modification in living cells.

Zusammenfassung

Die Entdeckung asymmetrisch verteilter eukaryotischer mRNAs in verschiedenen Organismen führte zu einem steigenden Interesse an den Mechanismen, die dieser Lokalisation zugrunde liegen und führte zur Entwicklung vielseitiger RNA-Detektionsmethoden. Von besonderem Interesse sind hierbei genetisch codierbare Sonden mit veränderbarer Spezifität. Ein System, das diese Kriterien erfüllt, ist die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC), welche die modulierbare Sequenzspezifität der Homologie-Domäne des RNA-bindenden Proteins Pumilio (Pum-HD) mit einem dreiteiligen grün fluoreszierenden Protein vereint.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf der TetFC eine Methode zum Hochdurchsatz-Screening von Pumilio-Varianten *in vivo* entwickelt. Hierzu wurden verschiedene Strategien verfolgt und eine zeitlich versetzte Produktion der Ziel-RNA als geeigneter Ansatz bestimmt. Anhand dieses Systems war es möglich, zwischen der An- und Abwesenheit der Ziel-RNA sowie zwischen unterschiedlichen RNA-Sequenzen zu unterscheiden.

Die TetFC wurde außerdem auf ein duales RNA-Detektionssystem ausgeweitet, mittels dessen die *in vitro* Unterscheidung zweier RNAs anhand unterschiedlicher Fluoreszenzsignale möglich war. Die Modifizierung des Signals wurde anhand der Verwendung einer Aminosäuresubstitution in einem der drei GFP-Fragmente realisiert. Die Nachweisgrenze des dualen TetFC-Systems betrug 16-32 nM. Die spezifische Detektion der einzelnen RNAs war zudem in Anwesenheit von eukaryotischem Zelllysat und bei einem Überschuss kompetitierender RNA gegeben. Die RNA-Detektion in Anwesenheit kompetitierender Pumilio-Varianten war nur teilweise erfolgreich und verdeutlichte die Wichtigkeit der Wahl geeigneter Pumilio-Kombinationen bei der dualen TetFC.

Darüber hinaus wurde die Anwendbarkeit der Pum-HD als Binde-Domäne für die sequenzspezifische Modifizierung in Kombination mit der *Giardia lamblia* Trimethylguanosin-synthase 2-Variante V34A (GlaTgs2-V34A) getestet, welche den Transfer funktioneller Gruppen von verschiedenen AdoMet-Analoga auf die 5'-Kappe eukaryotischer mRNAs erlaubt. Es konnten verschiedene Pumilio-GlaTgs2-V34A-Fusionsproteine rekombinant produziert und gereinigt werden; eine Sequenzspezifität bei der enzymatischen Modifizierung von mRNA war jedoch nicht gegeben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen das Potential der Pum-HD als Binde-Domäne in weiteren Designerproteinen. Insbesondere die Identifikation neuer Pum-HD-Varianten sollte in Zukunft zu einer vielseitigen Anwendbarkeit bei der sequenzspezifischen Detektion oder Modifikation von RNA in lebenden Zellen beitragen.

1 Einleitung

1.1 Motivation

Die Entdeckung der asymmetrischen Verteilung eukaryotischer mRNAs in einer Vielzahl polarisierter Zellen hat zu einem großen Interesse an der RNA-Biologie und an den ihr zugrundeliegenden Mechanismen geführt.^[1-6] Eine Studie zur RNA-Lokalisation in *Drosophila melanogaster* Embryonen ergab beispielsweise, dass bis zu 70 % der mRNAs lokalisiert vorliegen.^[7] Methoden, die zum Verständnis von RNA-Lokalisation und den hieraus resultierenden Konsequenzen beitragen, sind daher von großer Bedeutung. Zusätzlich ist vor allem eine simultane Detektion (Multiplexing) mehrerer Ziel-RNAs ausschlaggebend, um ein tiefgreifendes Verständnis über die komplexe Organisation subzellulär lokalisierter RNA zu erhalten.

In *Saccharomyces cerevisiae* spielt die mRNA *ASH1* eine essentielle Rolle bei der Regulierung des Paarungstyps in der nach Zellteilung erhaltenen Tochterzelle.^[3, 8, 9] Die mRNA β -Actin liegt lokalisiert in den Lamellipodien von Fibroblasten vor, wo ihre Translation für die Zytoskelett-vermittelte Beweglichkeit benötigt wird.^[5, 10] Als weitere Beispiele für die Lokalisation von mRNA sind *bicoid*, *nanos*, *oskar* und *gurken* zu nennen, deren korrekte Lokalisation von großer Wichtigkeit für die embryonale Entwicklung von *D. melanogaster* sind.^[11, 12]

Die Regulierung der Genexpression anhand lokalisierter RNA bietet diverse Vorteile. Sie ermöglicht die örtliche Regulierung der Genexpression und eine schnelle Reaktion auf äußere Stimuli.^[13] Zusätzlich wird ein mit einem hohen Energieverbrauch verbundene Transport der Proteine umgangen und potentiell schädigende Proteine werden lediglich an ihrem späteren Wirkungsort produziert.^[13] Zudem kann eine hohe lokale Proteinkonzentration förderlich für die Inkorporation bestimmter Proteine in größere Proteinkomplexe sein.^[14, 15] Der Mechanismus der subzellulären RNA-Lokalisation ist hierbei nicht auf Pilze, Pflanzen- und tierische Zellen beschränkt, sondern wurde auch in Bakterienzellen beschrieben.^[16-19]

Die subzelluläre RNA-Lokalisation kann anhand verschiedener Mechanismen erreicht werden. Hierzu zählen die lokale Stabilisierung durch Schutz vor mRNA-Degradation, die Verankerung frei diffundierender mRNAs durch lokalisierte Proteine sowie der aktive Transport entlang des Zytoskeletts.^[13] Die vorherrschenden Mechanismen zur Lokalisierung von *nanos* am posterioren Ende von *D. melanogaster* Oozyten stellen die lokale, Actin-abhängige Verankerung^[20] und die Translationsrepression außerhalb des Ortes der Lokalisation dar.^[21] Ebenfalls durch Actin verankert,

jedoch zuvor mittels aktivem Transport zum posterioren Ende lokalisiert, wird die mRNA *bicoid*.^[22] Die subzelluläre RNA-Lokalisation durch das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen wurde auch für *ASH1* in *S. cerevisiae* beschrieben: Zunächst findet hier ein Transport entlang des Actin-Zytoskeletts zur Spitze knospendender Zellen statt, bevor die RNA dann lokal verankert wird.^[23]

Das Prinzip der lokalen Translation ist außerdem in Neuronen von großer Wichtigkeit und hat einen direkten Einfluss auf die Hirnkapazität in Form von neuronaler Plastizität, Gedächtnis und der Lernfähigkeit.^[24-26] Als Beispiele lokalisierter mRNAs in Neuronen sind neben β -Actin die mRNAs *Arc* und *Camk2a* zu nennen, die an den Dendriten lokalisiert vorliegen.^[27, 28] Die Folgen inkorrekt lokalisierter mRNA wurden unter anderem mit der abnehmenden Regeneration von Axonen^[29] und neuronalen Krankheiten wie der spinalen Muskelatrophie,^[30] dem Fragiles-X-Syndrom^[31] oder Multiple Sklerose^[32, 33] assoziiert.^[34, 35] Im Falle der Störung der *Camk2a*-Lokalisation in den Dendriten hippocampaler Neuronen, wurde eine Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses festgestellt.^[36]

Aus diesem Grund ist insbesondere in den Fällen, in denen die Funktionsweisen und/oder Auswirkungen bestimmter RNAs bereits bekannt sind, nicht nur die Detektion, sondern auch die gezielte Manipulation von RNAs zwecks Krankheitsuntersuchung oder -behandlung von großem Interesse.

In den vergangenen Jahren wurden bereits diverse Methoden zur sequenzspezifischen Modifikation genomischer DNA etabliert. Basierend auf TALENs (Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektor nukleasen), Zinkfingerproteinen und insbesondere durch das *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas9-System eröffneten sich hierbei ganz neue Möglichkeiten für die gezielte Genmanipulation.^[37, 38] Für viele Anwendungen, wie der Behandlung bestimmter Krankheiten, ist es jedoch erstrebenswert spezifisch RNAs zu detektieren oder zu modifizieren.^[39-43] So gelten die sich wiederholenden (CUG)-Triplets in der 3'-untranslatierten Region der Myotonin-Proteinkinase RNA beispielsweise als Ursache für myotone Dystrophie Typ 1.^[43-46] Aus diesem Grund entwickelten Zhang *et al.* ein System zum gezielten Abbau dieser RNA.^[43] Hierbei erwiesen sich RNA-bindende Proteine mit einer modulierbaren Sequenzspezifität als außerordentlich nützlich. Sie erlauben es, verschiedene endogene RNAs ohne die Notwendigkeit zusätzlicher Tags oder *guide*-RNAs zu adressieren, wie es bei anderen Systemen der Fall ist.^[4, 47-50] RNA-bindende Proteine, die designt werden können um verschiedene RNAs zu binden, ergeben als Binde-

Domänen in Kombination mit verschiedenen Enzymen (= Effektor-Domänen) eine Vielzahl an möglichen sogenannten RNA-bindenden Designerproteinen. Von großem Vorteil sind hierbei solche Proteine, die eine rational modulierbare Sequenzspezifität aufweisen. Während diese Voraussetzung bei Zinkfingerproteinen, KH (K Homologie)-Domänen oder RRM (RNA *recognition motifs*) nicht gegeben ist, erscheinen insbesondere die PUF (Pumilio und fem-3 mRNA Bindefaktor)-Proteine mit ihrem Bindecodex geradezu prädestiniert für diese Anwendungen.^[51, 52] Durch die stetig steigende Anzahl verfügbarer Kristallstrukturen mit verschiedenen Ziel-RNAs steigt das Verständnis für die Sequenzspezifität und somit das Potential für die Adressierung verschiedenster RNAs.

1.2 Die Pumilio Homologie-Domäne

Die Pumilio Homologie-Domäne ist ein Charakteristikum der sogenannten PUF-Proteine, auf deren biologische Funktionen, die sequenzspezifische Bindung an RNA und die daraus resultierenden Möglichkeiten als Basis für verschiedene Designerproteine, in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

1.2.1 Die PUF-Proteinfamilie

Die Familie der PUF-Proteine erhielt ihren Namen basierend auf *Drosophila melanogaster* Pumilio (DmPum) und *Caenorhabditis elegans* fem-3 mRNA Bindefaktor (FBF).^[53, 54] Sie beinhaltet Proteine aus einer Vielzahl eukaryotischer Organismen; die Anzahl der einzelnen PUF-Proteine pro Organismus ist jedoch unterschiedlich.^[55] So wurden im Genom von *Arabidopsis thaliana* bis zu 26, in *C. elegans* elf, und in *Saccharomyces cerevisiae* sechs PUF-Gene identifiziert,^[56, 57] während in Säugetieren wie *Homo sapiens* und *Mus musculus* jeweils nur zwei PUF-Gene gefunden wurden.^[54-56] *D. melanogaster* und *Xenopus laevis* besitzen jeweils ein PUF-Gen.^[54-56, 58] Charakteristisch für die PUF-Proteine ist die im Allgemeinen im C-terminalen Bereich liegende Pumilio Homologie-Domäne (Pum-HD), welche üblicherweise aus acht sogenannten PUF-Repeats sowie aus jeweils einem N- und einem C-terminalen, flankierenden Pseudo-Repeat (Csp1 und Csp2) besteht.^[54, 55]

1.2.2 Biologische Funktionen der PUF-Proteine

Die PUF-Proteine weisen teilweise stark verwandte biologische Funktionen auf. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Entwicklung,^[53, 59-67] bei der Regulierung von Keimbahn-Funktionen^[54, 56, 61, 63, 64, 68-73] und der Instandhaltung von Stammzellen.^[56, 74-76] Außerdem zählen die Regulierung neurologischer Prozesse (Lernen, Gedächtnis, synaptische Plastizität),^[77-82] der mitochondrialen Biogenese,^[83-85] und des Zellzyklus^[86, 87] zu den Funktionen von PUF-Proteinen. Es

wurde postuliert, dass es sich bei der Aufrechterhaltung des mitotischen Potentials der Keimzellen um die ursprüngliche Funktion dieser Familie von RNA-bindenden Proteinen handelt, und dass sich weitere Funktionen nachträglich entwickelt haben.^[56, 88]

PUF-Proteine regulieren verschiedene Bereiche des RNA-Metabolismus und binden dabei mit hoher Affinität an 8-10 nt lange Regionen innerhalb der 3'-untranslatierten Region (UTR) verschiedener mRNAs.^[55, 89-92] Die Spezifität dieser Bindung wird in Kapitel 1.2.3 näher erläutert.

Das klassische Beispiel für die posttranskriptionale Regulation durch PUF-Proteine ist die Unterdrückung der Translation der *hunchback (hb)* mRNA in *D. melanogaster* Embryonen.^[53, 62] Für die korrekte abdominale Entwicklung ist eine Lokalisation des hb-Proteins im anterioren Bereich des Embryos bei gleichmäßiger Konzentration der *hb*-mRNA nötig.^[93, 94] Dieser Gradient wird dadurch erzielt, dass eine hohe Konzentration des Zinkfingerproteins Nanos am posterioren Ende vorliegt.^[95-97] Zusammen mit Pumilio, welches ebenfalls gleichmäßig im Embryo konzentriert vorliegt, bindet Nanos an die *nanos response elements* (NRE) in der 3'-untranslatierten Region der *hb*-mRNA.^[53, 59, 66, 98, 99] Dieser ternäre Komplex wiederum rekrutiert das Protein Brat (*brain tumor*), welches mit dem *Drosophila* Analog des eukaryotischen Initiationsfaktor 4E homologen Protein (d4EHP) interagiert, wodurch die Expression des *hunchback*-Genes unterdrückt wird.^[67, 100]

Die Inhibierung der Expression durch PUF-Proteine kann außer durch Rekrutierung von Faktoren, welche die Translationsinitiation beeinträchtigen,^[101, 102] anhand verschiedener Mechanismen wie der Deadenylierung^[73, 87, 102-105] oder dem Entfernen der 5'-Kappe der mRNA erfolgen.^[73, 105, 106]

Die Unterdrückung der Genexpression im Zusammenhang mit einer Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes wurde in verschiedenen Organismen beobachtet.^[65, 101, 102, 107, 108] Es konnte gezeigt werden, dass die Pum-HD sowohl in *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, als auch in *H. sapiens* an Orthologe der Poly(A) Exonuklease Pop2, eine Untereinheit des Pop2-Ccr4 Exonuklease Komplex, bindet.^[73, 87, 103, 104] Dies führte zu der Hypothese, dass PUF-Proteine durch Rekrutierung dieses Enzyms die Translation der Ziel-mRNA regulieren.^[73, 87, 102-104] Zusätzlich zu diesem Mechanismus offenbarte sich auch eine Deadenylase-unabhängige Inhibierung der Expression in *S. cerevisiae* und *D. melanogaster*.^[86, 101, 102] Im Falle von *D. melanogaster* sind Pop2 und Ccr4 nicht für die Regulierung notwendig, sondern DmPum interagiert vielmehr mit dem Poly(A)-bindenden Protein (PABP) und verhindert so die Initiierung der Translation, ohne die Bindung von PABP an die mRNA zu beeinträchtigen.^[102] Diese PABP-Abhängigkeit war zuvor bereits in Hefe gezeigt worden.^[109]

Ein weiteres Beispiel für die PUF-abhängige posttranskriptionalen Regulation stammt aus *S. cerevisiae*. Hier begünstigen sowohl Puf4p als auch Puf5p die Deadenylierung von mRNA.^[106] Während für die Puf4p-abhängige Translationsunterdrückung Pop2 und Ccr4 essentiell sind, kann Puf5p die Translation Pop2-unabhängig inhibieren, indem es die eIF4E-Bindeprotein (EAP1)-vermittelte Entfernung der 5'-Kappe der mRNA auslöst.^[86, 102, 105, 106]

Als Target von Puf6p wurde der eukaryotische Initiationsfaktor 5B (eIF5B) identifiziert, wodurch sich eine weitere Möglichkeit zur Translationsinhibierung ergibt.^[110] In *C. elegans* und *H. sapiens* wurde zudem ein Zusammenhang zwischen der Interaktion von PUF-Proteinen mit mRNAs und dem regulatorischen Effekt von microRNA (miRNA) beschrieben.^[111-114] Zusätzlich zur Translationsinhibierung durch die Pum-HD wurden in eukaryotischen Systemen weitere Domänen im N-terminalen Bereich der PUF-Proteine gefunden, die unabhängig von der Pum-HD die Unterdrückung der Genexpression vermitteln können.^[99] Weitere Studien, die diese unterschiedlichen Modelle untermauern und die genauen Mechanismen inklusive weiterer Cofaktoren entschlüsseln, stehen jedoch noch aus.

Neben der posttranskriptionalen Repression zählen auch die translationale Aktivierung^[103, 115-117] sowie die RNA-Lokalisation zu den – wenn auch weniger prominenten – Funktionen der PUF-Proteine. Ein Beispiel für ein PUF-Protein mit aktivierender Funktion ist FBF, welches in der *C. elegans* Keimbahn die Aktivierung der mRNA *gld-1* bewirkt.^[103] Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass FBF für die Rekrutierung der cytoplasmatischen Poly(A)-Polymerase GLD-2/GLD-3 verantwortlich ist und so die Stabilität der Ziel-RNA erhöht.^[103, 118] Eine PUF-vermittelte Lokalisation findet beispielsweise in *S. cerevisiae* statt, wo Puf3p mit mitochondrialen mRNAs interagiert und zu deren Lokalisation beiträgt.^[83, 84, 119]

Schätzungen zufolge, können etwa 7-15 % des Transkriptoms durch PUF-Proteine reguliert werden.^[107, 114, 120, 121] Dabei kann ein einziges PUF-Protein hunderte Targets und, abhängig von der Ziel-RNA, verschiedene Funktionen haben.^[107, 114, 121-126] Auf die Voraussetzungen für diese Promiskuität wird in Kapitel 1.2.4 näher eingegangen.

1.2.3 Struktur der PUF-Proteine und Identifizierung und Anwendung des Pumilio-Bindecodes

Kristallstrukturen der Pum-HD von DmPum und *H. sapiens* Pumilio 1 (HsPum1) aus dem Jahre 2001 zeigten, dass acht sogenannte PUF-Repeats zusammen mit den N- und C-terminal flankierenden

Bereichen eine sichelförmige Struktur bilden (Abbildung 1.1A), welche etwa 124-180 ° eines Kreises mit einem Radius von etwa 42 Å abdeckt.^[127, 128] Jeder der acht PUF-Repeats ist aus einer kürzeren (H2) und zwei längeren α -Helices (H1, H3) aufgebaut, welche zusammen die Form eines Dreiecks einnehmen.^[127, 128] Die Kristallstruktur der HsPum1-HD im Komplex mit einer RNA (Bindemotiv: 5'-UGUAUAUA-3') bestätigte, dass die RNA von der konkaven Fläche der Domäne gebunden wird.^[90, 127, 128] Zudem konnte gezeigt werden, dass die Bindung der RNA antiparallel erfolgt (3'-Ende am N-Terminus, Abbildung 1.1A).^[90]

Die allgemeine der HsPum1-HD erkannte RNA-Sequenz lautet 5'-UGUANAUA-3', mit N = A, U oder C.^[114] Wang *et al.* konnten eindrucksvoll zeigen, dass die einzelnen RNA-Basen spezifisch mit jeweils drei konservierten Aminosäuren interagieren und die einzelnen PUF-Repeats durch gezielte Aminosäuresubstitutionen an RNAs mit einer anderen Sequenz binden.^[90, 129]

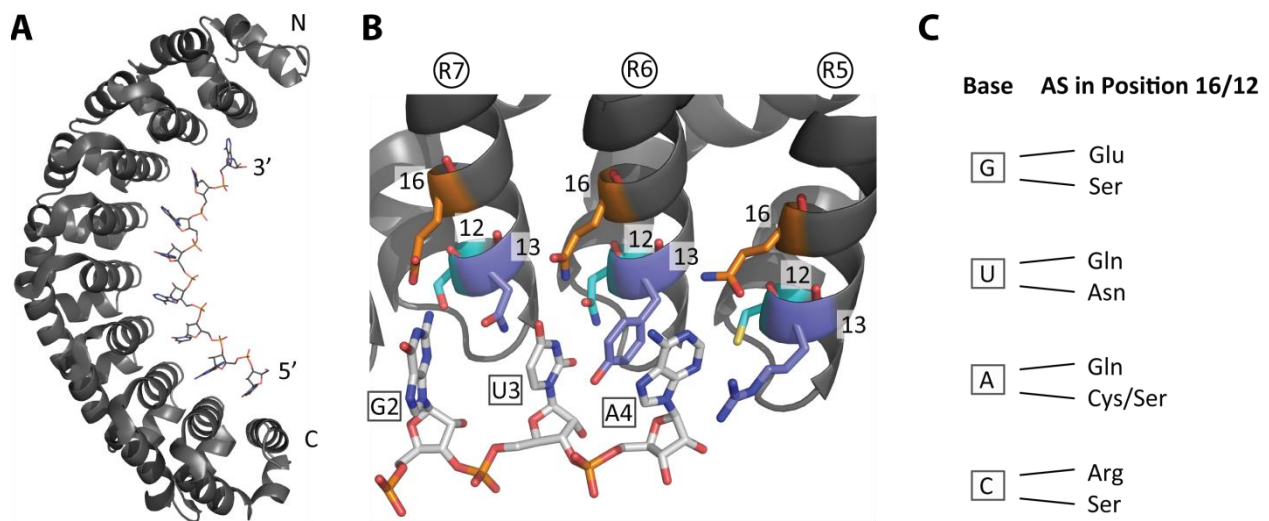


Abbildung 1.1: Sequenzspezifische Bindung der Pum-HD an RNA. (A) Dargestellt ist die HsPum1-HD (grau) in Komplex mit den sequenzspezifisch gebundenen acht Nukleotiden der RNA hb NRE1 (sticks).^[57] Die Bindung der RNA erfolgt antiparallel.^[90] (B) sequenzspezifische Interaktion von drei PUF-Domänen mit G2, U3 und A4 der Ziel-RNA.^[57] RNA und beteiligte Aminosäuren sind als Sticks dargestellt (cyan: Position 12, blau: Position 13, orange: Position 16).^[57] (C) Pumilio-Bindecode. Guanin (G) wird von Glutaminsäure (Glu) und Serin (Ser) erkannt, Uracil (U) von Glutamin (Gln) und Asparagin (Asn), Adenin (A) von Glutamin (Gln) und Cystein (Cys) oder Serin (Ser), und Cytosin von Arginin (Arg) und Serin (Ser).^[90, 130, 131] PDB-ID der Struktur in (A) und (B): 3Q0P.^[57] Abbildung nach Wang *et al.*^[132]

Die an der Bindung der Nucleobasen beteiligten drei Aminosäuren befinden sich jeweils an den Positionen 12, 13 und 16 der PUF-Repeats (Abbildung 1.1B) und sind somit in der α -Helix H2 lokalisiert.^[90] Zwei von ihnen (Positionen 12 und 16) interagieren anhand von Wasserstoffbrückenbindungen oder van-der-Waals-Kräften mit der Watson-Crick-Kante der Nucleobase, während eine dritte Aminosäure (Tyrosin, Histidin, Arginin oder Asparagin, Position 13)

mittels π - π -Wechselwirkungen mit dem aromatischen System der RNA-Base zur Bindung der RNA beiträgt.^[90] Mit Ausnahme von Asparagin in PUF-Repeats 7 (dessen Seitenketten zu kurz für eine entsprechende Interaktion ist), sind diese Aminosäuren zwischen die Basen der RNAs gestapelt (Abbildung 1.1B).^[90] Die Protein-RNA-Bindung folgt somit einer 1:1 Interaktion, bei der jeweils ein PUF-Repeat eine RNA-Base erkennt. Aufgrund der antiparallelen Bindung der Pum-HD an die RNA erfolgt die Erkennung der ersten Nucleobase durch PUF-Repeat 8 (Abbildung 1.1A, Abbildung 1.2).^[90] Die Sequenzspezifität der Bindung wird durch die beiden Aminosäuren vermittelt, die mit der Watson-Crick-Kante der RNA-Base wechselwirken. Eine Kombination aus Glutamin (Gln) und Asparagin (Asn) erkennt Uracil (U), Glutaminsäure (Glu) und Serin (Ser) erkennen Guanin (G), und Adenin (A) wird von Glutamin und Cystein (Cys)/Serin erkannt (Abbildung 1.1B,C).^[90]

Ausgehend von diesem Bindecode wurden diverse Varianten der HsPum1-HD hergestellt, bei denen die Spezifität für eine oder mehrere Positionen variiert wurde.^[39-41, 90, 129, 131, 133-135] Um die von der HsPum1-HD gebundene Sequenz UGUAUAUA (5'→3') beispielsweise an Position 2 von G zu U (UUUAUAUA, G2U RNA) zu verändern, wurden in PUF-Repeat 7 die Substitutionen Glu1083Gln und Ser1079Asn eingeführt.^[129] Die resultierende Variante Mut7-2 wies in Kombination mit der Ziel-RNA G2U eine Dissoziationskonstanten (K_D) von 6.0 ± 1.3 nM auf und band RNA G2U somit 25-fach stärker als die Wildtyp (WT)-RNA ($K_D = 150 \pm 28$ nM). Die WT HsPum1-HD zeigte eine deutlich schwächere Bindung zur RNA G2U ($K_D = 59 \pm 12$ nM), im Vergleich zur Bindung an WT RNA ($K_D = 0.48 \pm 0.21$ nM).^[129] Analog wurden weiteren Varianten generiert, deren Spezifität von A zu G, von A zu U und von U zu G geändert wurde.^[90, 129] Die Spezifitätsänderung sowohl von A zu G, bei der lediglich der Aminosäureaustausch von Glutamin zu Glutaminsäure vorgenommen wurde, als auch von A zu U, lieferte jedoch Varianten, die weiterhin eine vergleichsweise hohe Affinität zur WT RNA aufwiesen ($K_D = 2.8$ -190 nM).^[129]

Der Bindecode für – bei den natürlich vorkommenden Ziel-RNAs der typischen PUF-Proteine nicht vorhandene – Cytosin (C) wurde 2011 von zwei Gruppen publiziert.^[130, 131] Basierend auf der HsPum1-HD stellten sie DNA-Bibliotheken mit randomisierten Codons für die Aminosäurepositionen 12 und 16 her, welche für die sequenzspezifische Erkennung der Nucleobasen verantwortlich sind.^[90, 130, 131] Das Überleben der einzelnen Klone wurde mittels Hefe-Drei-Hybrid-System an die Interaktion der Pum-HD mit der Ziel-RNA geknüpft.^[130, 131] Filipovska *et al.* beobachteten eine sequenzspezifische Erkennung von Cytosin in Anwesenheit einer kleinen oder nukleophilen

Aminosäure (Glycin, Alanin, Serin, Threonin oder Cystein) an Position 12 und Arginin an Position 16.^[130] Dong *et al.* verwendeten stringenter Selektionsbedingungen und identifizierten eine Kombination aus Serin und Arginin zur spezifischen Bindung von Cytosin (Abbildung 1.1C).^[131] Interessanterweise identifizierten Zhang und Muench vier Jahre später mit *A. thaliana* APUM23 tatsächlich ein – wenn auch atypisches – PUF-Protein, das natürlicherweise Cytosin bindet.^[136] Die Aminosäurekombination Serin/Arginin zur Bindung von Cytosin wurde hierbei bestätigt.^[130, 131, 136] Erst kürzlich wurde zudem in einer umfangreichen Studie die natürliche Binde-spezifität der Pum-HD von insgesamt 94 PUF-Proteinen verschiedener Organismen evaluiert, welche überwiegend mit der des Pumilio-Bindecodes (basierend auf HsPum1-HD^[90]) übereinstimmte.^[42] Diese modulierbare Sequenzspezifität der Pum-HD ist außergewöhnlich. Andere RNA-bindende Proteine, wie die verschiedenen Typen der Zinkfingerproteine, die RRM (RNA *recognition motif*)-Proteine, oder die KH (K Homologie)-Domänen weisen mitunter ebenfalls eine Sequenzspezifität auf.^[137] Im Unterschied zur Pum-HD, lassen sich diese Proteine jedoch nicht rational designen.^[137] Eine Ausnahme bilden die vor weniger als zwei Jahrzehnten in Pflanzen entdeckten Pentatricopeptid-Repeat (PPR)-Proteine.^[138, 139] Ähnlich wie die Pum-HD enthalten sie konservierte Motive, von denen jeweils zwei definierte Aminosäuren für die sequenzspezifische Bindung einer Nucleobase verantwortlich sind.^[140-142] Im Unterschied zu den PUF-Proteinen sind sie jedoch weniger intensiv erforscht und es ist keine Anwendung der PPR-Proteine als Binde-Domäne in Designer-Proteinen bekannt.^[52, 140, 143]

1.2.4 Alternative Binde-Modi

Die Bindung der PUF-Proteine an endogene mRNAs ist komplexer als der Pumilio-Code (Kapitel 1.2.3) zunächst vermuten lässt. Aufgrund der hohen Anzahl möglicher Ziel-RNAs eines einzigen Proteins^[107, 114, 121-126] ist eine Varianz der Bindung nötig, welche durch Interaktion mit weiteren Proteinen,^[120] oder durch verschiedene Binde-Modi realisiert wird. Diese Promiskuität bei der Bindung verschiedener Ziel-RNAs spiegelt sich in den vielfältigen Funktionen der PUF-Proteine (Kapitel 1.2.2) wider. Kristallstrukturen weiterer PUF-Proteine zeigten, dass lediglich eine Konsensussequenz von UGU am 5'-Ende vollständig konserviert ist.^[57] Sowohl *S. cerevisiae* Puf4p als auch *C. elegans* FBF, PUF-5 und PUF-6 bevorzugen neun bis zehn statt der acht Nukleotide des allgemeinen Pumilio-Bindecodes (Kapitel 1.2.3).^[91, 92, 119] Da die Proteine jeweils acht PUF-Repeats aufweisen, liegt hier eine andere, als die allgemeine 1:1 Interaktion vor.^[54, 91, 92, 119, 144] Es wurden

verschiedene Möglichkeiten identifiziert, wie die zusätzliche(n) RNA-Base(n) untergebracht werden.^[144]

Im Unterschied zu anderen PUF-Proteinen, besitzt FBF 16 zusätzliche Aminosäuren im zentralen Bereich des Proteins.^[91] Um die damit einhergehende Strukturveränderung zu kompensieren, wird eine 9 nt lange Sequenz bevorzugt, bei der die Nucleobasen der Positionen 4-6 (Abbildung 1.1A) direkt übereinander gestapelt und vom Protein weggedreht vorliegen.^[91, 145] Puf4p toleriert ebenfalls eine zusätzliche Nucleobase: Uracil in Position 7.^[119, 146] Auch in diesem Fall findet keine Interaktion mit dem Protein, sondern ein Wegdrehen von diesem statt.^[146]

Erst kürzlich publizierten Wilinski *et al.* die von Puf5p gebundenen RNA-Sequenzen und machten dabei die interessante Entdeckung, dass diese nicht nur in ihrer Länge von 8-12 nt variierten, sondern dass die Vielfalt in direktem Zusammenhang mit der biologischen Funktion der Ziel-mRNAs steht.^[124] Analog zu dem klassischen PUF-Bindemotiv (5'-UGUAUAUA-3') enthielten die Bindestellen von Puf5p sowohl 5'-UGUA als auch UA-3', und hauptsächlich A und U im mittleren Bereich; die Länge dieses Bereichs variierte jedoch.^[124] Kristallstrukturen mit 9-12 nt langen RNAs demonstrierten, dass die zusätzlichen Nucleobasen entweder lediglich mittels van-der-Waals-Wechselwirkungen, aber nicht mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit dem PUF-Repeats interagierten, oder bis zu drei gestapelte Nucleobasen ganz von Puf5p weggedreht wurden.^[124]

Eine weitere Möglichkeit zur Spezifitätserweiterung lässt sich am Beispiel von Puf3p erklären. Puf3p bindet vorwiegend RNA-Sequenzen, die zusätzlich Cytosin in Position -2 enthalten (5'-CXUGUAUAUA-3', X = beliebige Nucleobase).^[119, 126] Im Vergleich zu HsPum1-HD oder Puf4p, liegen bei Puf3p der PUF-Repeat 8 und der C-terminale Pseudo-Repeat weiter auseinander, wodurch sich an dieser Stelle eine sogenannte C-Bindetasche ergibt, die sequenzspezifisch Cytosin bindet.^[126] Diese Präferenz für Cytosin außerhalb der 8 nt Konsensussequenz wurde zusätzlich bei *C. elegans* FBF-2, PUF-6 und PUF-11 beobachtet.^[147]

HsPum1-HD und HsPum2-HD binden an dieselbe Konsensussequenz (5'-UGUANAUA-3'), wobei in Position 5 gleichermaßen Adenin, Uracil oder Cytosin toleriert werden.^[57, 114, 121, 123] Lu und Hall untersuchten die Bindung verschiedener Ziel-RNAs und identifizierten, in Abhängigkeit von der fünften Nucleobase, drei verschiedene RNA-Konformationen.^[57] Uracil in dieser Position wird, wie zuvor beschrieben, durch Interaktion mit der Watson-Crick-Kante erkannt^[90] (Kapitel 1.2.3), während Adenin oder Guanin anhand von Wechselwirkungen mit der Hoogsteen-Kante gebunden werden.^[57] Die Konformationen der RNA wurden entsprechend als C3'-endo und C2'-endo

definiert.^[57, 148] In beiden Fällen handelt es sich um eine 1:1 Interaktion zwischen PUF-Repeat und Nucleobase.^[57, 90] Bei Anwesenheit von Cytosin in Position 5 im Komplex mit HsPum1-HD oder HsPum2-HD liegt hingegen keine 1:1 Interaktion vor, da die Nucleobase nicht mit dem Protein interagiert („*base omission*“).^[57] Die Autoren sehen diese Promiskuität als elegante Möglichkeit an, um anhand verschiedener Konformationen der Komplexe von einem Protein mit verschiedenen RNAs unterschiedliche Cofaktoren zu rekrutieren.^[57, 148]

Ein weiterer interessanter Fall ist das humane Protein Puf-A. Hier wurden sechs PUF-Repeats vorhergesagt, Kristallstrukturanalysen demonstrierten jedoch elf PUF-Repeats, und eine L-förmige Struktur des Proteins.^[149] Anders als die Pum-HD weist Puf-A eine sequenzunabhängige Bindung von sowohl RNA als auch DNA auf, und zählt daher nicht zu den typischen PUF-Proteinen.

1.2.5 Golden-Gate-Klonierung zur Generierung verschiedener Pum-HD-Varianten

Der vollständige Pumilio-Bindecode (Abbildung 1.2C) ermöglicht theoretisch eine Unterscheidung von $4^8 = 65\,536$ unterschiedlichen RNA-Sequenzen. Um die entsprechenden Pum-HD-Varianten zu erhalten, können die einzelnen Mutationen nacheinander auf DNA-Ebene eingeführt werden.^[39, 40, 43, 90, 129-131, 133]

Eine elegantere Möglichkeit ist jedoch, sich den modularen Aufbau der Domäne zu Nutze zu machen und die einzelnen Repeats zu der gewünschten Pum-HD-Variante zu kombinieren. Die Golden-Gate-Klonierung ist eine solche „Ein-Gefäß“-Methode, die es anhand einer Typ IIS-Restriktionsendonuklease (schneidet außerhalb ihrer Erkennungssequenz) ermöglicht, mehrere Module in einem Schritt in der gewünschten Reihenfolge zu verbinden.^[150, 151] Diese Art der Klonierung wurde bereits erfolgreich zur Generierung verschiedener TALENs verwendet.^[152] Abil *et al.* entwickelten diese Strategie weiter, indem sie eine Plasmid-Bibliothek erstellten, die die genetische Informationen für die Bindung jeder beliebigen RNA-Base durch jedes der acht PUF-Repeats enthält.^[153] Da für die Erkennung von Cytosin in Position 6 (durch Modul 3SR) zusätzlich Tyrosin (Y) in PUF-Repeat 4 benötigt wird, wurden für diesen Fall zusätzliche vier entsprechende Module generiert (4SYE, 4NYQ, 4CYQ oder 4SYR). Nach Auswahl der benötigten acht Repeats müssen diese lediglich zusammen mit Plasmid pET-GG-PUF, welches die N- und C-terminal flankierenden Bereiche Csp1 und Csp2 enthält, mit demselben Typ II-Restriktionsenzym restringiert und anschließend ligiert werden (Abbildung 1.2).^[153]

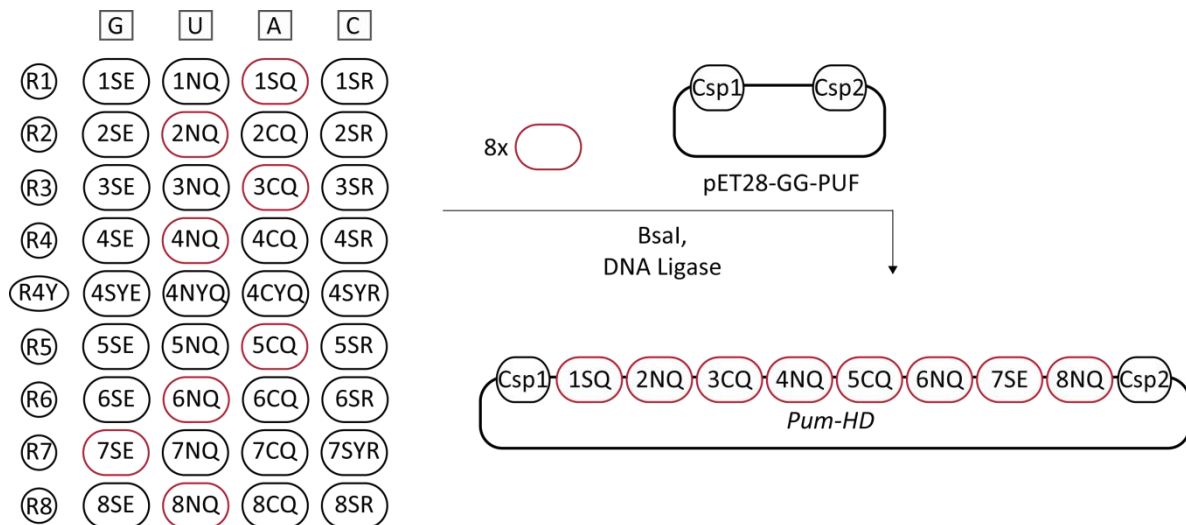


Abbildung 1.2: Golden-Gate-Klonierung der Pum-HD. Gemäß dem Pumilio-Bindecode wird Guanin (G) von Serin (S) und Glutaminsäure (E), Uracil (U) von Asparagin (N) und Glutamin (Q), Adenin (A) von Cystein (C) oder Serin (S) und Glutamin (Q), und Cytosin von Serin (S) und Arginin (R) erkannt.^[90, 130, 131] Dargestellt sind die benötigten Module zur Erkennung der vier Nucleobasen G, U, A oder C von jedem der acht PUF-Repeats (R1-R8) sowie vier zusätzliche Repeats bei Verwendung von Modul 3SR (4SYE, 4NYQ, 4CYQ, oder 4SYR). Rote Ovale geben die Module der WT Pum-HD an. Jedes Modul ist auf einem separaten Plasmid codiert. Zur Generierung eines Pum-HD-Konstrukts (hier: WT Pum-HD) werden die entsprechenden acht Plasmide sowie Plasmid pET-GG-PUF (enthält die N- und C-terminal flankierenden Bereiche Csp1 und Csp2) mittels Typ IIS-Restriktionsendonuklease BsaI restringiert und anhand einer DNA-Ligase ligiert. Abbildung nach Abil *et al.*^[153]

1.2.6 Die Pum-HD als Binde-Domäne in vielseitig einsetzbaren Designerproteinen

Die außergewöhnliche Fähigkeit der PUF-Proteine, ihre Ziel-RNAs sequenzspezifisch zu binden, und die Modulierbarkeit dieser Proteine machen sie zur perfekten Binde-Domäne für die sequenzspezifische Detektion und Modifikation von RNA. Seit der Aufklärung des Pumilio-Bindecodes sind bereits zahlreiche Fusionsproteine aus Pum-HD und verschiedenen Effektor-Domänen beschrieben worden.^[39-41, 43, 51, 90, 130, 131, 133, 154, 155] Diese sogenannten Designerproteine reichen in ihrer Anwendung von der Fluoreszenzmarkierung von RNA bis hin zum potentiellen Einsatz in der Gentherapie.^[39-41, 43]

Die naheliegende Anwendung von Pum-HD Designerproteinen ist die sequenzspezifische Detektion und Lokalisation von RNA in Kombination mit (auto)fluoreszierenden Proteinen (siehe Kapitel 1.3.3). In weiteren Anwendungen wurde eine Reihe verschiedener Effektor-Domänen mit der Pum-HD kombiniert, wodurch eine breite Palette von RNA-modifizierenden Designerproteinen entstand. Zwei der ersten verwendeten Effektor-Domänen waren Proteine, die das Spleißen von prä-mRNA regulieren.^[51] Viele alternative Spleißfaktoren besitzen Arginin/Serin (RS)-reiche Domänen, die das Einschließen von Exon-Kassetten bewirken.^[156] Durch Fusionierung der RS-Domänen an die HsPum1-HD, konnte eine Steigerung des Exon-Einschlusses bei der humanen prä-mRNA *Bcl-X*

erreicht werden (Abbildung 1.3G).^[51] Der entgegengesetzte Effekt wurde erreicht, indem die Glycin (Gly)-reiche Domäne des heterogenen nukleären Ribonukleoprotein A1 verwendet wurde, welche den spezifischen Ausschluss der Exons ermöglichte (Abbildung 1.3F).^[51] Dies konnte bereits gezeigt werden, bevor der vollständige Bindecode der Pum-HD entschlüsselt war. Nachdem die Aminosäuren für die spezifische Bindung von Cytosin identifiziert worden waren,^[130, 131] wurden die RS- und die Gly-Domäne mit neuen Pum-HD-Varianten kombiniert, die spezifisch an die prä-mRNA des Wachstumsfaktors VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) binden.^[131] Diese prä-mRNA wird umfangreich gespleißt, wodurch verschiedene Isoformen entstehen. Die Isoform a wird mit soliden Tumoren in Verbindung gebracht, während Isoform b eine gesteigerte Antiangiogenese bewirkt.^[131, 157, 158] Durch Fusionierung der Gly- und RS-reichen Domänen mit entsprechenden HsPum1-HD-Varianten, gelang es den Autoren die Bildung der nicht-angiogenetischen Isoform b zu begünstigen.^[131] GLD2 und CAF1b, zwei Enzyme, die die Länge des Poly(A)-Schwanzes und somit die Stabilität und Translation der mRNA regulieren, sind ebenfalls erfolgreich als Effektor-Domänen verwendet worden.^[154]

Die cytoplasmatische Poly(A)-Polymerase GLD2 aus *C. elegans* wurde an FBF-2 (ebenfalls aus *C. elegans*) fusioniert und steigerte die Translation einer mikroinjizierten Ziel-mRNA mit entsprechender FBF-2-Bindestelle in *X. laevis* Oozyten durch Polyadenylierung des 3'-Endes (Abbildung 1.3A).^[154] Eine Polyadenylierung endogener mRNA wurde ebenfalls beschrieben.^[154] Der entgegengesetzte Effekt, die Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes und folglich die Verringerung der Translation, wurde anhand der Kombination aus *X. laevis* Deadenylase CAF1b und FBF-2 erreicht (Abbildung 1.3B).^[154]

Bei einer weiteren Methode zur Regulation der RNA-Translation wurde der eukaryotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E) genutzt.^[155] Dieser ist essentiell für die Rekrutierung zusätzlicher Initiationsfaktoren an die 5'-Kappe der reifen mRNA, kann jedoch auch eine Kappen-unabhängige Translation initiieren.^[155, 159, 160] Als Fusionskonstrukt mit HsPum1-HD steigerte eIF4E die Expression eines Reporter-Gens in den humanen embryonalen Leberzellen 293T (HEK 293T) (Abbildung 1.3C).^[155] Um eine Hemmung der Translation zu erreichen, genügte die Bindung der PUF-Domäne ohne zusätzliche Effektor-Domäne innerhalb der 5'-UTR desselben Reporter-Konstrukts (Abbildung 1.3E).^[153, 155] Um diesen Effekt noch zu steigern, fusionierten Abil *et al.* verschiedene Pum-Varianten an die katalytische Domäne des posttranskriptionalen Regulators Tristetraprolin und demonstrierten die Regulation von Reporter-RNAs in HeLa Zellen.^[153]

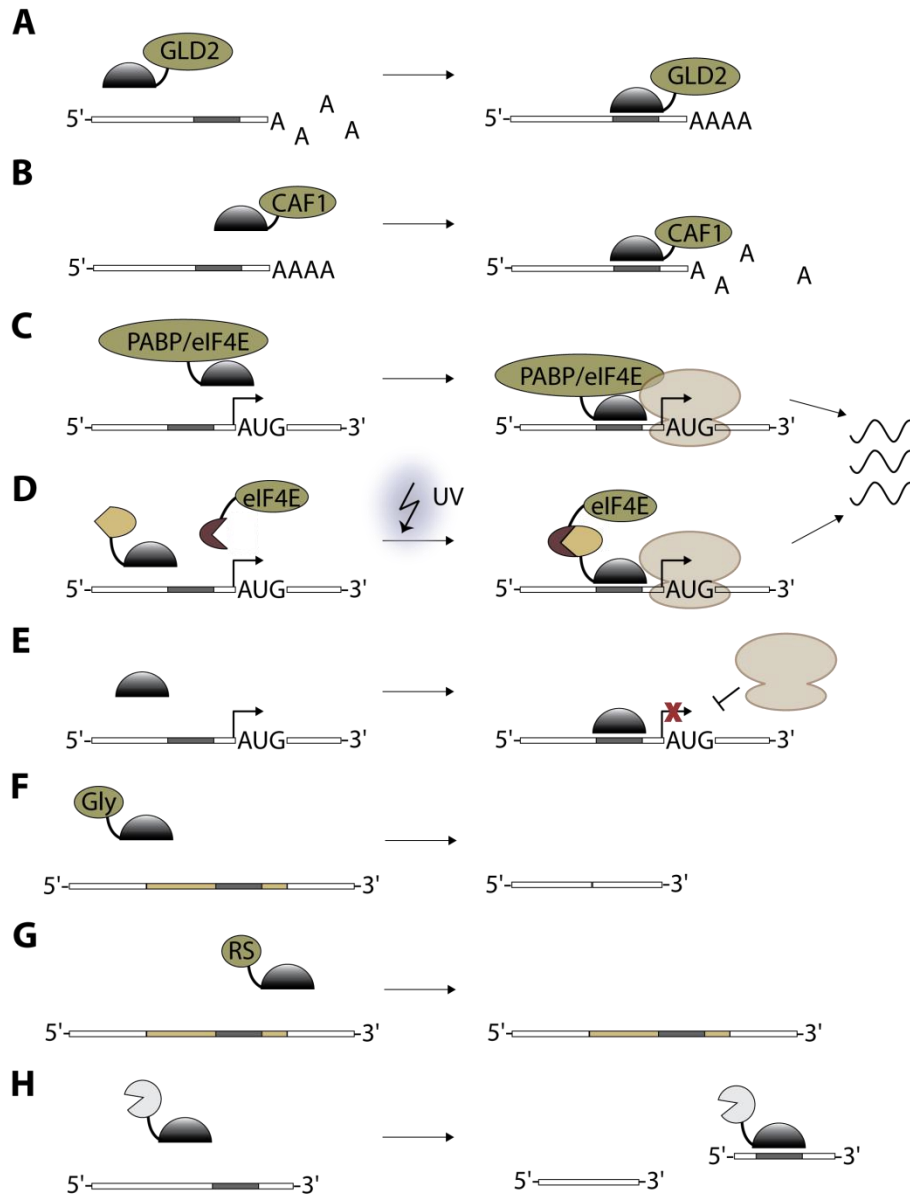


Abbildung 1.3: Pum-HD-basierte Designerproteine und ihre Funktionen. (A) Polyadenylierung des mRNA-3'-Endes durch Fusion von *C. elegans* Poly(A)-Polymerase GLD2 mit FBF-2.^[154] (B) Deadenylierung des mRNA-3'-Endes basierend auf *X. laevis* Deadenylase CAF1b und FBF-2.^[154] (C) Translationssteigerung durch Fusionierung eines 20 kDa Fragments des Poly(A)-bindenden Proteins (PABP) mit einer FBF-2-Variante, oder des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E (eIF4E) mit HsPum1-HD.^[42, 155] (D) Licht-induzierte Aktivierung der Genexpression unter Verwendung von eIF4E, HsPum1-HD und der verkürzten Varianten von *A. thaliana* Cryptochrom 2 und *cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix* 1.^[155] (E) Translationsinhibition basierend auf der Bindung von HsPum1-HD innerhalb der 5'-UTR.^[155] (F, G) Regulierung von Spleißvorgängen. Die Fusionierung einer Glycin (Gly)-reichen Domäne des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins A1 an eine Pum-HD-Variante bewirkte einen spezifischen Ausschluss der Exons (F).^[51] Eine Fusion mit einer Arginin/Serin (RS)-reichen Domäne bewirkte eine Steigerung des Exon-Einschlusses (G).^[51] (H) Sequenzspezifische Restriktion von RNA durch Kombination des humanen SMG6 PiT N-Terminus (PIN-Domäne) mit der Pum-HD.^[133]

Die Anzahl der PUF-Bindestellen der Ziel-RNA hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung der Translation, zeigte jedoch einen starken Effekt bei der Translationshemmung.^[153, 155] Zudem gelang

die individuelle Translationsinhibierung einzelner Cistronen einer polycistronischen Reporter-RNA in *Escherichia coli*.^[161]

Cao *et al.* demonstrierten außerdem eine Licht-induzierte Aktivierung der Genexpression.^[155] Hierzu wurden eIF4E und HsPum1-HD mit verkürzten Varianten zweier Proteine fusioniert (*A. thaliana* Cryptochrom 2 (CRY2) und *cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1* (CIB1)), die bei Bestrahlung mit blauem Licht miteinander interagieren (Abbildung 1.3D).^[155, 162]

Einen weiteren Ansatz zur Translationserhöhung eines bestimmten Transkripts wählten Campbell *et al.*, indem sie ein 20 kDa Fragment des Poly(A)-bindenden Proteins (PABP) mit einer FBF-2-Variante fusionierten (Abbildung 1.3C).^[42] Sie erzielten auf diese Weise eine erhöhte Konzentration an Cyclin B, was bestimmte Krebszelllinien empfindlicher gegenüber Chemotherapeutika macht.^[42, 163]

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage DNA sequenzspezifisch zu spalten; sequenzspezifische Enzyme zur Restriktion von RNA sind jedoch nicht bekannt.^[133, 164] Choudhury *et al.* adressierten dies und entwickelten eine sequenzspezifische RNA-Endonuklease basierend auf dem humanen SMG6 PilT N-Terminus (PIN-Domäne), der eine unspezifische Endonuklease-Aktivität aufweist, in Kombination mit der HsPum1-HD (Abbildung 1.3H).^[133] Auf diese Weise konnten sie nicht nur die sequenzspezifische Restriktion von RNA *in vitro*, sondern auch die Stilllegung des *lacZ* Gens in *E. coli* zeigen.^[133] Durch Anfügen eines mitochondrialen Zielsignals gelang es ihnen außerdem, die Konzentration der mitochondrialen NADH Untereinheit 5 (mtND5) mRNA in HEK293T Zellen zu verringern.^[133] In einer weiteren Studie war es derselben Gruppe sogar möglich, ein analoges Fusionsprotein zu konstruieren, das an sich wiederholenden (CUG)-Triplets in der 3'-untranslatierten Region der Myotonin-Proteinkinase RNA bindet und diese abbaut.^[43] Die fortlaufenden Wiederholungen beeinträchtigen essentielle Spleiß-Faktoren und gelten als Ursache für myotone Dystrophie Typ 1.^[43-46] Klinische Studien sind bis *dato* nicht bekannt. Ansätze dieser Art verdeutlichen jedoch die vielseitigen Möglichkeiten und die Notwendigkeit von artifiziellen RNA-bindenden Designerproteinen.

Neben der RNA-Modifizierung ist die Detektion von RNA eine weitere Einsatzmöglichkeit für RNA-bindende Designer-Proteine, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

1.3 Methoden zur Detektion von RNA

RNA-Detektionsmethoden, die auf Northern Hybridisierung,^[165] Microarrays mit komplementärer DNA (cDNA)^[166], Expressed Sequence Tags (EST),^[167] oder neuartigen Hochdurchsatz-Methoden

basierend auf Sequenzierungen der nächsten Generation (RNA-Seq) beruhen,^[168] ermöglichen zwar ein Expressionsprofiling, verlangen jedoch mitunter die vorangegangene Isolierung der RNA. Zudem handelt es sich um statische Methoden; die Analyse von RNA-Dynamiken oder -Transport ist auf diese Weise nicht möglich.

Das Interesse an den Mechanismen und Folgen von RNA-Lokalisation hat zu der Entwicklung einer Vielzahl verschiedener RNA-Detektionsmethoden geführt, von denen sich einige die Hybridisierung von modifizierten Oligonukleotiden an die Ziel-RNA zu Nutze machen (Kapitel 1.3.1.1), und andere auf genetisch codierbaren Sonden basieren (Kapitel 1.3.2, 1.3.3). Der Fokus der in den folgenden Kapiteln beschriebenen Auswahl liegt hierbei auf denjenigen Methoden, die Detektion einzelner RNA-Moleküle, die gleichzeitige Detektion verschiedener RNAs, und/oder die Detektion unmodifizierter, endogener RNA erlauben.

1.3.1 Nicht-genetisch codierbare Sonden

Die Mikroinjektion fluoreszenzmarkierter RNAs ist eine Möglichkeit zur Detektion spezifischer RNAs. Mittels dieser Methode wurde beispielweise der aktive Transport verschiedener Alexa Fluor®-markierter RNAs entlang von Mikrotubuli in *D. melanogaster* Embryonen beobachtet.^[169] Die Mikroinjektion modifizierter RNA kann jedoch zu einer Übersättigung von RNA führen, sodass natürliche Mechanismen gestört werden und eine veränderte Lokalisation oder Translation die Folge sein könnten.^[170] Hybridisierungsbasierte Detektionsmethoden hingegen ermöglichen durch gezieltes Design komplementärer und fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide die spezifische Detektion endogener RNA (Kapitel 1.3.1.1).

1.3.1.1 Hybridisierungsbasierte Methoden

Die bereits 1969 von Pardue und Gall veröffentlichte Methode zur Detektion spezifischer Nukleinsäuren anhand von radioaktiv markierten Oligonukleotiden und *in situ* Hybridisierung (ISH)^[171] legte den Grundstein für die Untersuchung subzellulär lokalisierter RNAs in fixierten Zellen. Die anfangs verwendeten radioaktiven Sonden wurden in späteren Experimenten durch Oligonukleotide ersetzt, die mit verschiedenen Farbstoffen, oder anderen kleinen organischen oder anorganischen Molekülen markiert worden waren. Das Prinzip ist hierbei stets dasselbe: Modifizierte, lineare Oligonukleotide hybridisieren mit der Ziel-RNA, wodurch sich diese – je nach Art der Sonde – entweder anhand von Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie, oder mittels Enzym-basierten Systemen detektieren lässt (Abbildung 1.4A).^[172-174] Insbesondere die Gruppe um

Singer revolutionierte die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), welche zur – bei Erhöhung der Anzahl bindender Sonden – Detektion einzelner RNA-Moleküle,^[175] Quantifizierung,^[176-178] und für Multiplexmethoden eingesetzt werden kann.^[179-182] Durch Kombination verschiedener Fluorophore, wie Alexa Fluor®-Farbstoffen, den chromogenen Substraten 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (BCIP/NBT) und Vector® Red, oder Cyanin-Farbstoffen, war beispielsweise die simultane Detektion verschiedener Ziel-RNAs in den Embryonen von *D. melanogaster*^[180] und *Danio rerio*^[181] sowie in *S. cerevisiae*^[182] möglich. Während FISH eine beliebte Methode zur Untersuchung von subzellulärer Lokalisation in fixierten Zellen darstellt, lässt sie jedoch keinerlei Aussage über die Dynamiken oder den Transport von RNA zu. Eine analoge Fluoreszenz-*in vivo*-Hybridisierung (FIVH) ist dank der Entwicklung und Einführung von modifizierten Nukleotiden, wie geschlossenen Nukleinsäuren (LNA) und 2'-O-Methyl-modifizierten Nukleotiden, möglich geworden,^[183, 184] jedoch nicht für Multiplexverfahren eingesetzt worden.^[185-188] Eine weitere Methode, die auf der Hybridisierung 2'-O-Methyl-modifizierter Oligonukleotide basiert, ist MTRIP (*multiply labeled tetravalent RNA imaging probes*).^[189] Anhand der komplexen Sonden, bestehend aus je vier Kopien einer modifizierten und an Streptavidin-gebundenen Nukleinsäure mit jeweils durchschnittlich drei konjugierten Fluorophoren, war die Detektion von RNA in lebenden, humanen Zellen möglich.^[189]

Sowohl FISH, FIVH als auch MTRIP basieren auf dem lokalen Anstieg des Fluoreszenzsignals durch Bindung von mindestens zwei Sonden an die Ziel-RNA,^[175-179, 182, 189] oder dem Vorhandensein von RNA-Granula,^[189] da die ungebundene Sonde bereits ein Fluoreszenzsignal aufweist. Mit dem Ziel, das Hintergrundsignal zu minimieren, wurden diverse weitere hybridisierungsbasierte Sonden entwickelt, die im ungebundenen Zustand keine oder lediglich eine geringe Fluoreszenz aufweisen. Als eine der ersten dieser Sonden entwickelten Tyagi und Kramer die sogenannten *molecular beacons*.^[190] Diese Oligonukleotide bilden in ungebundener Form eine Haarnadelstruktur aus, und enthalten sowohl einen Fluorophor als auch einen Quencher, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, wodurch die Fluoreszenz ausgelöscht wird.^[190] Bei Hybridisierung an die Ziel-RNA kommt es zu einer Strukturänderung des *molecular beacon* und zu einem Fluoreszenzsignal (Abbildung 1.4C).^[190] Auf diese Weise war es möglich, die Verteilung und den Transport diverser RNAs in verschiedenen Organismen, wie beispielweise der *oskar* mRNA in *D. melanogaster*,^[191] *VegT* und *Xlirts* RNAs in *X. laevis*,^[192] oder Influenza A Virus-mRNA in Epithelzellen der Hundeniere^[193] zu untersuchen. Die Kombination von zwei *molecular beacons*, die nebeneinander

an eine Ziel-RNA binden und deren Fluorophore ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Paar ausbilden, wurde verwendet, um dem erhöhten Hintergrundsignal aufgrund unspezifische Öffnung der Sonden entgegen zu wirken (Abbildung 1.4D).^[194]

Im Rahmen einer Studie zur Analyse der Expressionslevel verschiedener Gene in einzelnen Säugerzellen, wurden die Detektion mehrerer RNAs anhand von mit unterschiedlichen Alexa Fluor®-Farbstoffen markierten *molecular beacons* realisiert.^[195] Eine duale Anwendung *in vivo* wurde außerdem von Kang *et al.* unter Verwendung der Farbstoffe Texas Red und 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) beschrieben.^[196]

Um *molecular beacons* bei zellulären Anwendungen vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen, wurden sie, ähnlich wie die FISH-Sonden, mittels LNA und/oder 2'-O-Methyl-Modifizierung stabilisiert.^[195, 197, 198] Ein Problem stellt jedoch weiterhin die Ansammlung im Nucleus^[199] und die Tatsache dar, dass 2'-O-Methyl-modifizierte *molecular beacons in vivo* eine geringere Affinität gegenüber ihrer Zielstrukturen aufwiesen, als vergleichbare lineare Sonden.^[197]

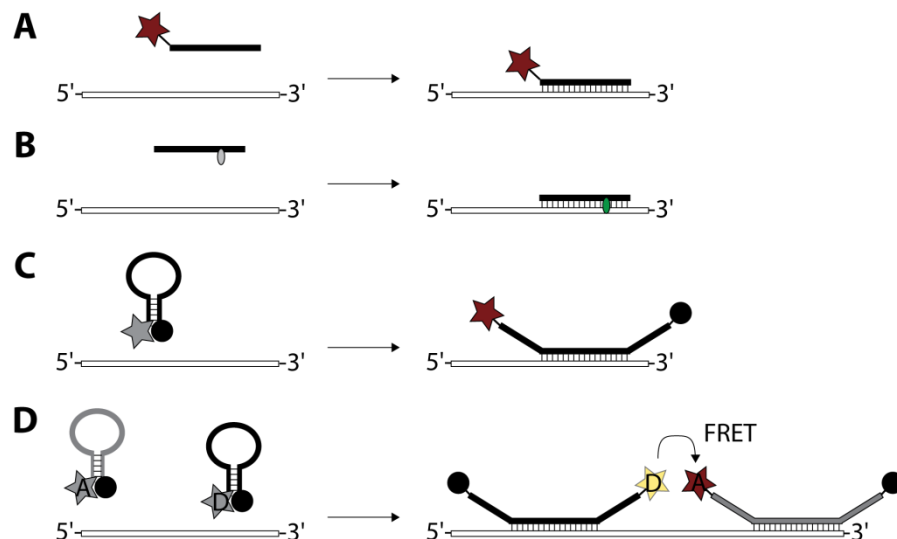


Abbildung 1.4: Hybridisierungsbasierte Methoden zur Detektion von RNA. (A) Lineare, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. (B) FIT-Sonden sind lineare Oligonukleotide mit einem Basensurrogat, welches erst bei der Interkalation in einem Doppelstrang fluoresziert.^[200] (C) *Molecular beacons* enthalten einen Fluorophor an einem, und einen Quencher am anderen Ende.^[190] Aufgrund der Ausbildung einer Haarnadelstruktur liegen diese Moleküle in unmittelbarer Nähe vor, wodurch die Fluoreszenz des Fluorophors ausgelöscht wird.^[190] Durch Bindung der Sonde an die Ziel-RNA wird die Haarnadelstruktur geöffnet, und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal.^[190] (D) Duale *molecular beacons* mit FRET-Effekt.^[194] Die Kombination aus zwei *molecular beacons*, die an benachbarte Sequenzen innerhalb einer Ziel-RNA binden, und jeweils ein Donor- oder Akzeptor-Molekül eines FRET-Paares tragen, erlaubt die Detektion von RNA mit verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis.^[194]

Die simultane Detektion verschiedener RNAs kann auch mit weiteren, hybridisierungsbasierten Sonden, wie den FIT (*forced intercalation*)^[200-202] oder ECHO (*exciton-controlled hybridization-*

sensitive fluorescent oligonucleotide)-Sonden erzielt werden.^[203-205] Bei FIT-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, die einen Farbstoff der Thiazol Orange-Familie als Basensurrogat enthalten.^[200] Durch Hybridisierung der Sonde an komplementäre DNA oder RNA ist das Molekül in seiner Rotationsmöglichkeit eingeschränkt, wodurch es zu einer Fluoreszenzsteigerung kommt (Abbildung 1.4B).^[201, 206-208] ECHO-Proben sind ähnlich aufgebaut, enthalten jedoch ein oder mehrere Paare parallel angeordneter Fluorophore.^[203, 205, 209] Durch die räumliche Nähe der Fluorophore kommt es zu einer Interaktion der angeregten Zustände und folglich zur Unterdrückung der Fluoreszenz, sodass der Effekt des Fluoreszenzanstiegs bei Bindung der Sonde an die Ziel-RNA umso stärker ausfällt.^[203, 205] Sowohl FIT- als auch ECHO-Sonden konnten durch das Einführen von LNA hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften und Thermostabilität verbessert werden.^[202, 210, 211]

Eine erst kürzlich beschriebene, auf der Verwendung von Nanopartikeln als bildgebendes Molekül basierende Sonde, sind die *sticky-flares*.^[212] Sie beinhalten einen Goldkern, der mit Oligonukleotiden umhüllt ist.^[212, 213] Diese Oligonukleotide hybridisieren wiederum an die sogenannten *flares* (mit Fluorophoren konjugierte, zur Ziel-RNA komplementäre Oligonukleotide), deren Fluoreszenz durch den Goldpartikel ausgelöscht wird.^[212] Durch Hybridisierung der Ziel-RNA an die *flares* werden diese aus dem Komplex gelöst, und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal.^[212]

Ein weiteres hybridisierungsbasiertes System, anhand dessen eine Detektion von RNA in lebenden Zellen erzielt wurde, ist das CRISPR/Cas9-System.^[37, 38] Die Sequenzspezifität des Systems wird durch eine einzelsträngige Guide-RNA (bestehend aus einer trans-aktivierenden CRISPR-RNA sowie einer für die Ziel-RNA spezifischen Sequenz) erreicht.^[37, 38] In Kombination mit dem sogenannten PAMmer, einem kurzen, einzelsträngigen Oligonukleotid, welches das PAM (*protospacer adjacent motif*) enthält, wird die sequenzspezifische Bindung von Cas9 oder der katalytisch inaktiven Doppelmutante dCas9 an eine Ziel-RNA erreicht.^[50] Anhand eines Fusionsproteins bestehend aus dCas9 und einem autofluoreszierenden Protein sowie einem aus sowohl einzelsträngiger DNA als auch aus 2'-O-Methyl-modifizierter RNA bestehenden PAMmer, gelang kürzlich die Detektion verschiedener Ziel-RNAs in RNA-Granula in lebenden humanen embryonalen Leberzellen 293T (HEK 293T).^[214]

Hybridisierungsbasierte Systeme wurden stark weiterentwickelt und haben viel zur Untersuchung von RNA-Dynamiken und Lokalisation beigetragen. Für manche hybridisierungsbasierte Sonden scheint die natürliche Sekundärstruktur der Ziel-RNA jedoch ein Problem darzustellen.^[215] Zudem

haben sie den Nachteil, dass die Sonden nicht in der Zelle produziert werden können, sondern es verschiedener Methoden bedarf, um sie in die Zelle einzuschleusen. Methoden wie beispielsweise die Rezeptor-vermittelte Endozytose^[212] sind dabei zwar weniger invasiv als die Permeabilisierung, Mikroinjektion, Bio-Ballistik oder Elektroporation,^[216] im Idealfall würde dieser Schritt jedoch vollständig umgangen werden. Genetisch codierbare Sonden erfüllen diesen Anspruch, da sie von der zellulären Maschinerie hergestellt werden können. Sie werden in Kapitel 1.3.2 vorgestellt. Eine weitere Alternative zur Visualisierung von RNA ist deren Modifizierung *in vivo*, die im Folgenden beschrieben ist.

1.3.1.2 Chemo-enzymatische Modifizierung

Neben Methoden, die auf der Hybridisierung modifizierter Oligonukleotide an die Ziel-RNA beruhen (Kapitel 1.3.1), sind auch kovalente Ansätze zur Detektion von RNA möglich. Die direkte Einführung radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierter Metabolite in die Zelle führt beispielsweise zur Markierung sämtlicher neu produzierter RNAs und erlaubt Aussagen über Transkriptionsraten oder die Verteilung im Zellkern.^[217] Ist hingegen die spezifische Untersuchung einer bestimmten RNA-Klasse das Ziel, stellt die post-transkriptionale Modifizierung mit anschließender Fluoreszenzmarkierung anhand sogenannter Klick-Reaktionen eine geeignetere Methode dar. Bei den Klick-Reaktionen handelt es sich um stereo-spezifische, schnell ablaufende Reaktionen, die bei Raumtemperatur und in wässriger Lösung ablaufen und eine hohe Ausbeute liefern.^[218, 219] Können sie zudem in lebenden Systemen durchgeführt werden, werden sie als bioorthogonale Klick-Reaktionen bezeichnet.^[220] Zur Übertragung der für die Klick-Reaktionen benötigten chemischen Gruppen auf die RNA haben sich Methyltransferasen mit Substrat-Promiskuität etabliert.^[221, 222]

Motorin *et al.* nutzten beispielsweise die *Pyrococcus furiosus* tRNA (Guanin-26, N^2 - N^2) Methyltransferase (Trm1), welche den Transfer einer Methylgruppe von dem Cosubstrat S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) auf das N^2 -Atom von Guanin 26 der tRNA^{Phe} katalysiert.^[223-225] Zusätzlich wurde eine promiskuitive Aktivität auf das AdoMet-Analogon AdoEnYn (5'-[(S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]pent-2-en-4-ynylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) mit einer Pentenynyl- anstelle der Methylseitenkette nachgewiesen und auf diese Weise eine Alkinfunktion auf die tRNA^{Phe} übertragen.^[225] Die anschließende Fluoreszenzmarkierung dieser chemisch vielseitigeren Gruppe erfolgte mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-(1,3)-Cycloaddition (CuAAC).^[219, 225, 226]

Die spezifische Markierung kurzer, doppelsträngiger RNAs wurde anhand der *A. thaliana* Methyltransferase *HUA ENHANCER 1* (HEN1) erreicht.^[227] Hierbei wird die Spezifität des Enzyms für

die Methylierung der 3'-Hydroxygruppe genutzt, um miRNA- oder siRNA-Duplexe mittels verschiedener Propargylreste zu modifizieren.^[228]

Ein Ansatz, der auf der Markierung sämtlicher eukaryotischer mRNAs basiert, ist die chemo-enzymatische Modifizierung ausgehend von der *Giardia lamblia* Trimethylguanosinsynthase 2 (GlaTgs2). Unter Verwendung von AdoMet als Cosubstrat katalysiert sie natürlicherweise den Transfer einer Methylgruppe auf das exozyklische N²-Atom des 7-Methylguanosins der 5'-Kappe von mRNA.^[229] Mit Hilfe von rationalem Proteindesign erhielten Schulz *et al.* die Variante GlaTgs2-V34A, die in der Lage war, neben AdoMet diverse AdoMet-Analoga zu erkennen und deren Seitenketten auf die 5'-Kappe zu übertragen.^[230] Die Promiskuität von GlaTgs2-V34A ermöglichte die Übertragung der Allylgruppe des Cosubstrates AdoPropen (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-enylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) mit anschließender Thiol-En-Klick-Reaktion^[230-233] der lichtinduzierten Photoklick-Reaktion^[234, 235] sowie die Übertragung einer 4-Azidobut-2-enylgruppe mit anschließender spannungsinduzierten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).^[236, 237] Von der Übertragung einer 4-Vinylbenzylgruppe unter Verwendung des Cosubstrates AdoViBe (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]4-vinylbenzylsulfonio]-5'-desoxyadenosin), mit anschließender Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf oder Photoklick-Reaktion, wurde ebenfalls berichtet.^[234] Zudem wurde, analog zur Arbeit von Motorin *et al.*, die Übertragung der Penteninygruppe von AdoEnYn auf die 5'-Kappe, und eine anschließende Markierung mittels CuAAC beschrieben.^[230]

Eine Sequenzspezifität der verwendeten Methyltransferasen, wie sie beispielsweise für eine Vielzahl von Enzymen durch die Fusionierung mit der Pum-HD erreicht wurde (Kapitel 1.2.6), ist bis *dato* nicht bekannt. Es wurden jedoch Guide-RNAs eingesetzt, um eine sequenzspezifische Modifizierung mithilfe der Methyltransferase box C/D Ribonukleoproteinkomplex (C/D RNP) aus *Pyrococcus abyssi* zu realisieren.^[238] Unter Verwendung des Cosubstrates SeAdoYn (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-ynylselenonio]-5'-desoxyadenosin) konnte die Modifizierung verschiedener Ziel-RNAs und die anschließende Markierung mittels CuAAC erreicht werden.^[238] Im Hinblick auf die diversen Effektor-Domänen, die erfolgreich mit der Pum-HD als Binde-Domäne kombiniert worden sind (Kapitel 1.2.6), wäre auch eine Steuerung der Modifizierung durch die Sequenzspezifität RNA-bindender Proteine denkbar.

1.3.2 Genetisch codierbare Sonden

Genetisch codierbare Sonden haben den großen Vorteil, dass sie von der zellulären Maschinerie hergestellt werden können, und nicht, wie beispielsweise die hybridisierungsbasierten Sonden, in die Zelle eingeschleust werden müssen (1.3.1.1). Insbesondere die Verwendung autofluoreszierender Proteine als Reporter-Moleküle hat sich in den letzten Jahren für die Detektion von RNA bewährt. Hierbei kann eine Klassifizierung in solche Systemen erfolgen, die die Detektion endogener RNAs erlauben, und die, die zunächst eine Modifizierung der Ziel-RNA mit bestimmten Aptamer-Sequenzen benötigen.

Das Paradebeispiel für eine Protein-basierte Detektion ist das von Bertrand *et al.* entwickelte MS2-System, welches erstmals zur Visualisierung der *ASH1* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt wurde.^[4] Hierbei bindet ein Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem Hüllproteins des Bakteriophagen M2S (MCP) an eine zuvor mit bis zu 96 Kopien des MS2-bindenden Aptamers verlängerte Ziel-RNA und bewirkt einen lokalen Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abbildung 1.5A).^[4, 239, 240] Das Fusionsprotein MCP-GFP liefert bereits im ungebundenen Zustand ein Fluoreszenzsignal, und wurde daher, zwecks Verringerung des Hintergrundsignals, mit einem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) versehen.^[4] Weiterhin war eine Erhöhung des lokalen Signals durch Bindung mehrerer Kopien MCP-GFP an die RNA essentiell, um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erhalten.^[4] Die notwendige Verlängerung der Ziel-RNA mit der entsprechenden Aptamer-Sequenz könnte jedoch möglicherweise die Funktion der RNA beeinflussen. Eine Studie von Garcia und Parker zeigte kürzlich, dass die Translation der mRNAs *QCR8* und *PGK1* durch das Anhängen von 24 MCP-Bindestellen nicht beeinträchtigt wurde, die zusätzliche Sequenz jedoch den Abbau der RNA in 5'→3'-Richtung inhibierte und so zu einer Anhäufung des MCP-Bindestellen enthaltenden 3'-Endes der RNA führte.^[241] Aus diesem Grund sollte der RNA-Metabolismus stets überprüft, und die verlängerte RNA anhand zusätzlicher Methoden mit der endogenen RNA verglichen werden.^[242] Als Alternative zu MCP wurden diverse weitere Proteine verwendet, die eine hohe Affinität für spezifische RNA-Strukturen aufweisen. Bedeutende Beispiele sind unter anderem das Protein Lambda N (λ N) des Bakteriophagen Lambda und die verkürzte Variante λ N₂₂,^[48] das Hüllprotein des *Pseudomonas aeruginosa* Bakteriophagen PP7 (PCP),^[243] das Protein BglG aus *E. coli*^[244] sowie das humane Protein U1Ap.^[245, 246]

Von besonderem Interesse für die parallele Untersuchung der RNA-Lokalisation mehrerer RNAs ist die Kombination verschiedener Systeme. Wu *et al.* kombinierten beispielweise das BglG- und das

MS2-System und konnten auf diese Weise die Heterozygotie der humanen Immunodefizienz-Virus-1 (HIV-1)-Virionen nachweisen.^[244] Lange *et al.* nutzen Fusionsproteine aus λ N und MCP mit verschiedenen autofluoreszierenden Proteinen zur Untersuchung der Colokalisation der Ziel-RNAs *ASH1* und *IST2* in *S. cerevisiae*.^[247] Ebenfalls in *S. cerevisiae*, wurde eine Kombination des MS2 und des PP7-Systems von Singer und Kollegen zur Analyse von mRNA-Level und Polymerase-Kinetiken realisiert.^[248]

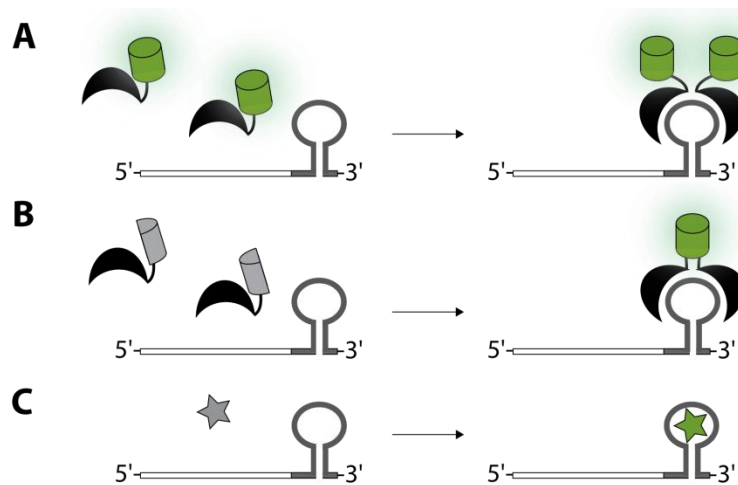


Abbildung 1.5: Genetisch codierbare Sonden zur RNA-Detektion. (A) Protein-basierte Erkennung spezifischer RNA-Strukturen. Proteine mit hoher Affinität für bestimmte RNA-Strukturen (wie beispielsweise Dimere des MS2-Hüllproteins^[4]) ermöglichen durch Fusion mit autofluoreszierenden Proteinen die Detektion von RNA. **(B)** Erweiterung des MS2-Systems mittels nicht-fluoreszierender Hälften autofluoreszierender Proteine.^[249-252] Durch Bindung zweier Fusionsproteine an eine Haarnadelstruktur, wird die Komplementierung des autofluoreszierenden Proteins ausgelöst.^[249-252] **(C)** Detektion von RNA mittels Aptamer-Fluorophor-Komplexen. Kleine organische Moleküle (z.B. DFHB)^[253] erfahren einen Fluoreszenzanstieg, wenn sie von bestimmten Aptameren gebunden werden. Alle Methoden setzen die vorangegangene Verlängerung der RNA mit den entsprechenden Aptameren voraus.

Zur weiteren Verringerung des von der ungebundenen Sonde ausgehenden Hintergrundsignals, oder zur Anwendung in Organismen ohne Zellkern, wurden die autofluoreszierenden Proteine in zwei nichtfluoreszierende Fragmente geteilt, die erst bei Interaktion der Fusionspartner mit der Ziel-RNA komplementierten und ein Fluoreszenzsignal gaben (Abbildung 1.5B, für eine detaillierte Beschreibung des Split-Systems in Kombination mit der Pum-HD, siehe Kapitel 1.3.3).^[249-252]

Neben natürlich vorkommenden Aptameren, die bestimmte Proteine binden, wurden außerdem Aptamere entwickelt, die eine hohe Affinität gegenüber kleinen, nichtfluoreszierenden organischen Molekülen aufweisen, welche in gebundener Form fluoreszieren (Abbildung 1.5C).^[253-259] Der Vorteil dieses Systems besteht in der Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses aufgrund der fehlenden Fluoreszenz der ungebundenen Sonde. Zu den hellsten dieser Aptamer-Fluorophor-

Komplexe zählt das von Jaffrey und Kollegen entwickelte, sogenannte *Spinach*-Aptamer und dessen für *in vivo*-Anwendungen optimierte Varianten *Spinach2* und *dBroccoli*.^[253-255] Eine definierte RNA-Struktur bindet das dem GFP-Chromophor nachempfundene (Z)-4-(3,5-Difluoro-4-hydroxybenzyliden)-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-on (DFHBI) und ermöglichte die Detektion von RNA in lebenden Säugerzellen.^[253, 254] Eine Alternative stellt ein in *E. coli* realisiertes System dar, bei dem verschiedene Farbstoffe mit dem Quencher Dinitroanilin verbunden wurden, und bei Bindung des Moleküls an RNA-Aptamere ein 6-100-facher Anstieg der Fluoreszenz detektiert wurde.^[257, 260] Im Unterschied zu hybridisierungsbasierten Sonden sind die hier verwendeten Moleküle in der Lage in die Zellen zu diffundieren, sodass keine potentiell zellschädigenden Methoden zur Einschleusung durchgeführt werden müssen. Allerdings ist eine vorangegangene Verlängerung der RNA mit dem entsprechenden Aptamer (auf DNA-Ebene) notwendig.

Im folgenden Kapitel sind genetisch codierbare Sonden aufgeführt, die nicht auf diese Verlängerung der RNA angewiesen sind, sondern vielmehr die modulierbare Sequenzspezifität der Pum-HD als vielseitige Binde-Domäne nutzen.

1.3.3 Pum-HD-basierte Detektion von RNA mittels autofluoreszierender Proteine

Ein Molekül, das als Reporter für die Pum-HD-basierte Detektion von RNA nicht wegzudenken wäre, ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*. Aufgrund dieser Relevanz wird an dieser Stelle zunächst näher auf das GFP und die entsprechenden Varianten eingegangen.

Die Entdeckung und Entwicklung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria* revolutionierte die biologische Forschung.^[261-266] Als genetisch codierbarer, fluoreszierender Reporter findet es Anwendung in einer Reihe von Fragestellungen, wie beispielsweise der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen,^[267] Ionenkanälen,^[268] der Protein-Lokalisation,^[269-271] oder als Reporter-Molekül bei der Genexpression.^[272] Eine wichtige Rolle spielt es auch bei der Untersuchung von RNA-Protein-Interaktionen oder der RNA-Lokalisation. Insbesondere die Kombination der Pum-HD als Binde-Domäne mit GFP als Reporter-Molekül bietet sich zur sequenzspezifischen Detektion von RNA an.

GFP ist vorrangig aus elf antiparallel angeordneten β -Faltblättern aufgebaut, die eine β -Fassstruktur bilden und in deren Inneren sich eine helikale Struktur befindet, welche das Chromophor enthält (Abbildung 1.6).^[273] Die Ausbildung des Chromophors erfolgt posttranskriptional durch einen nukleophilen Angriff der Amid-Gruppe von Gly67 auf die Carbonyl-Gruppe des Ser65, dem eine Dehydratisierung folgt.^[265, 266] Nach Dehydrierung der α - β -Bindung von Tyr66 liegt das Chromophor

4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on vor.^[263, 274, 275] Basierend auf theoretische Daten wurden den Aminosäuren Arg96 und Glu222 zusätzlich eine Rolle als Stabilisator oder Base bei der Chromophorbildung zugeschrieben.^[276-278]

Es sind zahlreiche Varianten des GFP generiert worden, die verbesserte oder veränderte Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. So hat beispielsweise die Aminosäuresubstitution von Threonin zu Tyrosin in Position 203 (T203Y), welche in räumlicher Nähe des Chromophors liegt, einen bathochromen Effekt zur Folge und führt zu einer gelb fluoreszierenden Variante (YFP).^[273, 279]

Anhand der direkten Substitution der an der Chromophorbildung beteiligten Aminosäure Tyr66 wurde der entgegengesetzte Effekt erzielt, und cyan- oder blau fluoreszierende Varianten des GFP (CFP, BFP) erhalten (Abbildung 1.6).^[263, 266] Durch gerichtete Evolution wurden zudem weitere Eigenschaften, wie die Photostabilität, die Helligkeit,^[280, 281] die Faltungsgeschwindigkeit,^[282] die Empfindlichkeit gegenüber pH-Veränderungen,^[283, 284] oder die Photoschaltbarkeit verbessert,^[285] was diese GFP-Varianten zu geeigneten Reporter-Molekülen für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen macht. Mishin *et al.* berichteten 2008 zudem von einer Variante des aus *Aequorea victoria* stammenden GFPs, die neben grüner Fluoreszenz auch rote Fluoreszenz aufwies.^[286] Varianten mit reiner oranger oder roter Fluoreszenz unter physiologischen Bedingungen sind hingegen bis *dato* nicht bekannt. Es wurden jedoch GFP-ähnliche, rot fluoreszierende Proteine (RFPs) aus diversen *Anthozoa* Spezies isoliert und weiter entwickelt.^[287-291]

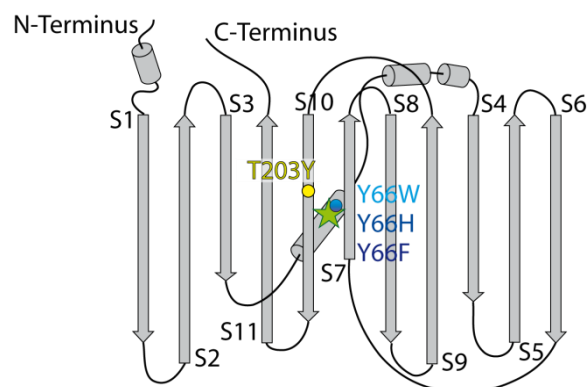


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von GFP. (➡) β -Faltblätter S1-11, (■) helikale Struktur, (★) Chromophor-bildende Aminosäuren 65-67. Eingezeichnet sind zusätzlich diejenigen Aminosäuresubstitutionen, die den (T203Y) gelben, (Y66W) cyanen, oder (Y66H, Y66F) blauen Varianten des GFP gemein sind. Zusätzliche Substitutionen sind der zur besseren Übersicht nicht eingezeichnet. Struktur nach Ormö *et al.*^[273]

Die Kombination von GFP als Detektor-Molekül mit der Sequenzspezifität von Pumilio ist von besonderem Vorteil, da das Konstrukt (nach Einbringung der entsprechenden genetischen

Informationen), im Gegensatz zu vielen anderen RNA-Detektionsmethoden (Kapitel 1.3.1, 1.3.2), von der zellulären Maschinerie selber produziert werden kann und keine vorangegangene Modifikation der RNA-Sequenz notwendig ist. Yoshimura *et al.* nutzten beispielsweise ein Fusionsprotein aus dem verbesserten GFP (*enhanced GFP*, eGFP^[280]) und zwei Pum-HD-Varianten zur Untersuchung der Lokalisation von β -Actin mRNA in Säugerzellen.^[134] Da jedoch sowohl das gebundene, als auch das ungebundene Protein eine Fluoreszenz aufwies, wurde ein Kernlokalisierungssignal (NLS) an das Fusionsprotein angefügt um das Hintergrundsignal zu verringern (Abbildung 1.7A). Auf diese Weise konnte ein Fluoreszenzsignal im Cytosol auf die Bindung an die Ziel-RNA zurückgeführt werden.^[134]

Mit dem Ziel, das Hintergrundsignal der ungebundenen Sonde zu minimieren, nutzten Ozawa *et al.* die von Rackham und Brown im Jahre 2002 beschriebene trimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TriFC) zur Detektion von RNA-Protein-Interaktionen.^[39] Die Möglichkeit, GFP in zwei nicht-fluoreszierende Hälften zu teilen und diese zu nutzen um die Interaktionen zweier Fusionspartner zu untersuchen, war zuvor erstmals von Ghosh *et al.* beschrieben worden.^[267] In ihrer Studie fusionierten Ozawa *et al.* jeweils ein eGFP-Fragment an eine Pum-HD-Variante, die so modifiziert worden war, dass sie entweder an mitochondriale RNA der Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 6 (ND6), oder β -Actin mRNA banden (Abbildung 1.7B). Auf diese Weise gelang ihnen die Pum-HD-basierte Lokalisation dieser Ziel-RNAs in lebenden Säugerzellen.^[39, 41] In einem ähnlichen Ansatz verwendeten Tilsner *et al.* die GFP-Variante Split-mCitrine und jeweils zwei Pum-HD-Varianten um die genomische RNA des Tabakmosaikvirus (TMV) und des Kartoffelvirus X (*potato virus X*, PVX) in *Nicotiana benthamiana* zu lokalisieren.^[40] Erst kürzlich wurde zudem eine Studie veröffentlicht, bei der die Autoren die Komplementierung von Split-GFP in Abhängigkeit von der Interaktion zweier Pum-Varianten mit einer Ziel-RNA nutzten, um deren Translation in lebenden Zellen zu quantifizieren.^[292] Die Verwendung zweier nicht-fluoreszierender Proteinfragmente kann jedoch in spontaner Proteinkomplementierung resultieren.^[19, 293-295] Bei der Untersuchung von Protein-Topologien, dem Protein-Transport, oder bei Löslichkeitsstudien, kann sich diese von der Interaktion der Fusionspartner unabhängige Komplementierung zu Nutze gemacht werden.^[296-298] Für die Detektion von RNA ist sie jedoch nachteilig, da ein erhöhtes Hintergrundsignal und falsch-positiven Signale die Folge sein können.^[299-301]

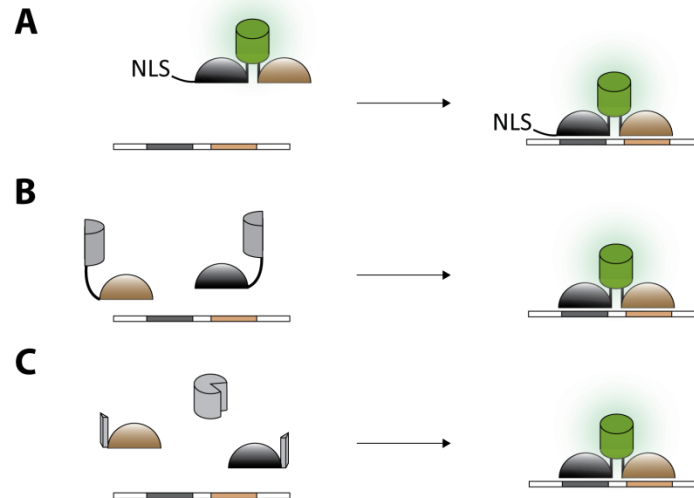


Abbildung 1.7: Detektion endogener RNA basierend auf der Pum-HD und autofluoreszierenden Proteinen. (A) Fusionskonstrukt aus zwei Pum-HD-Varianten (Halbkreise), eGFP (Fass) und NLS (Kernlokalisierungssignal) zur Detektion von β -actin mRNA im Cytosol von Cos7 Zellen.^[134] (B) Trimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TriFC) zur Detektion von RNA. Jeweils eine nicht-fluoreszierende Hälfte eines autofluoreszierenden Proteins wurde mit einer Pum-HD-Variante fusioniert. Die Interaktion der Pum-HDs mit einer gemeinsamen Ziel-RNA resultiert in der Komplementierung des Proteins und einem Fluoreszenzsignal *in vivo*.^[39-41] (C) Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC) zur Detektion von RNA *in vitro*. Zwei Pum-HD-Varianten sind an jeweils ein GFP- β -Faltblatt fusioniert. Detektor-Molekül GFP1-9 enthält die restlichen neun β -Faltblätter und ermöglicht die GFP-Komplementierung.^[302]

Um dies zu umgehen, wurde die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC) entwickelt.^[302] Sie beruht auf der Komplementierung von drei nicht-fluoreszierenden GFP-Fragmenten, die keine spontane Selbstassemblierung aufweisen.^[301] Zwei kurze Peptide, die jeweils ein β -Faltblatt enthalten (S10: Aminosäuren 194-212 und S11: Aminosäuren 213-233), wurden hierbei mit jeweils einer Pum-HD-Variante fusioniert.^[301, 302] Ein drittes Fragment, GFP1-9, enthält die restlichen neun β -Faltblätter (Aminosäuren 1-193).^[301, 302] Erst durch Interaktion der Pum-Varianten mit der Ziel-RNA liegen die GFP-Fragmente S10 und S11 in räumlicher Nähe vor und es kommt bei Anwesenheit von GFP1-9 zur GFP-Komplementierung (Abbildung 1.7C).^[302] Die GFP-Fragmente waren zuvor anhand von gerichteter Evolution für das dreigeteilte System, ausgehend von der GFP-Variante *superfolder GFP* (sfGFP), hinsichtlich ihrer Löslichkeit und Faltung optimiert worden.^[301, 303] Bislang ist die TetFC jedoch lediglich *in vitro* realisiert worden.^[302]

Eine vom Design der entsprechenden Pumilio-Varianten unabhängige Detektion von RNA ist anhand der Verwendung von Guide-RNAs realisiert worden.^[135] Die Guide-RNAs wiesen neben dem Pumilio-Bindemotiv eine zur Ziel-RNA komplementäre Sequenz auf und ermöglichten die Unterscheidung zwischen gespleißter und ungespleißter HIV RNA *in vitro* unter Verwendung derselben Pumilio-GFP

Fusionsproteine.^[135] Aufgrund der Anzahl der benötigten Komponenten (zwei Pumilio-GFP-Fusionsproteine, zwei Guide-RNAs, Detektor GFP1-9) ist dieses System jedoch nur bedingt für Anwendungen *in vivo* geeignet.

Ein einfach zu realisierendes System, welches insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen Binde-Modi das Screening einer Vielzahl verschiedener Pumilio-Varianten zur Bindung einer bestimmten RNA erlaubt, wäre daher erstrebenswert.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten zur Verwendung der Pumilio Homologie-Domäne als Binde-Domäne für die sequenzspezifische Detektion von RNA weiter auszubauen. Seit der Identifizierung des Pumilio-Bindecodes wurden bereits diverse Pumilio-Varianten generiert. Aktuelle Studien zu alternativen Binde-Modi und die Entwicklung neuartiger Klonierungsmethoden zeigten jedoch die Notwendigkeit zur Optimierung rational entworfener Proteinvarianten.

Aus diesem Grund sollte eine leicht zugängliche Methode entwickelt werden, die es erlaubt aus einer Vielzahl verschiedener Pumilio-Proteine diejenigen Varianten zu selektieren, die mit hoher Affinität und Spezifität an bestimmte Ziel-RNAs binden. Hierzu sollte die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung in *E. coli* etabliert und mit der fluoreszenzaktivierten Flusssortierung (FACS) kombiniert werden.

Da nicht nur die Detektion einzelner RNAs von Interesse ist, sondern auch das Zusammenspiel mehrerer Ziel-RNAs Aufschluss über ihre Mechanismen und Funktionen liefern kann, sollte zudem untersucht werden, ob die TetFC auf ein duales RNA-Detektionssystem ausgeweitet werden kann. Hierzu sollten geeignete Fusionsproteine aus Split-GFP-Fragmenten und unterschiedlichen Pumilio-Varianten generiert und zur Unterscheidung zweier verschiedener RNAs eingesetzt werden.

Eine erst kürzlich etablierte Methode zur Detektion eukaryotischer mRNA stellt die chemoenzymatische Modifizierung der 5'-Kappe durch eine Variante der *Giardia lamblia* Trimethylguanosinsynthase 2-Variante V34A (GlaTgs2-V34A) dar. Basierend auf der Tatsache, dass hierbei eine unspezifische Markierung sämtlicher 5'-Kappen erfolgt, sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob die Pum-HD dazu genutzt werden kann, diesem System eine Sequenzspezifität zu verleihen. Hierzu sollten zunächst verschiedene Fusionskonstrukte aus GlaTgs2-V34A und der Pum-HD hergestellt, charakterisiert und schließlich für eine sequenzspezifischen Modifizierung der mRNA 5'-Kappe und anschließender Fluoreszenzmarkierung mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-(1,3)-Cycloaddition (CuAAC) eingesetzt werden.

3 Ergebnisse

Die programmierbare Sequenzspezifität der Pumilio Homologie-Domäne (Pum-HD) (Kapitel 1.2.3) sollte im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion von RNA eingesetzt werden. Theoretisch können bereits durch Veränderung der an der Bindung der Nucleobasen beteiligten Aminosäuren Pumilio-Varianten zur Bindung jeder beliebigen 8 nt-Sequenz einer RNA generiert werden. Aufgrund möglicher alternativer Binde-Modi (Kapitel 1.2.4) und unterschiedlicher Löslichkeit der Varianten ist jedoch eine Methode zur Identifizierung geeigneter Pum-HD-Varianten notwendig. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC) in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Flusssortierung (FACS) eine geeignete Methode zum Screening von Pum-HD-Varianten darstellen kann (Kapitel 3.1). Weiterhin wurde die Methode der TetFC auf eine duale Detektion zweier Ziel-RNAs anhand unterschiedlicher Fluoreszenzsignale ausgeweitet (Kapitel 3.2). In einer dritten Anwendung der Pum-HD wurde diese als Binde-Domäne für eine sequenzspezifische, chemo-enzymatische Modifizierung von RNA eingesetzt (Kapitel 3.3).

3.1 Etablierung von TetFC *in vivo*

Die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung beruht auf der Interaktion zweier Pum-HD-Varianten mit zwei benachbarten 8 nt-RNA-Motiven (im optimierten Fall: boxA: 5'-UGUAUAUA-3', boxB: 5'-UUGAUUAUA-3', getrennt durch einen 5 nt-Linker) innerhalb einer Ziel-RNA.^[302] Die an die zwei Pum-HD-Varianten Wildtyp (WT) und Variante1 (Var1) fusionierten GFP β -Faltblätter S10 und S11 erlauben in Kombination mit dem Detektor-Protein GFP1-9 (welches die restlichen neun β -Faltblätter einer für Split-GFP optimierten Variante enthält) die fluoreszenzbasierte Detektion von RNA (Abbildung 1.7C).^[302] Für ein TetFC-basiertes Screening von Pum-HD-Varianten hinsichtlich ihrer Bindung an verschiedene Ziel-RNAs sollte das System (bestehend aus allen vier TetFC-Komponenten) *in vivo* etabliert werden. Auf diese Weise kann der für ein effektives Screening essentielle direkte Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp genutzt werden. Zudem wurde eine Analyse-Methode mit hohem Durchsatz und der Möglichkeit zur Selektion der entsprechenden Zellen benötigt. Hierfür wurde FACS gewählt, eine Hochdurchsatz-Methode, die insbesondere im Bereich des Protein Engineering bereits für eine Vielzahl verschiedener Screenings eingesetzt wurde (Kapitel 1.3) und welche die Analyse/Selektion ganzer Zellen erlaubt. Für eine TetFC-basierte Analyse von Pum-HD/Ziel-RNA-Kombinationen könnten bei einem solchen Screening entweder die

RNA-Sequenz oder die Pumilio-Konstrukte variiert werden, während Detektor GFP1-9 in allen Fällen gleich bleiben würde.

Die Wahl der zu verwendenden Zellen oder des zu verwendenden Organismus für die Etablierung von TetFC *in vivo* wurde anhand folgender Kriterien getroffen: a) Möglichkeit zur Einbringung mehrerer Gene (für sämtliche TetFC-Komponenten), b) Stabilität/geringe Adhäsion der Zellen (notwendig für Analyse einzelner Zellen) und c) hohe Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. In Anbetracht dieser Punkte wurde *E. coli* als geeigneter Organismus ausgewählt. Die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze, die hierbei verfolgt wurden, sind in den folgenden Kapiteln beschrieben und teilweise veröffentlicht.^[304]

3.1.1 Chromosomale Integration von *gfp1-9*

Für eine Etablierung von TetFC *in vivo* war es notwendig, alle vier Komponenten des Systems (Ziel-RNA, Pumilio-Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie das Detektor-Protein GFP1-9, s. Kapitel 1.3) rekombinant zu produzieren. Eine Möglichkeit zur Einbringung von Genen stellt die Integration von DNA-Sequenzen in das Genom eines Organismus dar. Um eine durchgehend gleichmäßige Produktion des Detektor-Proteins GFP1-9 zu gewährleisten, sollte das entsprechende Gen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors in das Genom von *E. coli* BL21(DE3) integriert werden. Die genetischen Informationen für die restlichen Komponenten des TetFC-Systems (die Pumilio-Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie die Ziel-RNA), die im Zuge des Screenings zu variieren waren, sollten im späteren Verlauf anhand eines zusätzlichen Vektors in die Zelle eingebracht und unter Kontrolle von drei T7-Promotoren rekombinant produziert werden (Vektor pSJK7, Abbildung 3.1A).

Als Klonierungsmethode für die genomische Integration von *gfp1-9* wurde die homologe Rekombination mittels des λ Red Systems gewählt, welche es ermöglicht, gezielt Gene zu entfernen, doppelsträngige DNA in das Genom zu insertieren, oder diese gegen bestimmte Regionen auszutauschen.^[305] Es wurden drei Positionen für die Integration von *gfp1-9* gewählt, die in der Vergangenheit bereits erfolgreich für die homologe Rekombination oder die Insertion von *gfp* in *E. coli* verwendet wurden (Abbildung 3.1B).^[306-308] Es handelte sich hierbei um den Austausch der Gene *rybA*^[306] und *znuA*,^[307] sowie um eine intergenische Region zwischen *ykgM* und *eaeH*.^[308] Die einzubringende Genkassette wurde in Anlehnung an Pinheiro *et al.*^[307] entworfen und beinhaltete neben *gfp1-9* den konstitutiven Promotor des Bakteriophagen Lambda (λ P_L) sowie ein Kanamycin-

Resistenzgen (Kan^R), welches von zwei Flippase-Erkennungssequenzen (FRT) flankiert war (Abbildung 3.1C).

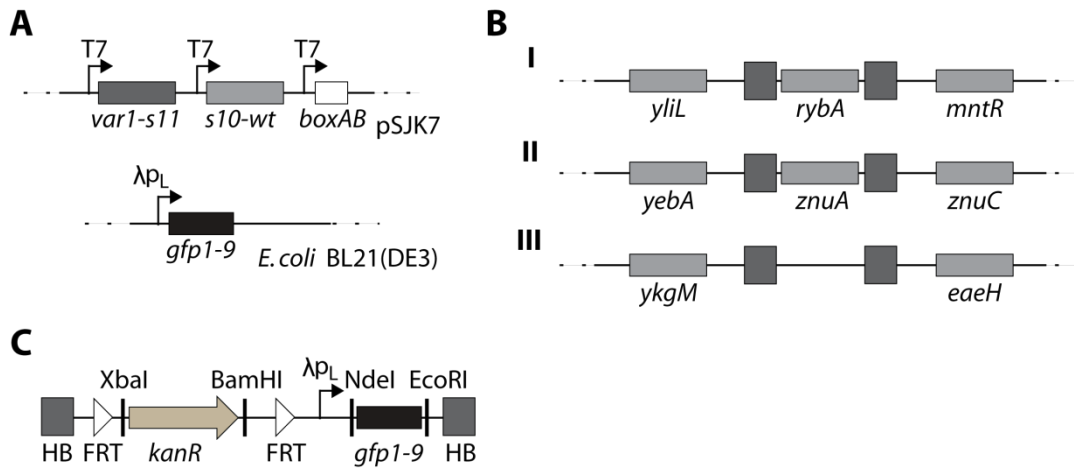


Abbildung 3.1: Strategie zur Etablierung von TetFC in vivo mittels chromosomaler Integration von *gfp1-9*. (A) Schematische Darstellung des Expressionssystems. Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie der Ziel-RNA *boxAB* erfolgt unter Kontrolle von drei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe mit Hilfe des Plasmids *pSJK7*. *gfp1-9* wird mittels chromosomaler Integration in das Genom von *E. coli* BL21(DE3) eingebracht (verschiedene Stellen, siehe (B)) und unter der Kontrolle des Promotors λP_L konstitutiv exprimiert. (B) Integrationsstellen im Genom von *E. coli* BL21(DE3). (I) Austausch von *rybA* gegen *gfp1-9* zwischen *yliL* und *mntR*, (II) Austausch von *znuA* gegen *gfp1-9* zwischen *yebA* und *znuC*, (III) Insertion zwischen *ykgM* und *eaeH*. (C) Schematische Darstellung der Genkassette zur chromosomalen Integration von *gfp1-9*. Die Genkassette beinhaltet (Kan^R) ein Kanamycin-Resistenzgen, flankiert von zwei (FRT) Flippase-Erkennungssequenzen sowie *gfp1-9* unter Kontrolle des Promotors λP_L . Die Restriktionsschnittstellen XbaI, BamHI, NdeI und EcoRI wurden zur möglichen Modifikation der Genkassette eingebracht. (HB) Homologe Bereiche sind spezifisch für die einzelnen Integrationsstellen und werden mittels PCR angefügt.

Die homologen Bereiche, die spezifisch für die jeweilige Integrationsstelle sind, und am 5'- und 3'-Ende der Kassette benötigt werden, wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) angefügt und die Genkassette mit Hilfe des λ Red Systems in das Genom von *E. coli* BL21(DE3) kloniert. Die Selektion der positiven Klone erfolgte anhand des eingebrachten Kanamycin-Resistenzgens innerhalb der Genkassette. Die Vitalität der resultierenden Stämme BL21(DE3) I ($\Delta rybA::FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$), BL21(DE3) II ($\Delta znuA::FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$), und BL21(DE3) III (283526-284439 *FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9*) wurde anhand von Wachstumskurven überprüft (Abbildung 3.2). Hierbei zeigte sich, dass alle drei Stämme ein vergleichbares (wenn auch im Vergleich zu BL21(DE3) etwas verlangsamtes) Wachstumsverhalten aufwiesen. In dieser Hinsicht stellte somit keine der gewählten Integrationsstellen einen Vor- oder Nachteil dar.

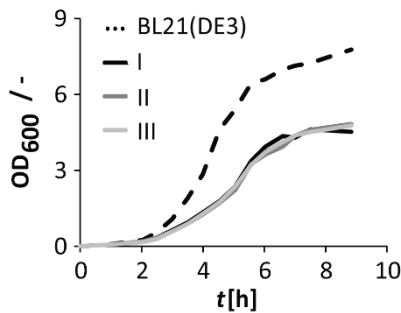


Abbildung 3.2: Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) nach chromosomaler Integration von *gfp1-9*. (I) BL21(DE3) I ($\Delta ryaA::FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$), (II) BL21(DE3) II ($\Delta znuA::FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$), (III) BL21(DE3) III (283526-284439 $FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$). Gezeigt ist die optische Dichte der entsprechenden Kulturen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm während eines neunstündigen Wachstums unter Standardbedingungen.

Da GFP1-9 (aufgrund des Nichtvorhandenseins eines Tags) nicht mittels Standard-Nachweismethoden, wie Immunopräzipitation, nachgewiesen werden konnte, wurde ein indirekter Ansatz zum Nachweis der rekombinanten Produktion von GFP1-9 entwickelt. Hierfür wurde ein Fusionsprotein aus den beiden GFP β -Faltblättern S10 und S11 (welche in GFP1-9 nicht vorhanden waren) und der Wildtyp-Pumilio Homologie-Domäne generiert (Pum-S10-S11). Die Interaktion dieses Fusionsproteins mit GFP1-9 sollte eine schnelle, RNA-unabhängige 2-Komponenten Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) zur Folge haben. Die rekombinante Produktion von Pum-S10-S11 sowie die anschließende Reinigung mittels IMAC erfolgten analog zu S10-WT und Var1-S11^[302] und wurden gelelektrophoretisch überprüft (Abbildung 3.3). Sowohl mittels Coomassie-Färbung, als auch mittels Western Blot konnte eine Proteinbande zwischen 40 und 55 kDa detektiert werden, die Pum-S10-S11 (48.4 kDa) zugeordnet werden konnte. Insgesamt wurde eine Ausbeute von 5 mg Pum-S10-S11 pro Liter Kultur erhalten.

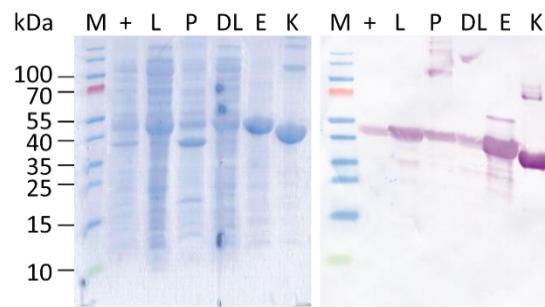


Abbildung 3.3: Rekombinante Produktion und Reinigung von Pum-S10-S11. (links) 10%iges SDS-PAGE-Gel nach Coomassie-Färbung, (rechts) NC-Membran nach Inkubation mit Anti-His- und Anti-Maus-AP-Antikörper. (M) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (+) Zellen nach Induktion mit IPTG, (L) Überstand nach Zellyse, (P) Pellet nach Zellyse, (DL) Durchlauf der HisTrap™ Säule, (E) konzentriertes Eluat nach Zugabe von 150 mM Imidazol, (K) Kontroll-Protein S10-WT (44.6 kDa).

Das Protein Pum-S10-S11 wurde im Folgenden zum indirekten Nachweis für lösliches GFP1-9 verwendet (Abbildung 3.4A). Hierfür wurden BL21(DE3) I, II und III Zellen zunächst aufgeschlossen und der lösliche Anteil der Proteine mit gereinigtem Pum-S10-S11 versetzt. Das resultierende Fluoreszenzsignal wurde nach sechsstündiger Inkubation bei 22 °C gemessen ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$). In Abbildung 3.4B ist zu erkennen, dass die Intensität der erhaltenen Fluoreszenzsignale für alle drei *E. coli* BL21(DE3) Stämme vergleichbar war. Eine Limitierung des Fluoreszenzsignals durch eine zu geringe Konzentration des Proteins Pum-S10-S11 konnte ausgeschlossen werden. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die Konzentration an löslichem GFP1-9 in allen drei Fällen ähnlich hoch war, und die Integrationsstelle keinen Einfluss auf die Expression von *gfp1-9* hatte.

In einem weiteren Experiment wurden Zellen mit chromosomal integriertem *gfp1-9* mit *E. coli* BL21(DE3) Zellen verglichen, die die *gfp1-9* Genkassette (Abbildung 3.1A) in einem zusätzlichem Plasmid (pSJK1) trugen. In diesem Fall wurde die Fluoreszenzentwicklung nach Zugabe des Fusionsproteins Pum-S10-S11 zum Zelllysat über einen Zeitraum von 15 h detektiert.

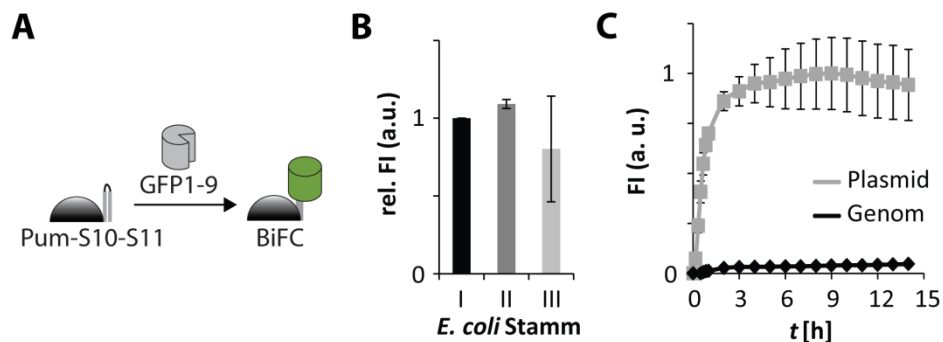


Abbildung 3.4: Detektion von konstitutiv produziertem GFP1-9 in *E. coli* Zelllysat mittels BiFC. (A) Schematische Darstellung der bimolekularen Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) zur Detektion rekombinant produziertem, löslichem GFP1-9. Pum-S10-S11 enthält die beiden GFP β -Faltblätter S10 und S11, welche zusammen mit GFP1-9 zur Rekonstitution von GFP und somit zum detektierbaren Fluoreszenzsignal führen. (B) BiFC mit Lysat der *E. coli* Stämme BL21(DE3) I, II und III sowie Pum-S10-S11. $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$, $t = 6 \text{ h}$. Normiert auf BL21(DE3) I, Fehlerbalken geben die Standardabweichung von Duplikaten an. (C) BiFC mit Lysat von *E. coli* Zellen, die die Genkassette zur chromosomalen Integration (—) in einem Plasmid (*E. coli* BL21(DE3) pSJK1) oder (—) im Genom trugen (*E. coli* BL21(DE3) II). $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$. Normiert auf maximale Fluoreszenz von BiFC, die Balken geben die Mittelwerte von Duplikaten an.

Die in Abbildung 3.4C dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Fluoreszenzsignale, die mittels BiFC von GFP1-9 mit Pum-S10-S11 erhalten wurden, bei dem Plasmid-basierten Ansatz deutlich stärker waren, als bei Verwendung von Zellen mit chromosomal integriertem *gfp1-9*. Auffällig war hierbei, dass die maximale Fluoreszenzintensität des Plasmid-basierten Ansatzes die des chromosomalen Ansatzes um einen Faktor von 23 überstieg. Diese Zahl korreliert mit der

Kopienzahl des verwendeten pET-Plasmids, welches als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pSJK1 verwendet wurde (Kopienzahl: 15-40^[309, 310]). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Konzentration an löslichem GFP1-9 durch einen Plasmid-basierten Ansatz weiter erhöht werden kann.

Es wurden daher keine FACS-Experimente mit Zellen durchgeführt, bei denen *gfp1-9* mittels chromosomaler Integration in das Genom von *E. coli* eingeführt wurde. Stattdessen wurde in einem zweiten Ansatz *gfp1-9* anhand eines Vektors in *E. coli* eingebracht (Kapitel 3.1.2).

3.1.2 Plasmid-basierte Einbringung von *gfp1-9*

Um die Konzentration an löslichem GFP1-9 zu erhöhen, wurde in einem zweiten Ansatz ein Plasmid mit einer hohen Kopienzahl anstelle des chromosomal integrierten *gfp1-9* (Kapitel 3.1.1) zur rekombinanten Produktion von GFP1-9 verwendet. Hierzu wurde *gfp1-9* unter Kontrolle des T7-Promotors in pUC19-T kloniert (Kopienzahl 500-700,^[309] resultierendes Plasmid: pSJK11, Abbildung 3.5A). Auch in diesem Fall wurde gereinigtes Pum-S10-S11 verwendet, um lösliches GFP1-9 im Zelllysate von BL21(DE3) pSJK11 Zellen mittels BiFC nachzuweisen. In Abbildung 3.5B ist das Ergebnis der 15-stündigen Fluoreszenzmessung gezeigt. Als Negativkontrolle wurde Zelllysate verwendet, welches nicht mit Pum-S10-S11 versetzt worden war. Die erhaltenen Daten zeigten, dass auch in diesem Fall die bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung zum Nachweis von GFP1-9 erfolgreich war und dieses löslich *in vivo* produziert worden war.

Die Produktion der restlichen TetFC-Komponenten (Pumilio-Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie der Ziel-RNA) erfolgte unter Verwendung des Plasmids pSJK7 (Abbildung 3.5A). Dessen Ausgangsplasmid pACYCDuetTM-1 besitzt einen p15A Replikationsursprung und somit eine durchschnittliche Kopienzahl von 10-22^[309, 310] sowie zwei T7-Promotoren. Die Gene *s10-wt* und *var1-s11* wurden unter Kontrolle jeweils eines T7-Promotors in die beiden Klonierungsstellen von pACYCDuetTM-1 eingebracht. Zusätzlich wurde die Sequenz für die Produktion der Ziel-RNA boxAB unter Kontrolle eines dritten, zusätzlichen T7-Promotors an eine weitere Position innerhalb desselben Plasmids kloniert.

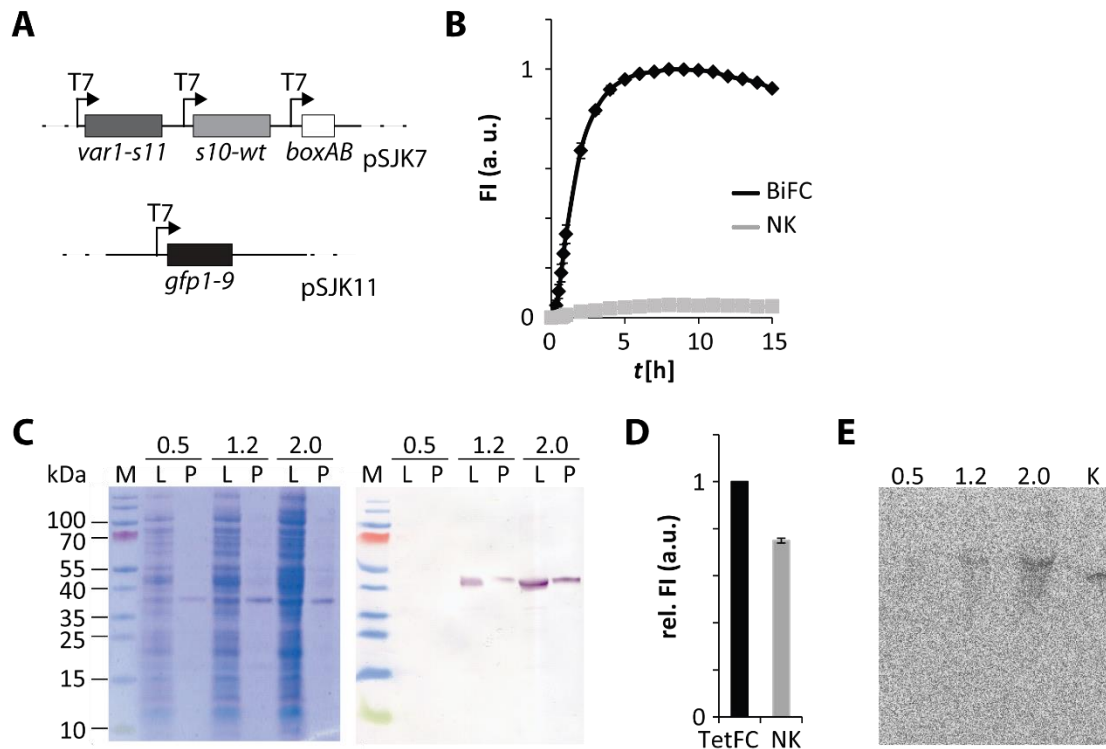


Abbildung 3.5: Ansatz zur Etablierung von TetFC *in vivo* mittels Plasmid-basierter Produktion von GFP1-9. (A) Schematische Darstellung des Expressionssystems. Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie der Ziel-RNA boxAB erfolgt mit Hilfe des Plasmids pSJ7 unter Kontrolle von drei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe. *gfp1-9* wird anhand des Plasmids pSJ11 in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht und ebenfalls unter der Kontrolle eines T7-Promotors rekombinant produziert. (B) Überprüfung der GFP1-9 Produktion mittels BiFC durch Zugabe von Pum-S10-S11 zu BL21(DE3) pSJ11 Zellysat. Als Negativkontrolle (NK) wurde Zellysat ohne Pum-S10-S11 verwendet. $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$. Normiert auf maximale Fluoreszenz von BiFC, Balken geben die Mittelwerte von Duplikaten an. (C) Überprüfung der rekombinanten Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 in BL21(DE3) pSJ7. (links) 10 %iges SDS-PAA-Gel nach Coomassie-Färbung, (rechts) NC-Membran nach Inkubation mit Anti-His und Anti-Maus-AP-Antikörper. (M) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (L) Überstand nach Zellyse, (P) Pellet nach Zellyse, (0.5, 1.2, 2.0) optische Dichte bei 600 nm zum Zeitpunkt der Probennahme. (D) TetFC mittels parallel produzierten Pumilio-Fusionsproteinen S10-WT und Var1-S11 (gereinigt, verwendetes Plasmid: pSJ4), boxAB RNA und GFP1-9. Als Negativkontrolle (NK) wurde ein Ansatz ohne RNA verwendet. $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$, $t = 13 \text{ h}$. Normiert auf TetFC, Balken geben die Mittelwerte von Duplikaten an. (E) Überprüfung der Produktion von Ziel-RNA boxAB. (0.5, 1.2, 2.0) optische Dichte zum Zeitpunkt der Probennahme. Es wurde jeweils dieselbe Menge Total-RNA eingesetzt. (K) 127 bp DNA-Fragment inklusive boxAB Motiv. Als Sonde wurden ^{32}P - α -CTP-markierte Fragmente verwendet, die mittels Amersham™ Megaprime™ DNA Labeling System und hb-boxAB DNA-Konstrukt hergestellt wurden.

Für die *in vitro* Experimente war ein Minimal-Motiv von 35 nt für boxAB verwendet worden, bei denen die beiden von Pumilio erkannten 8 nt-Sequenzen von einem 5 nt-Linker getrennt sind, und zusätzlich am 5'-Ende von 10 nt und am 3'-Ende von 4 nt flankiert werden.^[302] Anhand von Northern Blot Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei rekombinanter Produktion in *E. coli* die Konzentration der boxAB RNA deutlich erhöht wird, wenn das entsprechende RNA-Konstrukt von ca. 40 nt auf ca. 120 nt verlängert wird.^[311] Die Verlängerung der RNA fand dabei im Kontext der natürlichen Sequenz der RNA *hunchback* statt (hb-boxAB). Für die *in vivo* Etablierung von TetFC

anhand von Plasmid pSJK7 (Abbildung 3.5) wurde ebenfalls diese verlängerte Version verwendet, bei der boxAB am 5'-Ende um 57 nt und am 3'-Ende um 37 nt verlängert vorliegt.

Zur Überprüfung der Verfügbarkeit der einzelnen Komponenten wurden BL21(DE3) Zellen zunächst mit Plasmid pSJK11 (zur Produktion von GFP1-9) und anschließend mit pSJK7 (zur Produktion von S10-WT, Var1-S11 und RNA boxAB) transformiert. Zelllysate und Total-RNA der resultierenden BL21(DE3) pSJK11+pSJK7 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression (optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) = 0.5, 1.2 und 2.0) präpariert und für Western und Northern Blots verwendet. Die Proben „1.2“ und „2.0“ waren bei einer OD_{600} = 0.4 zur Induktion der Genexpression mit 0.16 mM IPTG versetzt worden. In Abbildung 3.5E ist zu erkennen, dass die Ziel-RNA boxAB bei einer OD_{600} von ≥ 1.2 nach IPTG-Zugabe mittels Northern Blot detektiert werden konnte und die Konzentration mit steigender OD_{600} zunahm. Weiterhin ist den in Abbildung 3.5C dargestellten Ergebnissen zu entnehmen, dass die Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 ebenfalls bei einer OD_{600} von ≥ 1.2 nach IPTG-Zugabe detektiert wurden. Da die beiden Pumilio-Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 jedoch ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen (44.6 kDa und 46.1 kDa), und jeweils nur eine Bande mittels Coomassie-Färbung oder Western Blot detektiert wurde, die den Proteinen zugeordnet werden konnte, konnte anhand des Western Blots nicht eindeutig gesagt werden, ob nur eines, oder beide Proteine rekombinant produziert wurden. Aus diesem Grund wurden die Proteine mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt und zur Detektion von boxAB mittels TetFC eingesetzt. Um auszuschließen, dass nach einer parallelen Produktion von Fusionsproteinen und RNA von Plasmid pSJK7 die boxAB RNA gebunden vorliegt und mit gereinigt werden würde, wurde die Reinigung der Pumilio-Fusionsproteine nicht unter Verwendung von BL21(DE3) pSJK7, sondern von BL21(DE3) pSJK4 Zellen vorgenommen. Plasmid pSJK4 enthält analog zu pSJK7 *s10-WT* und *var1-s11* unter Kontrolle von jeweils einem T7-Promotor, ermöglicht jedoch nicht die Produktion der Ziel-RNA boxAB (Abbildung 3.7A). Die Zugabe von GFP1-9 und *in vitro* produzierter RNA boxAB zu aus BL21(DE3) pSJK4 gereinigten Pumilio-Fusionsproteinen, und die anschließende Analyse mittels TetFC resultierte in einem Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abbildung 3.5D). Da frühere Experimente, bei denen entweder S10-WT oder Var-S11 ausgelassen worden waren, bereits zeigten, dass für eine erfolgreiche GFP-Komplementierung beide Pumilio-Fusionsproteine vorhanden sein müssen,^[302] konnte daraus geschlossen werden, dass beide Fusionsproteine rekombinant produziert worden waren. Die relativ hohe Fluoreszenz der Negativkontrolle ohne RNA (75 % im Vergleich zum Ansatz

mit RNA boxAB) war bei getrennter Reinigung der Pumilio-Fusionsproteine zuvor nicht beobachtet worden^[302] und deutet möglicherweise darauf hin, dass durch die parallele Produktion beider Proteine eine Interaktion dieser miteinander begünstigt wird.

Eine erste Voraussetzung für die Etablierung von TetFC *in vivo* – die rekombinante Produktion der vier benötigten Komponenten – war somit erfüllt. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der möglichen Interaktion von Pumilio-Fusionsproteinen und boxAB-RNA für die Experimente *in vitro* Plasmid pSJK4 zur Produktion von S10-WT und Var1-S11 verwendet worden war, anstelle Plasmid pSJK7, welches die zusätzlichen genetischen Informationen zur Produktion von boxAB enthält.

Für die Analyse der tatsächlichen Fluoreszenzkomplementierung *in vivo* wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen zunächst mit Plasmid pSJK11 und anschließend mit pSJK7 transformiert (BL21(DE3) pSJK11+pSJK7). Für die Induktion der Genexpression wurden 0.16 mM oder 1.6 mM IPTG eingesetzt und die Zellen anschließend mittels FACS hinsichtlich grüner Fluoreszenz untersucht. Hierzu wurde das geometrische Mittel der im FITC-Kanal ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$) erhaltenen Fluoreszenzsignale analysiert. Als Negativkontrollen wurden Zellen verwendet, bei denen die Sequenz zur Produktion von boxAB (NK3) oder Plasmid pSJK7 (NK2) oder beide Plasmide pSJK11 und pSJK7 (NK1) fehlten. Bei Vergleich der BL21(DE3) pSJK11+pSJK7 Zellen mit den Negativkontrollen konnte jedoch kein Unterschied in Bezug auf die Fluoreszenzintensität der verwendeten Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.6). Der Versuch, die TetFC anhand einer 2-Plasmid-basierten Integration der Komponenten in *E. coli* zu erreichen, war somit nicht erfolgreich.

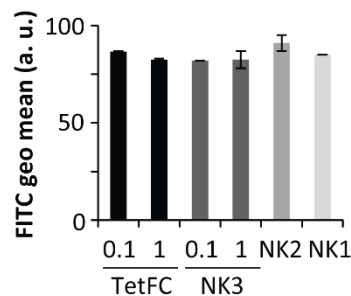


Abbildung 3.6: Durchflusszytometrische Analyse von TetFC mittels Plasmid-basierter Produktion von GFP1-9. Geometrisches Mittel der Fluoreszenz der (TetFC) BL21(DE3) pSJK11+pSJK7, (NK3) BL21(DE3) pSJK11+pSJK4, (NK2) BL21 pSJK11, (NK1) BL21(DE3) Zellen, gemessen im FITC-Kanal ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$). Balken geben die Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen an.

Generell sind unterschiedliche Ursachen für die nicht erfolgte Fluoreszenzkomplementierung denkbar. So könnten beispielsweise die einzelnen Komponenten in einer zu geringen Konzentration produziert worden sein, sodass das resultierende Fluoreszenzsignal zu schwach ausfällt. Eine

weitere Möglichkeit wäre, dass die einzelnen Komponenten zwar in einer ausreichend hohen Menge produziert werden, aber nicht gleichzeitig zur Verfügung stehen. Während beispielsweise die Proteine noch produziert werden, könnte es sein, dass die Ziel-RNA bereits wieder abgebaut wird und nicht von den Pumilio-Fusionsproteinen gebunden werden kann. Auf diese Weise würde ebenfalls keine Komplementierung von GFP stattfinden. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die Konzentration der TetFC-Komponenten ausreichend ist, die Komplementierung jedoch aufgrund anderer Faktoren wie die Anwesenheit störender Total-RNA, kompetitiver RNA-bindender Proteine, nicht idealer Salzkonzentrationen oder einem falschen Temperaturbereich nicht möglich ist.

Um die Verfügbarkeit der RNA zu adressieren, wurde die Ziel-RNA in einem dritten Ansatz zur Etablierung von TetFC *in vivo* durch Anfügen von Haarnadelstrukturen stabilisiert (Kapitel 3.1.3). Ein weiterer Ansatz, die unabhängige Produktion der Ziel-RNA zu einem späteren Zeitpunkt, wurde in Kapitel 3.1.4 adressiert.

3.1.3 Stabilisierte RNA

Aufgrund der Tatsache, dass die zwei-Plasmid-basierte Etablierung von TetFC trotz Verwendung eines Plasmids mit hoher Kopienzahl zur Produktion von GFP1-9 nicht erfolgreich war (Kapitel 3.1.2), wurde in einem alternativen Ansatz die Stabilität der RNA adressiert. Prokaryotische mRNA hat je nach Funktion lediglich eine durchschnittliche Halbwertszeit von weniger als sieben Minuten.^[312] Insbesondere durch stabilisierende Haarnadelstrukturen am 5'-Ende der RNA kann ihre Lebensdauer jedoch verlängert werden.^[313] Um die Ziel-RNA *boxAB* vor dem Abbau innerhalb der Zelle zu schützen, wurde sie am 5'- und 3'-Ende mit folgenden Sequenzen versehen, die jeweils eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden: (I) 5F: GGGAGACCACAACGGTTTCCC, (II) 3F: TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTTGAGGGGTTTTTGCCT.^[314] Hierfür wurde die anhand der natürlichen *hunchback* Sequenz verlängerte *boxAB* (*hb-boxAB*, Kapitel 3.1.2) zunächst in das Plasmid pWH610L3F5F kloniert, welches neben den Haarnadelstrukturen 5F und 3F den IPTG-induzierbaren und besonders starken Promotor p_{tac} enthält (resultierendes Plasmid: pSJK18).^[315, 316] Anschließend wurde das gesamte Konstrukt, bestehend aus Promotor und 5F-*boxAB*-3F in Plasmid pRSFDuetTM-1 kloniert, welcher eine Kopienzahl von >100 besitzt (resultierendes Plasmid: pSJK20, Abbildung 3.7A).^[317] Die schematische Darstellung des stabilisierten Konstruktes 5F-*boxAB*-3F sowie die mittels *mfold web server*^[318] berechnete Struktur der RNA sind in Abbildung 3.7B und C dargestellt.

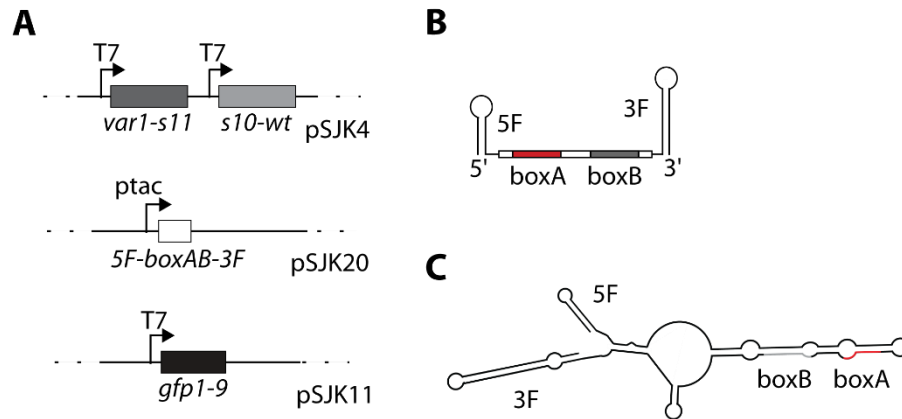


Abbildung 3.7: Konzept zur Etablierung von TetFC *in vivo* mittels stabilisierter RNA. (A) Schematische Darstellung des Expressionssystems. Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 erfolgt mit Hilfe des Plasmids pSJK4 unter Kontrolle von zwei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe. *gfp1-9* wird anhand des Plasmids pSJK11 in *E. coli* BL21-Gold(DE3) eingebracht und ebenfalls unter der Kontrolle eines T7-Promotors rekombinant produziert. Die Produktion der mittels Haarnadelschleifen 5F und 3F stabilisierten Ziel-RNA *boxAB* erfolgt unter Kontrolle des Promotors *ptac* nach IPTG-Zugabe mit Hilfe des Plasmids pSJK20. (B) Schematische Darstellung des Konstrukts 5F-boxAB-3F, bei dem die Ziel-RNA *boxAB* von Haarnadelstrukturen am (5F) 5'-Ende und (3F) 3'-Ende flankiert ist. (C) Mittels *mfold web server* berechnete Struktur des in (B) dargestellten Konstrukts 5F-boxAB-3F.

Zur Überprüfung, ob die Motive *boxA* und *boxB* nach der Stabilisierung mit den Haarnadelschleifen 3F und 5F weiterhin für die Pumilio-Fusionsproteine zugänglich sind, wurde die entsprechende RNA mittels T7-Transkription *in vitro* hergestellt und für TetFC eingesetzt. Die in Abbildung 3.8A gezeigten Daten zeigen einen deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals, was für eine erfolgreiche Komplementierung spricht. Weiterhin ist zu erkennen, dass im Vergleich zu dem nicht stabilisierten 35 nt-Minimalmotiv *boxAB* eine dreifach höhere Fluoreszenzintensität erhalten wurden. Dies könnte auf eine strukturelle Veränderung hinweisen, die durch die stabilen Haarnadelstrukturen bewirkt wird und die Bindung der Pumilio-Varianten an *boxA* und *boxB* erleichtert, oder durch eine allgemein bessere Stabilität der 5F-*boxAB*-3F RNA begründet sein.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Anfügen zusätzlicher Haarnadelstrukturen an RNA *boxAB* die TetFC nicht negativ beeinträchtigt, sondern sogar verbessert, wurde die Transkription des Konstrukts *in vivo* überprüft. Hierfür wurden zunächst BL21-Gold(DE3) Zellen, welche eine bessere Transformationseffizienz als BL21(DE3) Zellen aufweisen,^[319] nacheinander mit den Plasmiden pSJK11, pSJK20 und pSJK4 (Abbildung 3.7A) transformiert und nach rekombinanter Produktion der TetFC-Komponenten die Total-RNA isoliert. Northern Blot Experimente bestätigten die Integrität des Konstrukts 5F-*boxAB*-3F (Abbildung 3.8B).

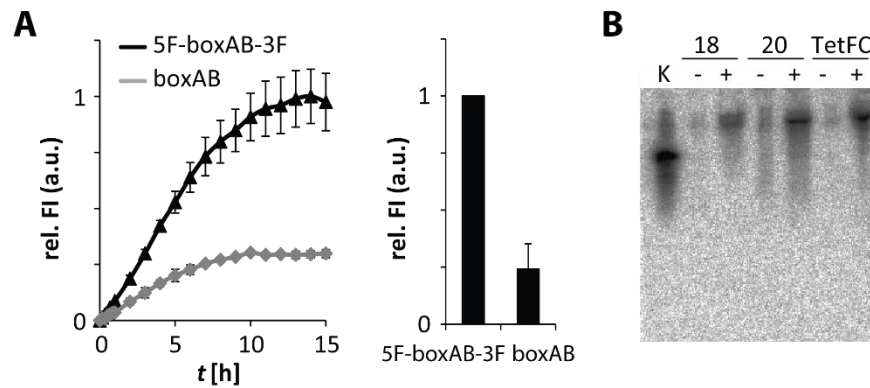


Abbildung 3.8: Stabilisierung der RNA boxAB. (A) Überprüfung der stabilisierten Ziel-RNA (—) 5F-boxAB-3F mittels TetFC im Vergleich zur (---) nicht-stabilisierten boxAB RNA (35 nt). (links) Zeitlicher Verlauf eines repräsentativen Experiments. Die Datenpunkte geben die mittleren Werte einer Messung als Doppelbestimmung an. (rechts) Erhaltenen maximalen Fluoreszenzsignale ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$) nach 12 h. Die Werte sind normiert auf TetFC mit 5F-boxAB-3F. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (Doppelbestimmungen) an. (B) Northern Blot zur Überprüfung der *in vivo* Produktion von 5F-boxAB-3F. (K) Kontroll-Konstrukt (80 nt), Total-RNA von (18) BL21(DE3) pSJK18, (20) BL21(DE3) pSJK20 und (TetFC) BL21(DE3) pSJK11+pSJK20+pSJK4 Zellen (-) vor und (+) nach Induktion mit 0.16 mM IPTG. Es wurde jeweils dieselbe Menge Total-RNA eingesetzt.

Der Vergleich mit Total-RNA von BL21-Gold(DE3) pSJK20 (Zellen trugen lediglich Plasmid pSJK20 zur Produktion der stabilisierten RNA 5F-boxAB-3F, nicht aber diejenigen Plasmide zur Produktion der TetFC-Proteinkomponenten), zeigte zudem, dass in An- oder Abwesenheit weiterer Plasmide keine signifikanten Unterschiede bei der RNA-Konzentration vorlagen. Dies deutete darauf hin, dass bei gleichzeitiger Produktion der vier TetFC-Komponenten die Produktion der Ziel-RNA weiterhin gewährleistet war. Lediglich im Vergleich zu BL21-Gold(DE3) pSJK18 Zellen war eine Zunahme des entsprechenden Signals im Northern Blot zu beobachten (Abbildung 3.8B). Sowohl pSJK18 als auch pSJK20 besitzen den Promotor p_{tac} , jedoch unterschiedliche Replikationsursprünge (pSJK18: pMB1, pSJK20: RSF1030, Kopienzahl >100 ^[317]), was den Unterschied in der boxA-Konzentration erklären würde.

Nachdem die Verwendbarkeit von 5F-boxAB-3F als Ziel-RNA *in vitro*, und die Produktion der RNA *in vivo* bestätigt worden war, wurde untersucht, ob eine TetFC-abhängige Fluoreszenzentwicklung *in vivo* detektiert werden konnte. Im Gegensatz zur RNA-unabhängigen BiFC von GFP1-9 mit Pum-S10-S11, ist die Effizienz der TetFC bei niedrigen Temperaturen besser als bei höheren Temperaturen.^[311] Aus diesem Grund wurde die rekombinante Produktion der Pumilio-Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11, GFP1-9 sowie der stabilisierten Ziel-RNA 5F-boxAB-3F für 3 h bei 37 °C oder für 15 h bei 17 °C durchgeführt. Da bei der TetFC *in vitro* ein maximales Fluoreszenzsignal nach 10-14 h erreicht wurde,^[302, 320] wurden die Zellen der 37 °C-Expression

anschließend 12 h bei 8 °C inkubiert. Zudem wurde die Konzentration des IPTG zur Induktion der Genexpression von 0.2-1.6 mM variiert. Nach erfolgter Expression und Inkubation wurden die BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK20+pSJK4 Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich grüner Fluoreszenz untersucht. In Abbildung 3.9 ist das geometrische Mittel der im FITC-Kanal erhaltenen Fluoreszenzsignale der TetFC-Zellen nach Induktion mit 0.2-1.6 mM IPTG und rekombinanter Produktion der TetFC-Komponenten bei 17 °C oder 37 °C gezeigt. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die dieselben Plasmide zur Produktion der Proteine GFP1-9, S10-WT und Var1-S11 trugen (pSJK11 und pSJK4), bei denen jedoch Plasmid pSJK20 so verändert wurde, dass boxC (5'-CCCAUAUA-3') anstelle von boxA (5'-UGUAUAUA-3') vorlag (5F-boxCB-3F, Plasmid pSJK20c). In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass weder S10-WT noch Var1-S11 an diese RNA-Sequenz binden.^[302] Entgegen der Erwartungen konnte jedoch kein Anstieg der grünen Fluoreszenzintensität bei den TetFC-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden (Abbildung 3.9). Zudem wurde keine Auswirkung der Expressionstemperatur oder der IPTG-Konzentration auf das Fluoreszenzsignal festgestellt. Diese Daten legen nahe, dass auch mittels stabilisierter RNA keine TetFC *in vivo* erreicht werden konnte. Wie zuvor erwähnt, könnte jedoch der Zeitpunkt der RNA-Produktion eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche TetFC spielen. Auf diesen Punkt wurde daher im folgenden Kapitel näher eingegangen.

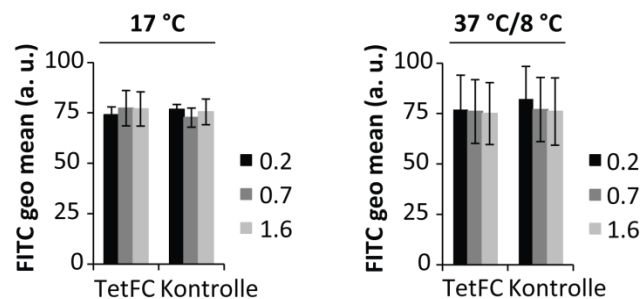


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrische Analyse von TetFC mittels stabilisierter RNA. Geometrisches Mittel der Fluoreszenz der (TetFC) BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK20+pSJK4 und (Kontrolle) BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK20c+pSJK4 Zellen, gemessen im FITC-Kanal ($\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm), nach Expression bei 17 °C oder 37 °C (und Inkubation bei 8 °C). (0.2, 0.7, 1.2) verwendete IPTG-Konzentration [mM]. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von jeweils zwei bis fünf unabhängigen Messungen an.

3.1.4 Tetracyclin-induzierte RNA-Produktion

In einem letzten Ansatz zur Etablierung von TetFC *in vivo* wurde ebenfalls die Stabilität der Ziel-RNA adressiert. Anstatt diese jedoch weiter zu erhöhen und die Produktion simultan mit der der Proteine zu induzieren, wurde eine Methode gewählt, die eine unabhängige Produktion der Ziel-

RNA zu einem späteren Zeitpunkt erlaubt. Als System wurde hier eine Variante des Tet-Systems gewählt, bei dem der Tetracyclin-Repressor tetR unter Kontrolle eines T7-Promotors produziert wird, innerhalb des Operons oberhalb der genetischen Information für die Ziel-RNA bindet und auf diese Weise die Produktion der Ziel-RNA inhibiert. Erst durch Zugabe von Tetracyclin (oder Derivaten hiervon), welches an tetR bindet und so das Operon freigibt, wird die Produktion der Ziel-RNA initiiert (Abbildung 3.10). Dieses System wurde von Valencia-Burton *et al.* für die Analyse von Transkriptionskinetiken in *E. coli* genutzt.^[321]

Insgesamt beinhaltet das in dieser Arbeit entwickelte Expressionssystem zur Tetracyclin-induzierten RNA-Produktion für die TetFC in *E. coli* drei Plasmide: Plasmid pSJK11 zur Produktion von GFP1-9, Plasmid pSJK4 zur Produktion der Pumilio-Fusionsproteine unter Kontrolle von zwei T7-Promotoren (Kapitel 3.1.2), und Plasmid pSJK15 zur Tetracyclin-induzierten Produktion der Ziel-RNA boxAB (Abbildung 3.10).

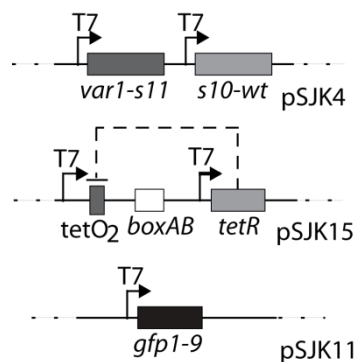


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Expressionssystems zur Etablierung von TetFC *in vivo* mittels Tetracyclin-induzierter Produktion der Ziel-RNA. Die Gene *s10-wt* und *var1-s11* sind auf Plasmid pSJK4 codiert. Ihre Expression erfolgt unter Kontrolle von zwei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe. *gfp1-9* wird anhand des Plasmids pSJK11 in *E. coli* BL21-Gold(DE3) eingebracht und ebenfalls unter der Kontrolle eines T7-Promotors rekombinant produziert. Die Produktion der Ziel-RNA boxAB ist aufgrund der Bindung des Tetracyclin-Repressors tetR an den zweifachen Tetracyclinoperator (tetO₂) zunächst inhibiert und erfolgt erst nach Zugabe von Tetracyclin(-Derivaten) (Plasmid pSJK15).

Die genetischen Informationen zur Produktion von tetR und boxAB sowie Operator tetO₂, an den die Bindung von tetR erfolgt, wurden in pRSFDuetTM-1 kloniert. Eine ursprünglich geplante doppelte Insertion von tetO₂ (2xtetO₂) war aufgrund der insgesamt vierfach vorhandenen tetO-Sequenz und den damit verbundenen Problemen bei der Plasmidherstellung nicht erfolgreich.

Als Tetracyclin-Derivate zur Induktion der RNA-Produktion wurden Anhydrotetracyclin (ATC), Doxycyclin (DC) und Minocyclin (MC) verwendet, deren Strukturformeln und Absorptionsspektren in Abbildung 3.11 dargestellt sind. ATC weist im Vergleich zu Tetracyclin eine 33-500-fach höhere Affinität gegenüber tetR auf,^[322, 323] während es gleichzeitig eine geringere Toxizität besitzt.^[324] DC

wurde bereits erfolgreich für verschiedene Tetracyclin-kontrollierte Systeme eingesetzt,^[325-327] und besitzt, ebenso wie MC, eine ähnliche Toxizität wie Tetracyclin.^[324] MC wurde zusätzlich ausgewählt, weil es im Vergleich zu anderen Tetracyclin-Derivaten keine Fluoreszenz *in vivo* aufweist.^[328]

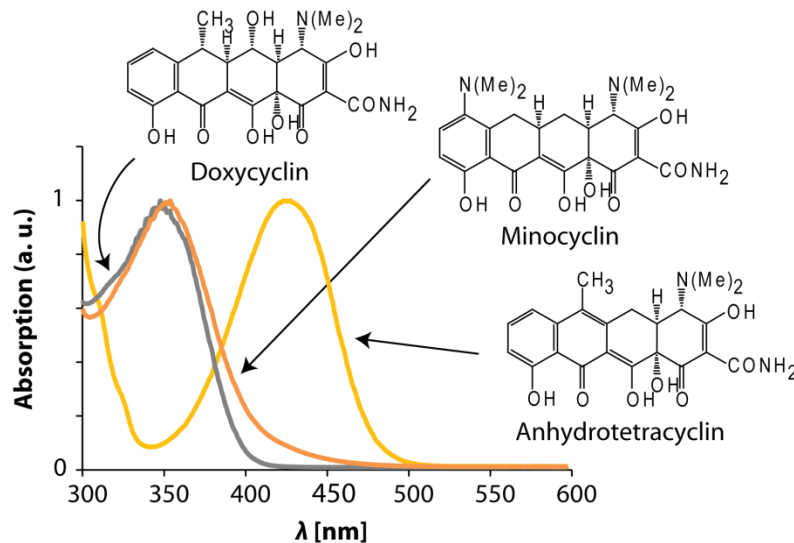


Abbildung 3.11: Vergleich der verwendeten Tetracyclin-Derivate. Strukturformeln und Absorptionsspektren (gemessen mittels Tecan Infinite® M1000 PRO) von (—) Anhydrotetracyclin (ATC), (—) Doxycyclin (DC) und (—) Minocyclin (MC), normiert auf die jeweilige maximale Absorption der einzelnen Tetracyclin-Derivate.

Wie bereits für den Ansatz zur Etablierung von TetFC *in vivo* mittels stabilisierter RNA (Kapitel 3.1.3), wurden für den Ansatz zur Etablierung von TetFC *in vivo* mittels später RNA-Produktion BL21-Gold(DE3) Zellen verwendet. Diese weisen im Vergleich zu BL21(DE3) eine bessere Transformationseffizienz auf; besitzen jedoch zusätzlich eine Tetracyclin-Resistenz.^[319] Diese wird durch das Effluxprotein tetA vermittelt, welches Tetracyclin(-Derivate) aus der Zelle transportiert. Bei der Verwendung von Tetracyclin-Derivaten zur Kontrolle der Ziel-RNA-Produktion ist daher eine sorgfältige Überprüfung der idealen Tetracyclin-Konzentration notwendig. Zusätzlich ist die Eigenfluoreszenz der Tetracyclin-Derivate bei der durchflusszytometrischen Analyse zu berücksichtigen. Daher wurde zunächst der Einfluss verschiedener ATC/DC/MC-Konzentration auf die Fluoreszenz der Zellen analysiert (Abbildung 3.12, Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14). Gezeigt ist jeweils die Fluoreszenzintensität derjenigen Zellen, die mit den Plasmiden pSJK11, pSJK15 und pSJK4 zur Produktion sämtlicher TetFC-Komponenten transformiert worden waren. Vergleichend hierzu wurden Zellen untersucht, denen das Plasmid pSJK15 zur Produktion der Ziel-RNA fehlte. Als Positivkontrolle wurden Zellen eingesetzt, die das komplette GFP als Fusionsprotein der Faltblätter GFP1-9, S10 und S11 produzierten (*whole-split* GFP (wsGFP), BL21-Gold(DE3) pSJK9).

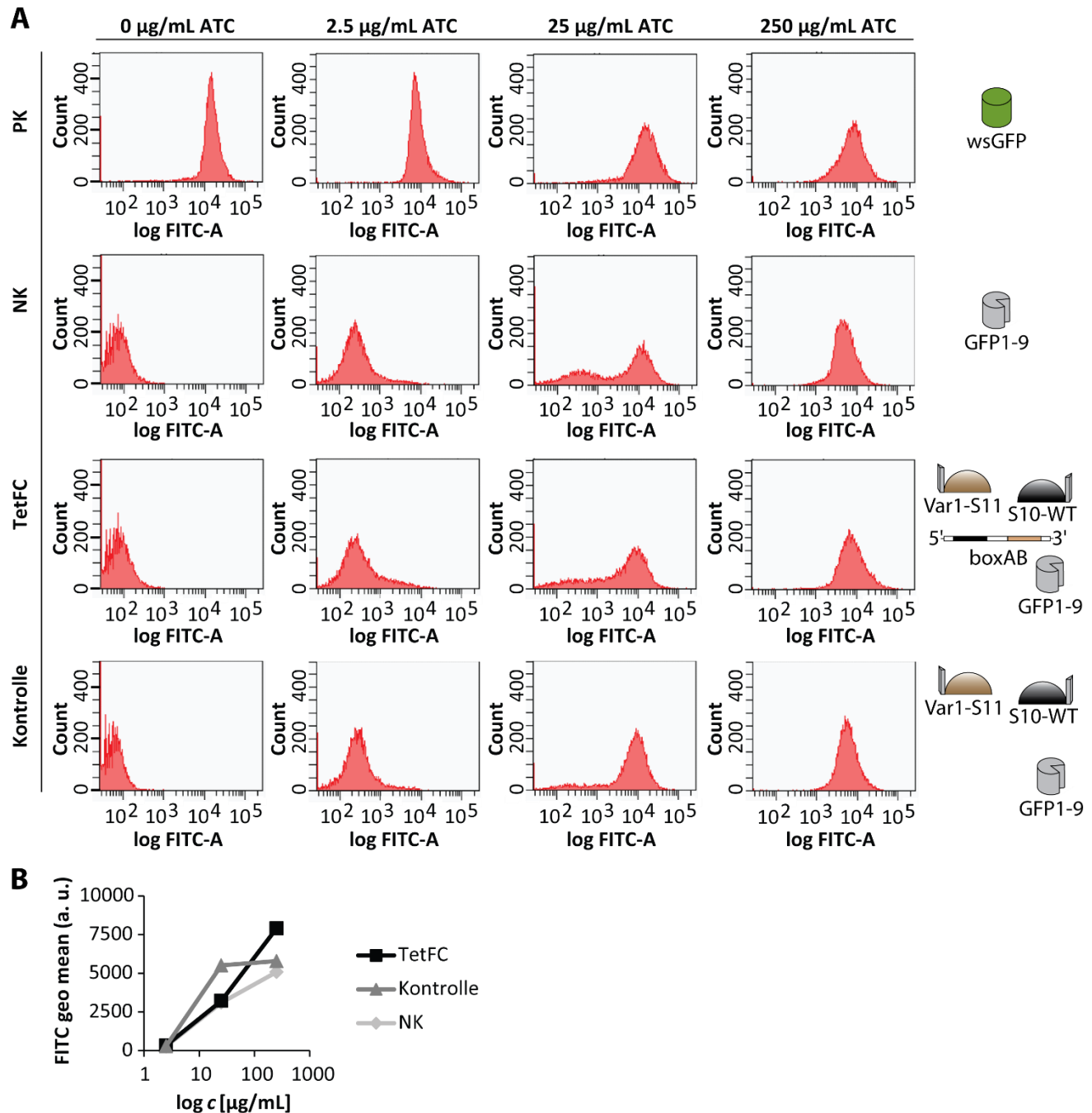


Abbildung 3.12: Einfluss von Anhydrotetracyclin auf die Fluoreszenz von *E. coli* BL21-Gold(DE3). Durchflusszytometrische Analyse von (TetFC) BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4 im Vergleich zu (Kontrolle) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK4. (PK) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK9, (NK) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11 nach 16-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0-250 $\mu\text{g/mL}$) ATC. Gezeigt sind die Daten eines beispielhaften Experiments. **(A)** Die Histogramme zeigen die Anzahl der Ereignisse in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenzintensität, gemessen im FITC-Kanal ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$). **(B)** Gezeigt ist das geometrische Mittel der in (A) dargestellten Daten.

Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die lediglich Plasmid pSJK11 zur Produktion von GFP1-9 besaßen. Im Allgemeinen wurde erwartet, dass die Fluoreszenzintensität der TetFC-Zellen

zwischen den Werten der Negativ- und der Positivkontrolle liegen würde. Außerdem war aufgrund der Komplexität des TetFC-Systems zu erwarten, dass die Fluoreszenzen deutlich geringer als die der Positivkontrolle ausfallen.

Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und die rekombinante Produktion der Proteine durch Zugabe von 0.16 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe von 2.5-250 µg/mL ATC, gefolgt von einer weiteren Kultivierung für 1.5 h bei 37 °C sowie für 14 h bei 8 °C. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse der Zellen zeigte eine Zunahme der Fluoreszenzintensität der TetFC-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten ATC-Konzentration. Diese Fluoreszenzzunahme war jedoch auch bei den Kontroll-Zellen und der Negativkontrolle zu beobachten. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich um eine unspezifische Fluoreszenzzunahme handelt, die durch das ATC selber und nicht durch die ATC-induzierte TetFC verursacht wird (Abbildung 3.12).

Die Zugabe von DC anstelle von ATC führte zu ähnlichen Ergebnissen. Auch in diesem Fall wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz detektiert. Diese war sowohl bei den TetFC-, als auch bei den Kontroll-Zellen und der Negativkontrolle gleichermaßen zu beobachten, fiel jedoch im Vergleich zur Fluoreszenz nach ATC-Zugabe deutlich schwächer aus (Abbildung 3.13). Nach einer Zugabe von 2.5-250 µg/mL DC konnte zudem eine leicht erhöhte Fluoreszenz der TetFC-Zellen im Vergleich zu den Negativkontrollen detektiert werden, was auf eine DC-induzierte Produktion der Ziel-RNA mit anschließender TetFC hindeutet. Bei diesem „Shift“ der Fluoreszenz um etwa 30 % handelte es sich um einen reproduzierbaren Effekt.

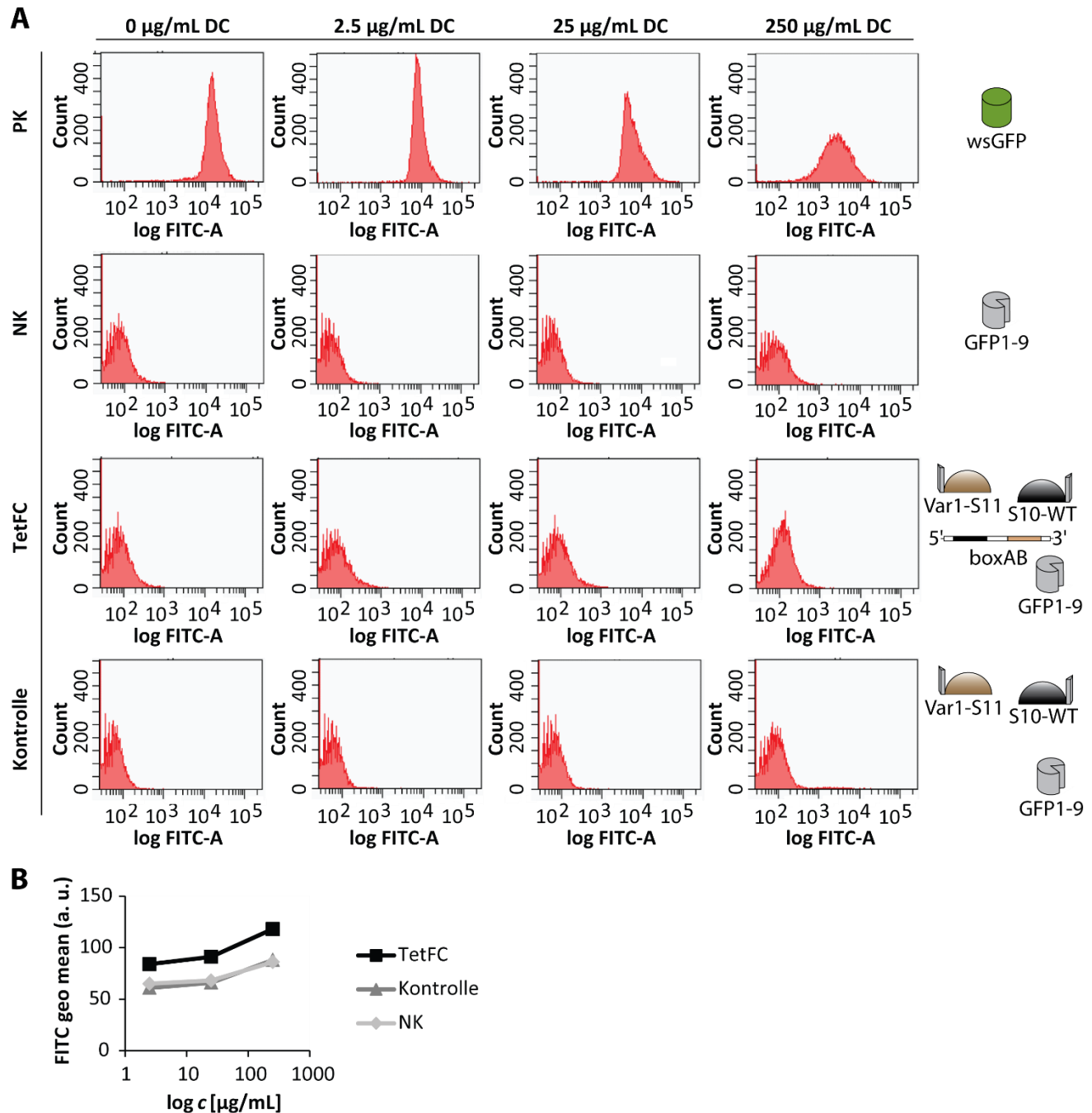


Abbildung 3.13: Einfluss von Doxycyclin auf die Fluoreszenz von *E. coli* BL21-Gold(DE3). Durchflusszytometrische Analyse von (TetFC) BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4 im Vergleich zu (Kontrolle) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK4. (PK) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK9, (NK) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11 nach 16-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0-250 µg/mL) DC. Gezeigt sind die Daten eines beispielhaften Experiments. **(A)** Die Histogramme zeigen die Anzahl der Ereignisse in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenzintensität, gemessen im FITC-Kanal ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$). **(B)** Gezeigt ist das geometrische Mittel der in (A) dargestellten Daten.

Als drittes Tetracyclin-Derivat zur Induktion der Produktion von Ziel-RNA boxAB wurde MC eingesetzt. Anders als bei der Verwendung von ATC oder DC, wurde nach Zugabe von MC keine

unspezifische Fluoreszenzzunahme beobachtet (Abbildung 3.14). Dies ist in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen nicht-vorhandenen Fluoreszenz von MC *in vivo*. Eine TetFC-basierte Fluoreszenz konnte jedoch nicht detektiert werden. Die Fluoreszenz der TetFC-Zellen war bei keiner der verwendeten MC-Konzentrationen höher als die der Negativkontrollen.

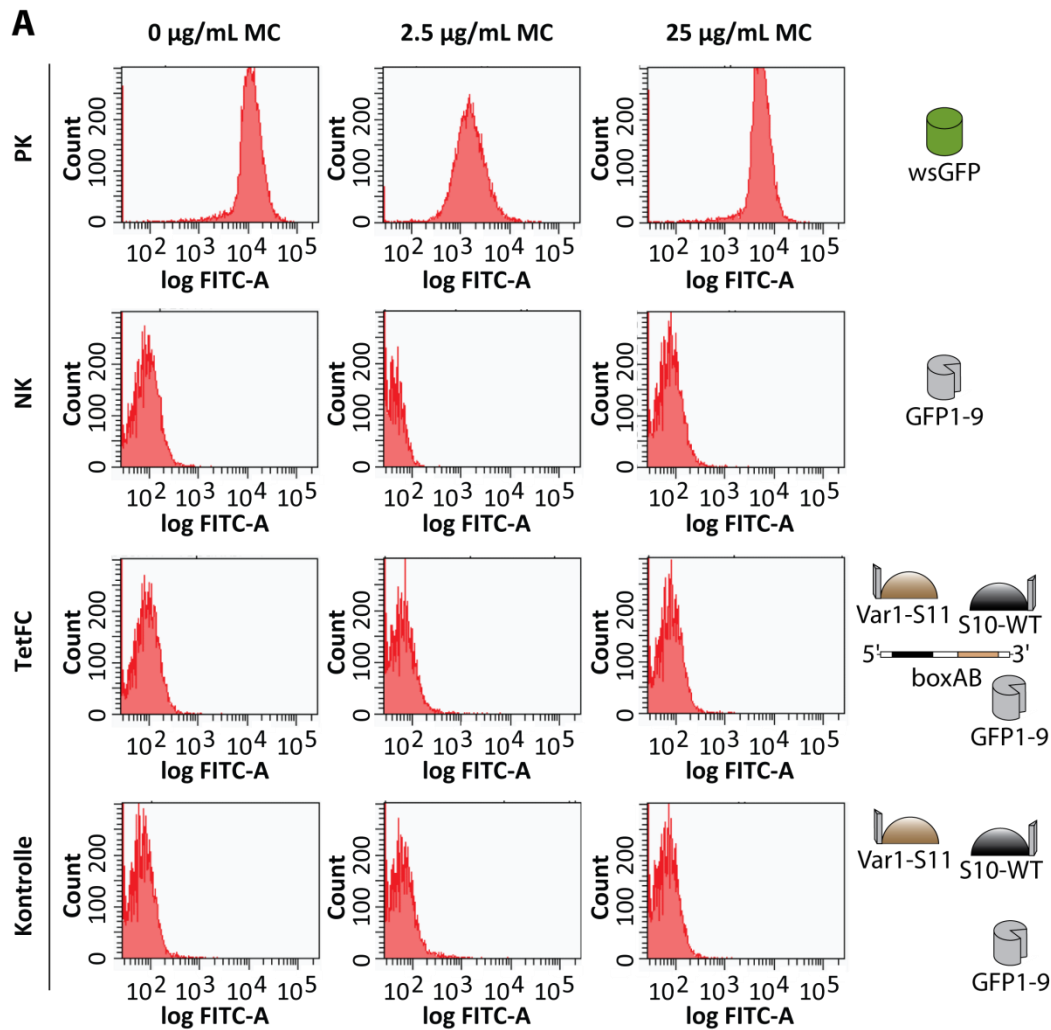


Abbildung 3.14: Einfluss von Minocyclin auf die Fluoreszenz von *E. coli* BL21-Gold(DE3). Durchflusszytometrische Analyse von (TetFC) BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4 im Vergleich zu (Kontrolle) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK4. (PK) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK9, (NK) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11 nach 14-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0-250 µg/mL) MC. Gezeigt sind die Daten zweier Experimente (0/25 µg/mL aus demselben Datensatz). Die Histogramme zeigen die Anzahl der Ereignisse in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenzintensität, gemessen im FITC-Kanal ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Bedingungen, bei denen die Genexpression bei 37 °C erfolgte, wurden die Zellen in Anlehnung an das von Valencia-Burton *et al.* beschriebene System^[321] zunächst bei 37 °C kultiviert und die Temperatur nach Zugabe von IPTG auf 17 °C gesenkt. Nach 14 h wurden die entsprechenden TC-Derivate hinzugegeben und die Zellen weitere 2 h kultiviert.

Abgesehen von der oben beschriebenen, unspezifischen Fluoreszenzzunahme wurde jedoch keine Zunahme der Fluoreszenzintensität der TetFC-Zellen beobachtet. Dies lässt sich damit erklären, dass nach Induktion der Ziel-RNA-Produktion nicht ausreichend Zeit für die Komplementierung des GFP gegeben war und somit ein resultierendes Fluoreszenzsignal nicht detektiert werden konnte. Für die folgenden Experimente wurden daher die ursprünglich getesteten Bedingungen verwendet, bei denen die Expression bei 37 °C erfolgt und die Zellen anschließend bei 8 °C inkubiert werden. Zusätzlich führte eine unmittelbar vor der Kultivierung in Flüssigkultur durchgeführte Transformation der Zellen mit Plasmid pSJK4 zu einer deutlich ausgeprägten Verschiebung der Fluoreszenzintensität nach ATC-Zugabe (Abbildung 3.15A).

Zur Verifizierung, ob der beobachtete Shift der TetFC-Zellen zu höheren Fluoreszenzintensitäten nach ATC/DC-Zugabe (Abbildung 3.12, Abbildung 3.13) im Vergleich zur Kontrolle tatsächlich durch eine erfolgreiche TetFC bedingt war, wurden TetFC-Zellen und Kontroll-Zellen nach Induktion/Inkubation gemischt und die Zellen mittels FACS sortiert. Die ATC/DC-Konzentration betrug jeweils 2.5 - 2.5·10⁴ ng/mL. Im Anschluss wurden die Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität (< 0.5 % der Gesamtzellen) hinsichtlich ihrer Antibiotika-Resistenzen überprüft. Im Gegensatz zu den TetFC-Zellen, die drei Plasmide enthalten (Abbildung 3.10) und sowohl eine Ampicillin-, Kanamycin- als auch Chloramphenicol-Resistenz aufweisen, fehlt den Kontroll-Zellen Plasmid pSJK15 und somit das Kanamycin-Resistenzgen. Dieses Charakteristikum wurde genutzt und jeweils 120-160 Kolonien wurden auf Anwesenheit einer Kanamycin-Resistenz getestet. Hierbei wurden bei Verwendung von ATC 82-99 % positive Kolonien (Zellen mit KanR) identifiziert, wobei diese Werte in direktem Zusammenhang mit der eingesetzten ATC-Konzentration stehen (Abbildung 3.15B). Diese Daten verdeutlichen, dass es anhand von FACS möglich ist, zwischen Zellen zu unterscheiden, die sämtliche Komponenten für die TetFC produzieren, und entsprechenden Zellen, denen die Ziel-RNA fehlt.

Bei Verwendung von DC hingegen wurde lediglich ein maximaler Anteil von 75 % positiver Kolonien erhalten, weswegen der Einsatz von ATC bevorzugt wurde und DC nicht für weitere Experimente eingesetzt wurde.

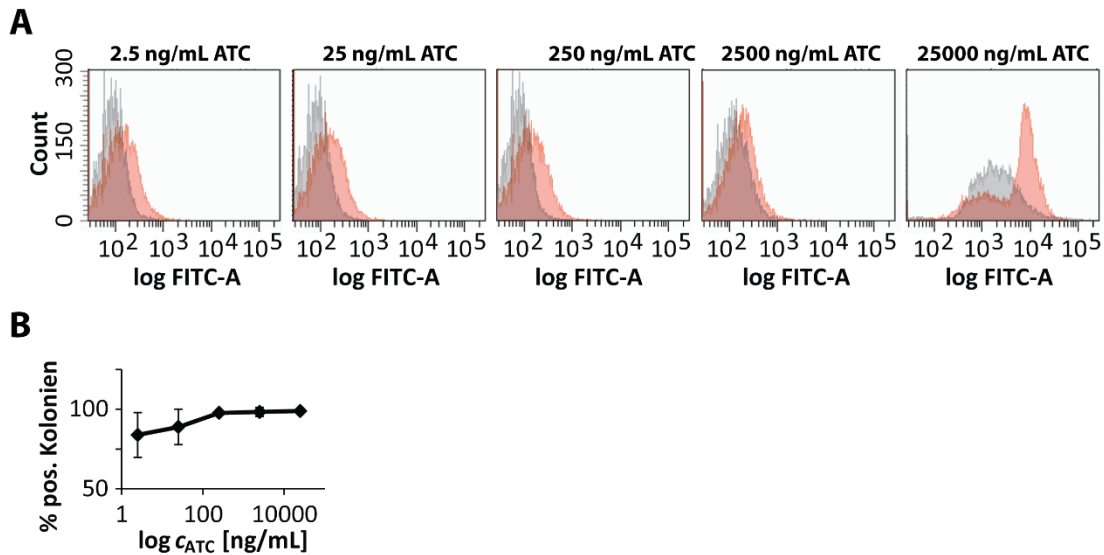


Abbildung 3.15: FACS-basierte Überprüfung der TetFC *in vivo*. (TetFC) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4 und (Kontrolle) BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK4 Zellen wurden nach Induktion mit IPTG und ATC zunächst durchflusszytometrisch analysiert (A). Anschließend wurden die Proben gemischt, und die Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität (<0.5 % der Gesamtzellen) sortiert, kultiviert und auf KanR überprüft (B). **(A)** Durchflusszytometrische Analyse von (rot) BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4 im Vergleich zu (grau) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK4 nach 14-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0-2.5·10⁴ ng/mL) ATC. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experiments. Fluoreszenz gemessen im FITC-Kanal ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$), Überlagerung der Histogramme erfolgte postexperimentell. **(B)** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der erhaltenen Kolonien mit KanR aus drei unabhängigen Experimenten, nach Sortierung der in (A) beispielhaft gezeigten Zellen.

Zur Überprüfung, ob die beobachtete Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von ATC tatsächlich mit einer Zunahme der Ziel-RNA korreliert, wurden quantitative Real-Time-PCRs (qRT-PCRs) durchgeführt. Hierfür wurden *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4 zunächst bei einer $\text{OD}_{600} = 0.4$ mit 0.16 mM IPTG versetzt, weitere 2 h bei 37 °C kultiviert und anschließend mit 2.5-2.5 · 10⁵ ng/mL ATC zur Induktion der RNA-Produktion versetzt und weitere 1.5 h kultiviert. Die Total-RNA wurde isoliert und die entsprechende cDNA mittels reverser Transkription hergestellt. Als Referenzgen wurde das von Zhou *et al.* als stabil exprimiert beschriebene *idnT* verwendet.^[329] Die Verifizierung der PCR-Produkte erfolgte hierbei mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die in Abbildung 3.16 dargestellten Daten verdeutlichen, dass eine maximale Konzentration der Ziel-RNA bei einer Konzentration von 250 ng/mL ATC erzielt wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit den anhand der FACS erhaltenen Daten. Hier konnte ein Anteil von 98 % positiver Zellen nach Zugabe von 250 ng/mL ATC erhalten werden. Dieser Zusammenhang spricht für eine RNA-induzierte Komplementierung von GFP und somit für eine erfolgreiche TetFC.

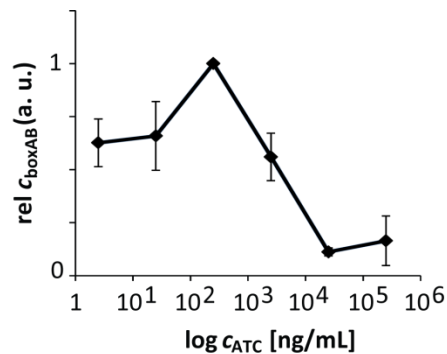


Abbildung 3.16: Analyse der boxA-Konzentration nach Induktion mit ATC. *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4 Zellen wurden zunächst mit 0.16 mM IPTG und nach 2 h bei 37 °C mit $2.5\text{--}2.5 \cdot 10^5$ ng/mL ATC zur Induktion der RNA-Produktion versetzt. Die Total-RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mittels qRT-PCR analysiert. Als Referenzgen wurde *idnT* verwendet. Gezeigt ist die relative boxA-Konzentration aus drei unabhängigen Experimenten.

Um TetFC für ein FACS-basiertes Screening von Pumilio-Varianten in *E. coli* einsetzen zu können, war es jedoch notwendig, dass das System spezifisch ist, und sich bereits kleinste Veränderungen (wie beispielsweise der Austausch einzelner Nukleotide innerhalb des Pumilio-Bindemotivs) auf die GFP-Komplementierung auswirken. Aus diesem Grund wurde Plasmid pSJK15 so verändert, dass die Ziel-RNA anstelle von boxA (5'-UGUAUAUA-3') entweder boxG (5'-UUUAUAUA-3', Plasmid pSJK32) oder boxC (5'-CCCAUAUA-3', Plasmid pSJK33) enthielt. In beiden Fällen enthielten die Zellen weiterhin Plasmide pSJK11 und pSJK4 zur Produktion der Proteinkomponenten. Eine TetFC sollte in beiden Fällen nicht beobachtet werden, oder geringer ausfallen, da Pumilio WT nicht oder mit geringerer Affinität an boxC und boxG bindet ($K_D(\text{WT, boxA}) = 0.48 \pm 0.21$ nM,^[129] im Vergleich zu $K_D(\text{WT, boxG}) = 59 \pm 12$ nM,^[129] und $K_D(\text{WT, boxC})$ nicht bestimmbar^[311]). Auch in diesem Experiment wurden die *E. coli* Zellen zunächst durchflusszytometrisch analysiert, gemischt und anschließend diejenigen Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität (< 0.5 %) mittels FACS sortiert. Im Idealfall würden diejenigen Zellen, die Plasmid pSJK15 zu Produktion der Ziel-RNA boxAB enthalten, das höchste Fluoreszenzsignal liefern und somit den höchsten Anteil der sortierten Zellen ausmachen.

Im Unterschied zu vorangegangenen Experimenten, bei denen die Überprüfung der Zellen nach der FACS mittels Antibiotika erfolgte, fand die Unterscheidung in diesem Fall anhand von PCRs statt (Abbildung 3.17). Grund hierfür war, dass die TetFC-Zellen und die Negativkontrollen die gleichen Ausgangsplasmide trugen und somit dieselben Antibiotika-Resistenzen aufwiesen. Für die PCR wurde ein 5'-Primer gewählt, dessen 3'-Ende die für boxA charakteristische Sequenz enthielt, und

ein Amplifikat nur bei Anwesenheit dieses RNA-Motivs, nicht aber bei Verwendung von boxG oder boxC, erhalten wurde (Abbildung 3.17).

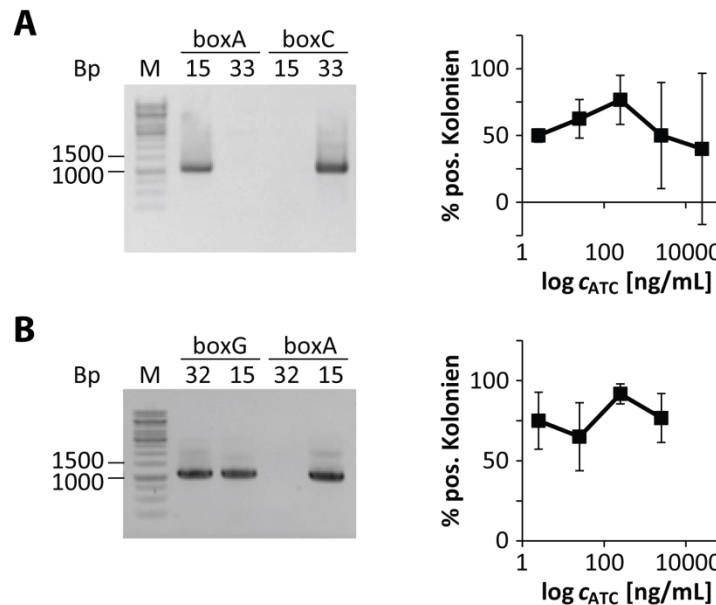


Abbildung 3.17: FACS-basierte Untersuchung der Spezifität von TetFC in vivo. (links) Verifizierung der Spezifität der eingesetzten Oligonukleotide zur Unterscheidung zwischen boxA/boxC und boxA/boxG mittels PCR. (rechts) *E. coli* Zellen, die die Ziel-RNA boxAB (BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK15+pSJK4) produzierten, wurden mit (A) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK32+pSJK4 oder (B) *E. coli* BL21-Gold(DE3) pSJK11+pSJK33+pSJK4 gemischt, die anstelle von boxAB RNA boxGB oder boxCB produzierten. Die Zellen mit der höchsten (< 0.5 %) Fluoreszenzintensität wurden sortiert, kultiviert und mittels PCR auf Anwesenheit von boxA überprüft. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Kolonien mit boxA aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Überprüfung der nach FACS isolierten Zellen, die entweder boxAB oder die nicht-Ziel-RNA boxCB mit drei unterschiedlichen Nukleotiden produzierten, zeigte, dass 40-77 % der getesteten Kolonien boxA trugen. Der höchste Wert wurde nach Induktion der Ziel-RNA-Produktion mit 250 ng/mL ATC erhalten (Abbildung 3.17A, rechts). Erwartungsgemäß liegt dieser Wert unter den 82-99 %, die erhalten wurden, wenn die Kontrollzellen keinerlei Ziel-RNA produzierten (Abbildung 3.15). Bei Verwendung von RNA boxGB, konnte in 65-92 % der überprüften Kolonien boxA nachgewiesen werden, wobei auch hier die besten Ergebnisse nach Zugabe von 250 ng/mL ATC erzielt wurden (Abbildung 3.17B, rechts). Da sich boxGB lediglich in einem Nukleotid von boxAB unterscheidet, war erwartet worden, dass in diesem Fall ein stärkerer Hintergrund durch unspezifische GFP-Komplementierung erhalten wird und folglich der Anteil der boxA-tragenden Kolonien nach der Sortierung geringer ist als bei Verwendung von boxCB. Eine mögliche Erklärung für die entgegengesetzte Beobachtung wäre ein Ungenauigkeit durch die geringere Anzahl mittels PCR getesteter Kolonien (n = 20 im Vergleich zu n > 120 bei der Antibiotika-basierten Überprüfung).

Eine weitere denkbare Erklärung wäre, dass sich bereits durch den Austausch einzelner Nukleotide die Sekundärstruktur so ändert, dass die Bindung von S10-WT an boxCB erleichtert wird und somit die TetFC bevorzugt stattfindet. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit für ein Screening, anhand dessen aus einer Vielzahl verschiedener Pumilio-Varianten die ideale Variante zur Bindung einer bestimmten Ziel-RNA identifiziert werden kann.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass es anhand der ATC-induzierten, späten Produktion der Ziel-RNA möglich ist, zwischen Zellen zu unterscheiden, die die Ziel-RNA produzieren, und Zellen, denen das entsprechende Plasmid fehlt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von 250 ng/mL ATC nach lediglich einer Screening-Runde bereits bis zu 92 % positiver Kolonien erhalten wurden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Systems und zeigt, dass ein FACS-basiertes Screening von Pumilio-Varianten mittels TetFC durchaus Potential besitzt.

3.2 Erweiterung von TetFC *in vitro* anhand von Split-YFP

Die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC) beruht auf der Komplementierung von drei nicht fluoreszierenden GFP-Fragmenten in Abhängigkeit von der Interaktion des sequenzspezifisch bindenden Proteins Pumilio mit einer Ziel-RNA. Zwei Fusionsproteine aus jeweils einer Variante der *Homo sapiens* Pumilio Homologie-Domäne und einem GFP β -Faltblatt (β -Faltblatt S10 fusioniert an Pumilio WT, und S11 fusioniert an Pumilio-Variante1) binden in räumlicher Nähe an dieselbe Ziel-RNA. In Anwesenheit des dritten GFP-Fragments (Detektor-Fragment GFP1-9) wird die Komplementierung von GFP und hiermit die Ausbildung eines Fluoreszenzsignals bewirkt (Abbildung 1.7C). Bislang war es mit diesem System jedoch ausschließlich möglich, zwischen der An- und Abwesenheit lediglich einer Ziel-RNA zu unterscheiden, da eine erfolgreiche Komplementierung jeweils in einem grünen Fluoreszenzsignal resultierte.^[302]

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das System ausgeweitet werden kann, sodass die Detektion verschiedener RNAs anhand unterschiedlicher Fluoreszenzsignale möglich ist. Die Ergebnisse dieses Projekts sind in den folgenden Kapiteln zusammengefasst und bereits veröffentlicht.^[320]

Neben verbesserten, grün fluoreszierenden Varianten des GFP sind zusätzlich zahlreiche Varianten mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften bekannt, die zusammen ein breites Spektrum vom blau fluoreszierenden Protein (BFP) bis zum gelb fluoreszierenden Protein (YFP) bilden (Kapitel 1.3). Die Mehrzahl dieser Varianten ist jedoch nicht für die TetFC geeignet, da die entsprechenden Aminosäuresubstitutionen unter anderem die das Chromophor bildende Aminosäuren betreffen (befinden sich im Falle von TetFC in GFP1-9) oder in verschiedenen β -Faltblätter liegen.^[263, 266] Idealerweise würden eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen lediglich eines der beiden an Pumilio fusionierten GFP β -Faltblätter S10 oder S11 betreffen und bereits eine Veränderung des Fluoreszenzverhaltens des komplementierten Proteins bewirken. Das Detektor-Molekül GFP1-9 müsste hingegen nicht verändert werden und könnte für die Komplementierung verschiedener Split-Varianten gleichzeitig eingesetzt werden.

Eine Substitution, die diese Anforderungen erfüllt, ist der Austausch von Threonin zu Tyrosin an Position 203 (T203Y), welche im β -Faltblatt S10 lokalisiert ist und eine in den gelben Wellenlängenbereich verschobene Fluoreszenz des Proteins bewirkt (Abbildung 3.18).

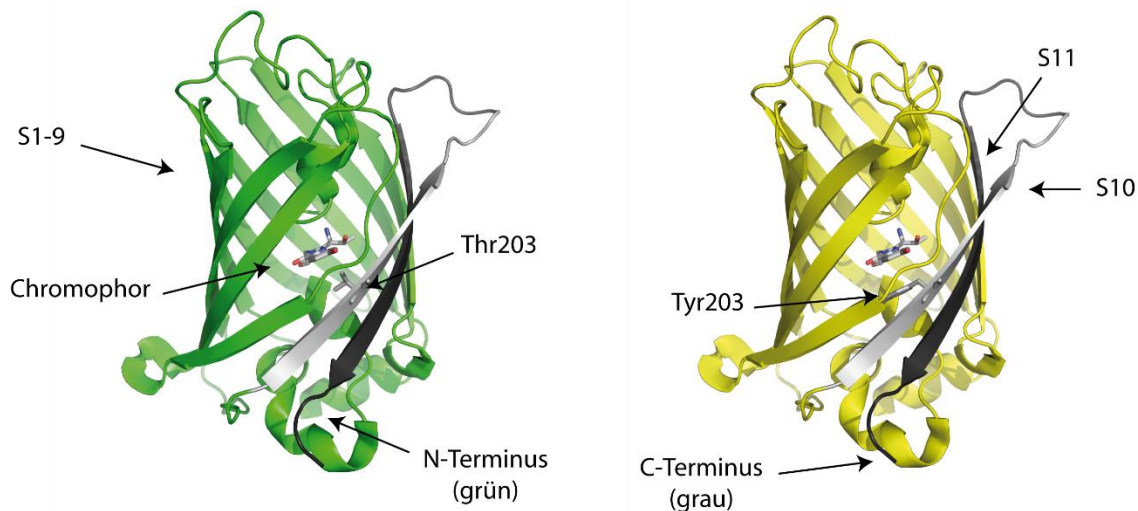


Abbildung 3.18: Position von Aminosäure 203 sowie β -Faltblättern S10 und S11 innerhalb des GFP. Aminosäure 203 (dargestellt als Stäbchenstruktur) befindet sich im β -Faltblatt S10 (hellgrau). Das Chromophor (ebenfalls dargestellt als Stäbchenstruktur) befindet sich innerhalb eines helikalen Bereichs im Inneren der β -Fasstruktur. β -Faltblatt S11 ist dunkelgrau, und die β -Faltblätter S1-S9 sind je nach resultierendem Fluoreszenzsignal in grün (in Anwesenheit von Thr203) oder gelb (in Anwesenheit von Tyr203) dargestellt. PDB-ID: 2Y0G.^[330]

In Kombination mit der programmierbaren Sequenzspezifität von Pumilio, stellt dies eine interessante Möglichkeit zur dualen Detektion zweier Ziel-RNAs mittels TetFC dar, da lediglich eines der drei GFP-Fragmente modifiziert werden müsste, um ein verändertes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Genauer gesagt: die Kombination verschiedener S10-Varianten (mit Thr203 oder Tyr203) mit unterschiedlichen Varianten der Pum-HD würde in Anwesenheit entsprechender Ziel-RNAs idealerweise zu einer sequenzspezifischen Komplementierung eines grün oder gelb fluoreszierenden Proteins führen.

3.2.1 Klonierung, Reinigung und Charakterisierung von wsGFP und wsYFP

Eine wichtige Voraussetzung für Multiplexverfahren im Allgemeinen ist die Unterscheidung der resultierenden Signale. Die Variante des GFP, die als Basis für das verwendete GFP1-9 diente (*superfolder* GFP), weist im Vergleich zum Wildtyp-GFP (wtGFP) bereits elf, und im Vergleich zur verbesserten Variante (*enhanced* GFP, eGFP) neun Substitutionen sowie eine zu höheren Wellenlängen verschobene Fluoreszenz auf ($\lambda_{em}(sfGFP) = 510 \text{ nm}$,^[303] $\lambda_{em}(wtGFP) = 508\text{-}509 \text{ nm}$,^[331] $\lambda_{em}(eGFP) = 507 \text{ nm}$ ^[280]). Zusätzlich hierzu wurden für das dreiteilige Split-GFP weitere Aminosäuresubstitutionen eingeführt.^[301] Daher galt es zunächst zu testen, ob die Einführung von T203Y in das TetFC-System zu einer gelb fluoreszierenden Variante führen würde, welche sich von dem rekonstituierten Split-GFP unterscheiden lässt. Hierfür wurden die drei GFP-Fragmente des

TetFC-Systems (GFP1-9, S10 und S11) fusioniert und diese als *whole-split* GFP (wsGFP) bezeichnete Variante mit *whole-split* YFP (wsYFP) verglichen, welche sich lediglich durch die zusätzliche Substitution T203Y unterschied.

Nach rekombinanter Produktion in *E. coli* BL21(DE3), wurden die Proteine wsGFP und wsYFP mittels Ionenaustauschchromatographie (*ion exchange chromatography*, IEC) und anschließender Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) gereinigt.

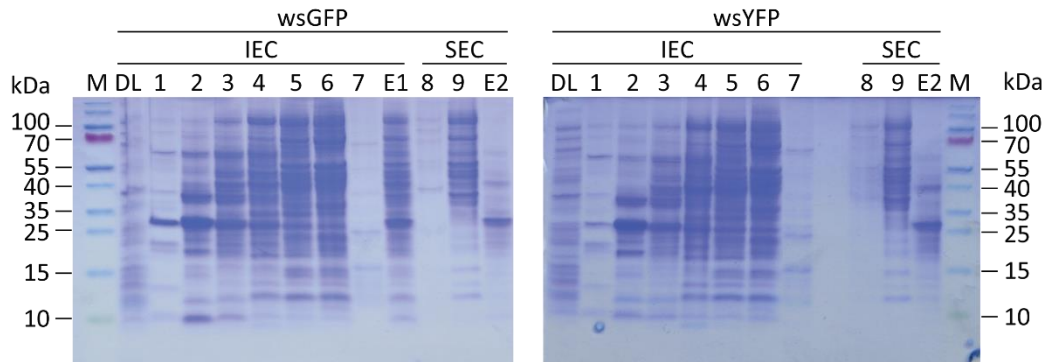


Abbildung 3.19: Reinigung von wsGFP und wsYFP. (links) 10 %iges SDS-PAA-Gel nach Coomassie-Färbung. (M) Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (DL) Durchlauf der Anionenaustausch-Säule HiTrap Q HP, (1) Fraktion des 1. Peaks der IEC, (2-6) Fraktionen des 2. Peaks der IEC, (7) Fraktion des 3. Peaks der IEC, (E1) konzentriertes Protein nach IEC, (8) Fraktion des 1. Peaks der SEC, (9) Fraktion des 2. Peaks der SEC, (E2) konzentriertes Protein nach SEC.

Die in Abbildung 3.19 gezeigte Überprüfung der Proteinreinigung verdeutlicht, dass beide Proteine, die ein Molekulargewicht von 26.3 kDa (wsGFP) und 26.4 kDa (wsYFP) aufweisen, auf diese Weise erfolgreich isoliert werden konnten. Die anschließende Konzentrationsbestimmung anhand einer Rinderserumalbumin (BSA)-Standardreihe und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ergab eine Ausbeute von ca. 8 mg wsGFP beziehungsweise 6 mg wsYFP pro Liter Kultur.

Zur fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung der Proteine wurden sowohl Exzitations- als auch Emissionsscans durchgeführt. Sowohl die Analyse von wsGFP oder wsYFP produzierender *E. coli* Zellen, als auch die Untersuchung von den gereinigten Proteinen ergab ein Anregungsmaximum für wsGFP von $\lambda_{ex}(GFP) = 486 \text{ nm}$, während das Emissionsmaximum bei $\lambda_{em}(GFP) = 511 \text{ nm}$ lag. Die Variante wsYFP mit der zusätzlichen Substitution T203Y wies hingegen veränderte Fluoreszenzeigenschaften mit in den gelben Bereich verschobene Anregungs- und Emissionsmaxima von $\lambda_{ex}(YFP) = 512 \text{ nm}$ und $\lambda_{em}(YFP) = 525 \text{ nm}$ auf. In Abbildung 3.20A sind

exemplarisch die Exzitationsscans von wsGFP und wsYFP bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ gezeigt.

Durch geeignete Wahl der Messparameter (wsGFP: $\lambda_{\text{ex}}(\text{wsGFP}) = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}(\text{wsGFP}) = 512 \text{ nm}$ und wsYFP: $\lambda_{\text{ex}}(\text{wsYFP}) = 512 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}(\text{wsYFP}) = 526 \text{ nm}$, Bandbreite: jeweils 5 nm) konnten wsGFP und wsYFP jeweils spezifisch detektiert werden (Abbildung 3.20B). Hierbei ist zu beachten, dass die Fluoreszenzintensität von wsGFP stärker als die von wsYFP ausfiel (max. FI(wsGFP) = $38016 \pm 8000 \text{ a.u.}$, max. FI(wsYFP) = $2537 \pm 550 \text{ a.u.}$). Aus diesem Grund wurde jeweils das Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale zueinander gebildet, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob ein grünes oder ein gelbes Fluoreszenzsignal vorlag (grün: $\lambda_{\text{em}} = 512/526 \text{ nm}$, gelb: $\lambda_{\text{em}} = 526/512 \text{ nm}$).

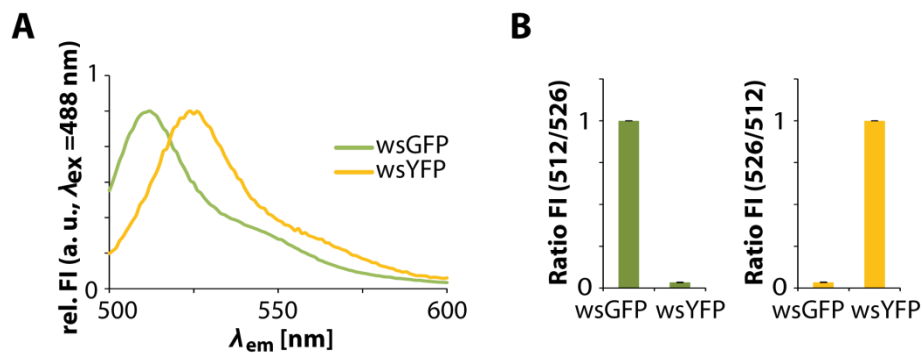


Abbildung 3.20: Fluoreszenzbasierte Unterscheidung von wsGFP und wsYFP. wsGFP enthält insgesamt 22 Aminosäuresubstitutionen der dreiteiligen Split-GFP-Variante. Variante wsYFP enthält die zusätzliche Substitution T203Y. (A) Emissionsscan von (—) wsGFP und (—) wsYFP, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$. Spezifische Emissionsmaxima wurden gleich 1 gesetzt. (B) Detektion von wsGFP und wsYFP durch Verwendung spezifischer Wellenlängen ($\lambda_{\text{ex}}(\text{wsGFP}) = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}(\text{wsGFP}) = 512 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}}(\text{wsYFP}) = 512 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}}(\text{wsYFP}) = 526 \text{ nm}$). Gezeigt ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■, $\lambda_{\text{em}} = 512/526 \text{ nm}$) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■, $\lambda_{\text{em}} = 526/512 \text{ nm}$), normiert auf das entsprechend fluoreszierende Protein. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an.

Die in Abbildung 3.20B dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass jeweils ein spezifisches Signal für wsGFP oder wsYFP erhalten wurde, während das entsprechende Signal der jeweils anderen Variante um den Faktor 29 (FI(526/512)) bis 30 (FI(512/526)) geringer ausfiel. Folglich führte die Einführung der Substitution T203Y in Kombination mit den insgesamt 22 *superfolder* und Split-GFP Substitutionen (Kapitel 1.3) bei der *whole-split* Variante zu einem gelb fluoreszierenden Protein. Diese Daten legen nahe, dass dies auch bei dem dreiteiligen Split-GFP zu einem gelb fluoreszierenden Protein führen sollte, das sich von der entsprechenden grün fluoreszierenden GFP-Variante unterscheiden lässt.

3.2.2 Generierung und Reinigung der Fusionsproteine S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2

Eine Grundvoraussetzung für die duale TetFC ist es, zwei unterschiedliche Fluoreszenzsignale, basierend auf einer GFP-Variante mit sämtlichen Split-GFP Aminosäuresubstitutionen, und der entsprechenden gelb fluoreszierenden Variante mit der zusätzlichen Substitution T203Y, generieren zu können. Dies wurde mit wsGFP und wsYFP erfüllt (Kapitel 3.2.1). Zur Konzeptbestätigung stellte sich als Nächstes somit die Frage nach einer geeigneten zweiten Ziel-RNA sowie der entsprechenden Pumilio-Variante. Hierbei bot sich die bereits charakterisierte Pumilio-Variante2 (Var2, S863N/N899S/Q903E/C935S/Q939E) an, welche zur Detektion der murinen *L1* mRNA generiert worden war.^[135] Sie bindet an die RNA-Sequenz 5'-UGUAUGGU-3' (boxL) und ist als Fusionskonstrukt mit GFP β -Faltblatt S10 (S10-Var2) erfolgreich zur Detektion von Ribonukleoproteinkomplexen mittels Fluoreszenzkomplementierung (RNP-FC) eingesetzt worden.^[135]

Die Klonierung der Pumilio-Fusionskonstrukte S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2, welche jeweils Aminosäuresubstitution T203Y im β -Faltblatt S10 trugen, erfolgte anhand von QuikChange®-PCR und der Ausgangskonstrukte S10-WT und S10-Var2. Fusionsprotein S10(Y)-WT wurde analog zu den Proteinen S10-WT und Var1-S11^[302] rekombinant in BL21-Gold(DE3) Zellen produziert. Da das Fusionsprotein S10(Y)-Var2 unter denselben Bedingungen unlöslich produziert wurde, wurde hier die Temperatur der Vorkulturen auf 30 °C herabgesetzt und bei der Induktion der Genexpression zusätzlich 1 % Ethanol zugegeben. In Abbildung 3.21 ist die Überprüfung der rekombinanten Produktion der Fusionsproteine S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2 sowie der anschließenden Reinigung mittels IMAC gezeigt.

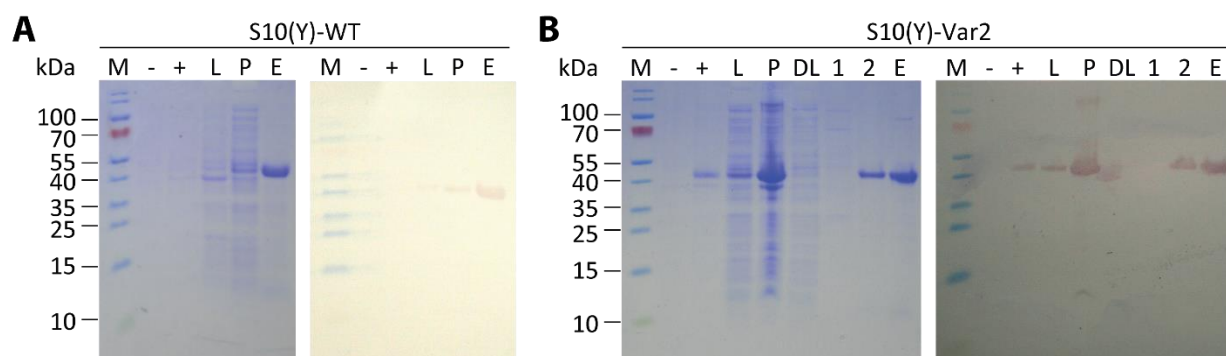


Abbildung 3.21: Produktion und Reinigung der Pumilio-Fusionsproteine S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2. (A) S10(Y)-WT und (B) S10(Y)-Var2. (links) 10 %iges SDS-PAA-Gel nach Coomassie-Färbung, (rechts) NC-Membran nach Inkubation mit Anti-His- und Anti-Maus-AP-Antikörper. (M) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Zellen (-) vor und (+) nach Induktion mit IPTG, (L) Überstand nach Zellyse, (P) Pellet nach Zellyse, (DL) Durchlauf der HisTrap™ Säule, (1) Peak 1, (2) Peak 2, (E) konzentriertes Eluat nach Zugabe von 150 mM Imidazol.

Nach der Induktion mit IPTG wurde jeweils eine dominierende Bande bei einem Molekulargewicht von circa 45 kDa erhalten (Abbildung 3.21A, Spur „+“), die den Proteinen S10(Y)-WT (44.7 kDa) und S10(Y)-Var2 (44.6 kDa) zugeordnet werden konnte. Die Proteine waren sowohl löslich im Lysat als auch unlöslich im Pellet vorhanden (Abbildung 3.21A, B, Spuren „L“ und „P“) und konnten mittels IMAC gereinigt werden. Bei dem verwendeten dreistufigen Elutionsprogramm wurden beide Fusionsproteine im zweiten Schritt sauber (ohne zusätzliche Proteine) eluiert (Abbildung 3.21A, B, Spur „E“ und „2“). Als weitere Überprüfung wurde ein Western Blot mit einem Anti-His-Antikörper durchgeführt. Die bei der Coomassie-Färbung erhaltenen und den Fusionsproteinen zugeordneten Banden sind hier entsprechend detektiert worden (Abbildung 3.21A, B, rechts), was für eine erfolgreiche Reinigung von S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2 spricht. S10(Y)-WT wurde mit einer Ausbeute von ca. 24 mg/L Kultur erhalten, während die rekombinante Produktion von S10(Y)-Var2 eine Ausbeute von ca. 2 mg/L Kultur lieferte. Eine unterschiedlich hohe Ausbeute für Fusionsproteine mit Wildtyp-Pumilio beziehungsweise einer Pumilio-Variante ist zuvor bereits für S10-WT und Var1-S11 beobachtet worden.^[332]

3.2.3 Detektion von RNA mittels Split-GFP und Split-YFP

Nach erfolgreicher Produktion und Reinigung der Pumilio-Varianten S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2 (Kapitel 3.2.2) sowie der Variante S10-Var2^[135] standen nun zusammen mit den „klassischen“ Fusionsproteinen der TetFC (S10-WT und Var1-S11^[302]) insgesamt fünf Pumilio-Varianten zur Verfügung (Abbildung 3.22A, B). Durch geeignete Kombination dieser Fusionsproteine sollte theoretisch die Detektion zweier Ziel-RNAs (boxAB und boxLB) jeweils mittels grüner oder gelber Fluoreszenz möglich sein. Das Konzept dieser zweifarbigen (dualen) Erweiterung der TetFC ist in Abbildung 3.22 dargestellt. Bei der „klassischen“ TetFC erfolgt die Detektion der Ziel-RNA boxAB anhand der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie dem Detektor-Fragment GFP1-9, und führt zu einem grünen Fluoreszenzsignal (Abbildung 3.22A). Die Fusionierung von WT mit S10(Y) würde dementsprechend die Komplementierung einer gelb fluoreszierenden Variante des Split-Proteins bewirken (Abbildung 3.22D). Mittels einer zusätzlichen Pumilio-Variante (Var2), welche an boxL innerhalb der Ziel-RNA boxLB bindet, soll zudem analog die Detektion dieser weiteren Ziel-RNA ermöglicht werden. Je nachdem, ob Var2 mit S10 oder S10(Y) fusioniert ist, soll die Detektion der Ziel-RNA boxLB ebenfalls anhand grüner oder gelber Fluoreszenz erfolgen (Abbildung 3.22B-D).

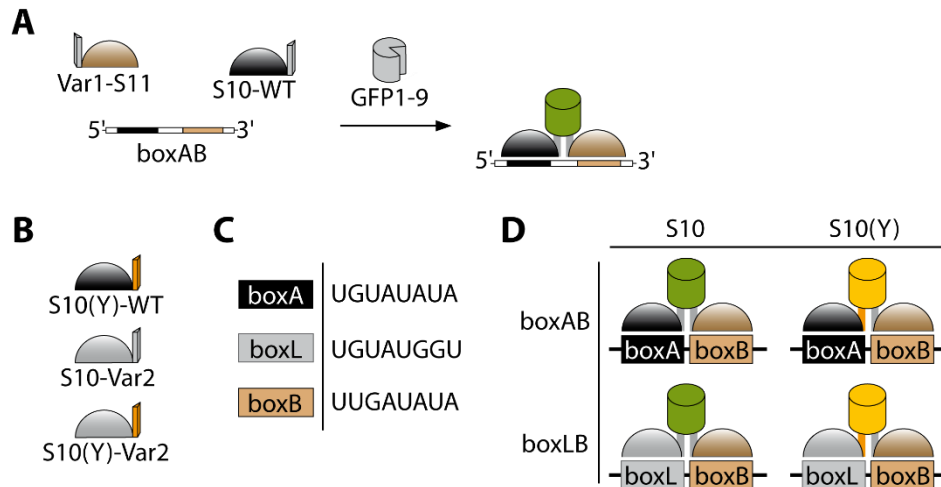


Abbildung 3.22: Konzept zur Erweiterung von TetFC mittels Split-YFP. Detektion zweier unterschiedlicher Ziel-RNAs mittels grüner oder gelber Fluoreszenz durch geeignete Wahl von Pumilio-Fusionsproteinen. **(A)** Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC). Pumilio-Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 binden an die benachbarten RNA-Motive boxA und boxB innerhalb der Ziel-RNA boxAB. Zugabe von Detektor-Fragment GFP1-9 resultiert in rekonstituiertem GFP. **(B)** Zusätzliche Pumilio-Fusionsproteine für die Erweiterung von TetFC mittels Split-YFP. Variante S10-Var2 bindet an boxL. S10-WT und S10-Var2 wurden zusätzlich mit der Substitution T203Y im GFP β -Faltblatt S10 (S10(Y)) versehen (S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2). **(C)** Sequenzen der verwendeten RNA-Motive. WT-Fusionsproteine binden an boxA, Var2-Konstrukte binden an boxL und boxB wird von Var1 (unverändert mit β -Faltblatt S11 fusioniert) erkannt. **(D)** Kombination der Fusionsproteine zur Detektion von RNA mittels grüner oder gelber Fluoreszenz. Angegeben sind die entsprechenden S10-Faltungsblätter der einzelnen S10-Fusionsproteine. Zugabe von S10-WT zu boxAB und S10-Var2 zu boxLB resultiert (in Anwesenheit von Var1-S11 und GFP1-9) in der Rekonstitution von GFP, während anhand von S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2 die Komplementierung einer gelb fluoreszierenden Variante erreicht wird.

Entsprechend der in Abbildung 3.22D dargestellten Übersicht wurden die verschiedenen Pumilio-Fusionsproteine zur Detektion der RNAs boxAB und boxLB eingesetzt. Hierzu wurden 250 nM der Ziel-RNAs mit äquimolarer Konzentration des S10- und S11-Fusionsproteins 30 Minuten inkubiert und schließlich Detektor-Fragment GFP1-9 hinzugegeben. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurde die Fluoreszenz direkt nach Zugabe von GFP1-9 (Zeitpunkt $t = 0$ h) gemessen. Die Endpunktmessung erfolgte nach 12-17-stündiger Inkubation bei 8 °C. Eine Inkubation bei 22 °C wurde ebenfalls getestet, führte jedoch zu keinem Anstieg des gelben Fluoreszenzsignals. Grund hierfür ist möglicherweise die geringere Stabilität des Split-YFPs bei steigenden Temperaturen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Fluoreszenz von wsGFP deutlich stärker ausfällt, als die von wsYFP (Abbildung 3.20), wurde zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe das Verhältnis von grüner und gelber (FI(512/526)) sowie gelber und grüner Fluoreszenzintensität (FI(512/512)) berechnet. Wie zuvor bei der „klassischen“ TetFC,^[302] lieferte die Zugabe von S10-WT (sowie Var1-S11 und GFP1-9) zu RNA boxAB ein grünes Fluoreszenzsignal (Abbildung 3.23). Wurde anstelle von S10-WT die Variante S10(Y)-WT mit der Aminosäuresubstitution T203Y verwendet, wurde erwartungsgemäß ein gelbes Fluoreszenzsignal erhalten. Gleichermäßen wurde nach Zugabe von S10-Var2 zu boxLB

ein grünes, und nach Zugabe von S10(Y)-Var2 ein gelbes Fluoreszenzsignal detektiert. Das Experiment wurde sowohl in Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 μ M PMSF), als auch in eukaryotischem (HeLa) Zelllysatsat erfolgreich durchgeführt (Abbildung 3.23). Sowohl mit S10-WT, als auch mit S10-Var2 wurde jeweils ein grünes Fluoreszenzsignal erhalten, das deutlich höher als das der Proben mit der entsprechenden T203Y Substitution war (Faktor in Puffer: 57 ± 7 und 51 ± 4 , Lysat: 62 ± 1 und 84 ± 8). Analog fiel die gelbe Fluoreszenz der Ansätze mit S10(Y)-WT und S10(Y)-Var2 höher (Faktor in Puffer: 67 ± 27 und 113 ± 109 , Lysat: 62 ± 1 und 84 ± 7) als die der Ansätze mit Fusionsproteinen ohne T203Y aus. Diese Daten verdeutlichen, dass die Komplementierung auch in einer komplexen Umgebung und in Anwesenheit kompetitierender Proteine spezifisch erfolgt.

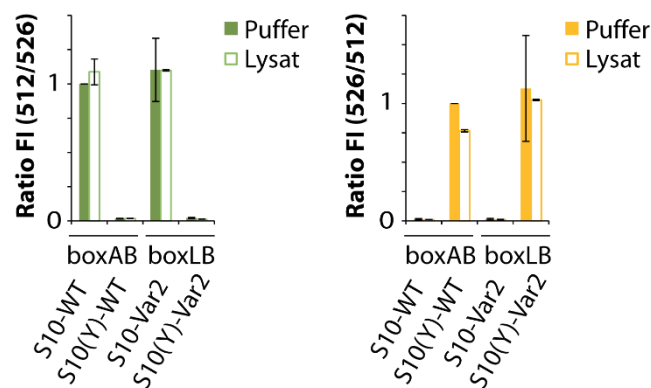


Abbildung 3.23: Detektion der RNAs boxAB und boxLB mittels Split-GFP und Split-YFP in Puffer und in eukaryotischem Zelllysatsat. Vier verschiedene Pumilio/S10-Fusionsproteine wurden (in Kombination mit Var1-S11 und GFP1-9) zur Detektion der RNAs boxAB und boxLB (■/■) in Puffer oder (□/□) in HeLa Zelllysatsat verwendet. Gezeigt ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■/□, $\lambda_{em} = 512/526$ nm) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■/□, $\lambda_{em} = 526/512$ nm), normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und boxAB. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei oder zwei (Lysat) unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung an.

3.2.4 Sensitivität der dualen Fluoreszenzkomplementierung

Nachdem die Detektion der RNAs boxAB und boxLB jeweils mittels Split-GFP und Split-YFP erfolgreich in Puffer und in eukaryotischem Zelllysatsat vorgenommen werden konnte (Kapitel 3.2.3), wurde untersucht, wie sensitiv das duale System ist. Hierzu wurde zunächst die RNA verdünnt und in einer Konzentration von 16-250 nM eingesetzt, während die Konzentration der Pumilio-Fusionsproteine weiterhin 250 nM betrug und GFP1-9 im Überschuss eingesetzt wurde. Die in Abbildung 3.24 dargestellten Ergebnissen zeigten, dass die gemessene Fluoreszenzintensität mit sinkender RNA-Konzentration erwartungsgemäß abnahm, wobei hier kein linearer Zusammenhang bestand. Dies lässt sich damit begründen, dass bei sinkender RNA-Konzentration und gleichbleibender Protein-Menge ein zunehmender Überschuss an Proteinkomponenten vorliegt,

der die Komplementierung begünstigt. Die spezifische Detektion von boxAB und boxLB, jeweils mittels grüner und gelber Fluoreszenz, durch Verwendung der entsprechenden Pumilio-Fusionsproteine war hierbei bis zu einer minimalen Konzentration von 16 nM möglich (Abbildung 3.24A). Die Bestimmung des Verhältnisses aus gelber/grüner (FI(512/526)) und grüner/gelber (FI(526/512)) Fluoreszenz bestätigten diese Ergebnisse: Hier wurden über einen Konzentrationsbereich von 16-250 nM RNA weitestgehend gleichbleibende Werte für die Verhältnisse der Fluoreszenzsignale erhalten (Abbildung 3.24B).

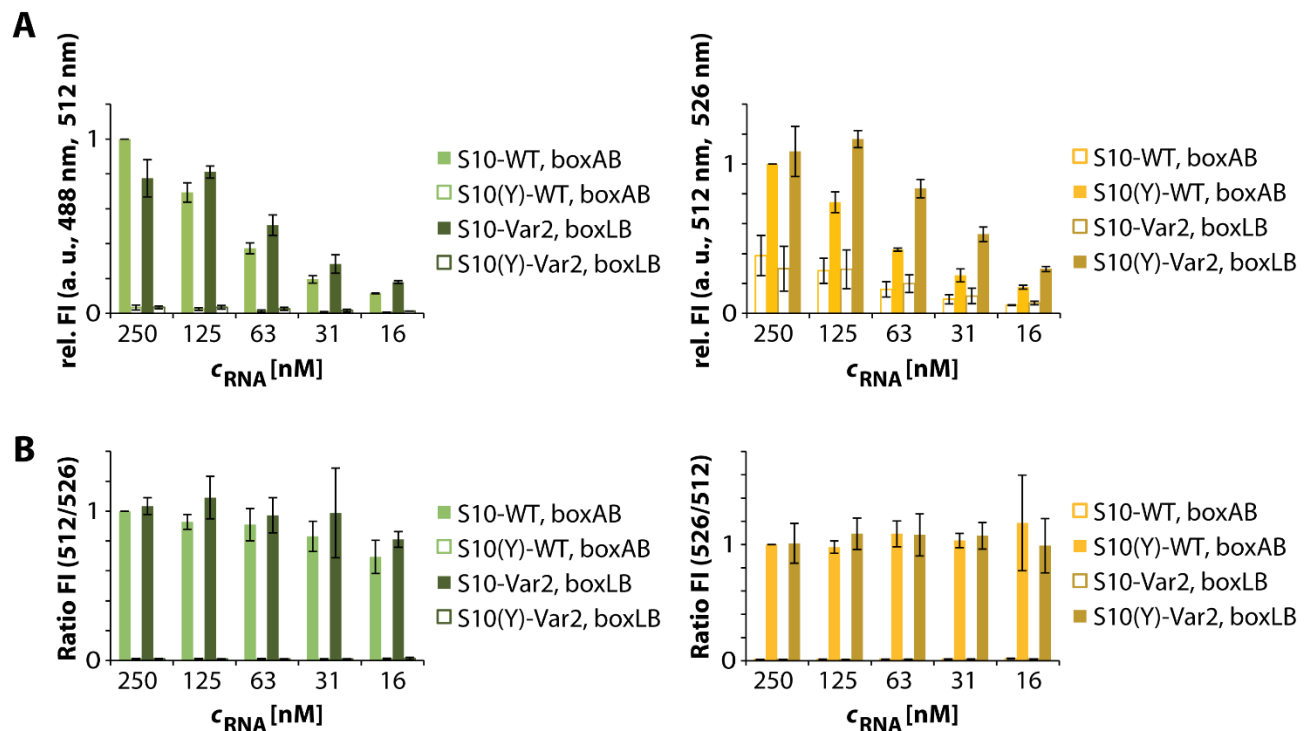


Abbildung 3.24: Sensitivität der dualen TetFC bei sinkender RNA-Konzentration. Fluoreszenz nach Inkubation von 16-250 nM RNA boxAB oder boxLB mit 250 nM S10-WT/S10(Y)-WT oder S10-Var2/S10(Y)-Var2 sowie Var1-S11 und GFP1-9. **(A)** Relative grüne (■/□, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$) und gelbe (■/□, $\lambda_{\text{ex}} = 512 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$) Fluoreszenzintensität, normiert auf entsprechenden Ansatz mit Pum-WT und 250 nM boxAB. **(B)** Gezeigt ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■/□, $\lambda_{\text{em}} = 512/526 \text{ nm}$) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■/□, $\lambda_{\text{em}} = 526/512 \text{ nm}$), normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und 250 nM boxAB. Fehlerbalken in (A) und (B) geben die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung an.

In einem weiteren Experiment wurden sowohl die RNA als auch die Pumilio-Fusionsproteine (S10-WT, S10(Y)-WT, S10-Var2, S10(Y)-Var2 und Var1-S11) gleichermaßen verdünnt und jeweils in äquimolaren Verhältnis eingesetzt, während die Konzentration des GFP1-9 konstant und im Überschuss gehalten wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Die Auftragung der Konzentration von RNA/Fusionsproteinen gegen die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten zeigte

hierbei deutlich einen linearen Zusammenhang. Dieser wurde durch Erstellen einer Ausgleichgeraden bestätigt. Das Bestimmtheitsmaß lag hierbei zwischen 0.9982 für den Ansatz mit S10-Var2 und boxLB, und 0.9997 nach Inkubation von S10(Y)-Var2 mit boxLB (Abbildung 3.25A). Anhand der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten konnte festgestellt werden, dass bei Verdünnung von RNA und Fusionsproteinen eine minimale RNA-Konzentration von 31 nM für das duale System notwendig ist. Bei geringeren Konzentrationen schwanken die Werte zunehmend, was die Aussagen darüber, ob eine Probe grüne oder gelbe Fluoreszenz aufweist, erschwert (Abbildung 3.25B).

Im Vergleich hierzu wurde für das klassische TetFC-System eine minimale RNA-Konzentration von 16 nM ermittelt.^[302] Da für das duale System jedoch mehr Komponenten benötigt werden und zudem die Fluoreszenz des Split-YFP geringer ausfällt, entspricht es den Erwartungen, dass die Sensitivität des dualen Systems leicht verringert ist.

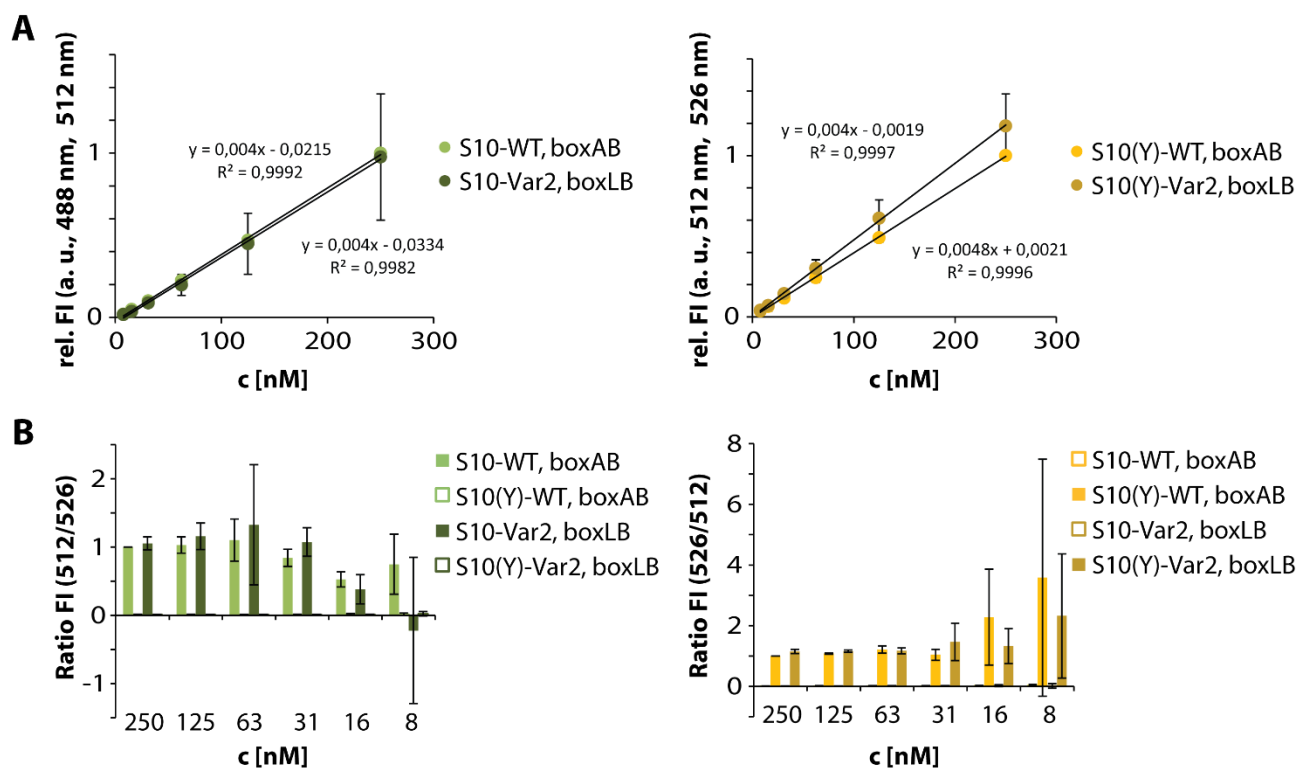


Abbildung 3.25: Sensitivität der dualen TetFC bei sinkender Konzentration von RNA und Pumilio-Fusionsproteinen. Fluoreszenz nach Inkubation von 8-250 nM RNA boxAB oder boxLB mit äquimolarer Konzentration S10-WT/S10(Y)-WT oder S10-Var2/S10(Y)-Var2 sowie Var1-S11 und GFP1-9. **(A)** Relative grüne (■/□, $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 512$ nm) und gelbe (■/□, $\lambda_{ex} = 512$ nm, $\lambda_{em} = 526$ nm) Fluoreszenzintensität, normiert auf entsprechenden Ansatz mit Pum-WT und 250 nM boxAB. Zur Demonstration der Signallinearität sind Ausgleichgeraden mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben. **(B)** Gezeigt ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■/□, $\lambda_{em} = 512/526$ nm) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■/□, $\lambda_{em} = 526/512$ nm), normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und 250 nM boxAB. Fehlerbalken in (A) und (B) geben die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung an.

3.2.5 Spezifität der dualen Fluoreszenzkomplementierung

Zur Untersuchung der Spezifität der dualen Fluoreszenzkomplementierung wurden verschiedene Bedingungen getestet: das Verhalten des Systems bei Verwendung der entsprechenden nicht-Ziel-RNAs, das Verhalten bei Verwendung der korrekten Ziel-RNAs und zusätzlicher Anwesenheit der nicht-Ziel-RNAs, und die Auswirkungen bei Verwendung von mehr als einer Variante des S10-Fusionsproteins auf die resultierenden Fluoreszenzsignale.

Bei Verwendung der nicht-Ziel-RNA anstelle der korrekten RNA-Sequenzen, wurde in allen Fällen, sowohl im Falle der grünen als auch der gelben Fluoreszenz, eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität gemessen. Die Werte bei Verwendung der Pumilio-Fusionsproteinen S10-WT, S10-Var2 und S10(Y)-Var2 waren bei Anwesenheit der korrekten Ziel-RNA 10-17-fach höher als bei der entsprechenden nicht-Ziel-RNA, während mit S10(Y)-WT lediglich eine vierfach höhere Fluoreszenzintensität detektiert wurde (Abbildung 3.26). Dies spricht für eine spezifische Komplementierung von GFP und YFP in Abhängigkeit von RNA mit korrekter Sequenz.

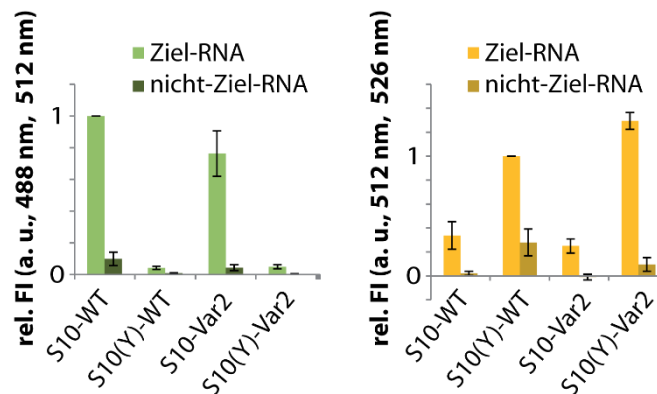


Abbildung 3.26: Spezifität der dualen TetFC. Fluoreszenz nach Inkubation der Pumilio-Fusionsproteine S10-WT/S10(Y)-WT/S10-Var2/S10(Y)-Var2 (■/■) mit Ziel-RNA (boxAB für Pum-WT und boxLB für Pum-Var2) oder (■/■) mit entsprechender nicht-Ziel-RNA. Gezeigt ist die relative grüne (■/■, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$) und gelbe (■/■, $\lambda_{\text{ex}} = 512 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$) Fluoreszenzintensität, normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und Ziel-RNA (in diesem Fall: boxAB). Balken geben die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung an.

Es wurde außerdem getestet, wie sich die zusätzliche Anwesenheit der entsprechenden nicht-Ziel-RNA auf die spezifische Detektion von boxAB und boxLB auswirkt. Hierfür wurden die RNAs in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt und mit einer zur Ziel-RNA äquimolaren Konzentration der S10-Fusionsproteinen sowie Var1-S11 inkubiert, bevor GFP1-9 hinzugegeben wurde (Abbildung 3.27A). Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Messung sind in Abbildung 3.27B zusammengefasst. Aus den Daten geht hervor, dass ein grünes Fluoreszenzsignal bei den Ansätzen erhalten wurde, in denen S10-WT

oder S10-Var2 anwesend waren, während jeweils ein gelbes Fluoreszenzsignal bei denjenigen Proben detektiert wurde, in denen sich S10(Y)-WT oder S10(Y)-Var2 befanden. Dies entspricht den erwarteten Signalen und deutet darauf hin, dass die Anwesenheit einer RNA mit ähnlicher Sequenz keine Auswirkung auf die spezifische Detektion der Ziel-RNA hat. Um dies weiter zu untersuchen, wurden die entsprechenden nicht-Ziel-RNAs in steigender Konzentration eingesetzt (Verhältnis Ziel-RNA zu nicht-Ziel-RNA: 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10). In Abbildung 3.27C ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal im Allgemeinen trotz 10-fachem Überschuss an nicht-Ziel-RNA stabil bleibt und weiterhin die erwarteten Fluoreszenzsignale detektiert wurden.

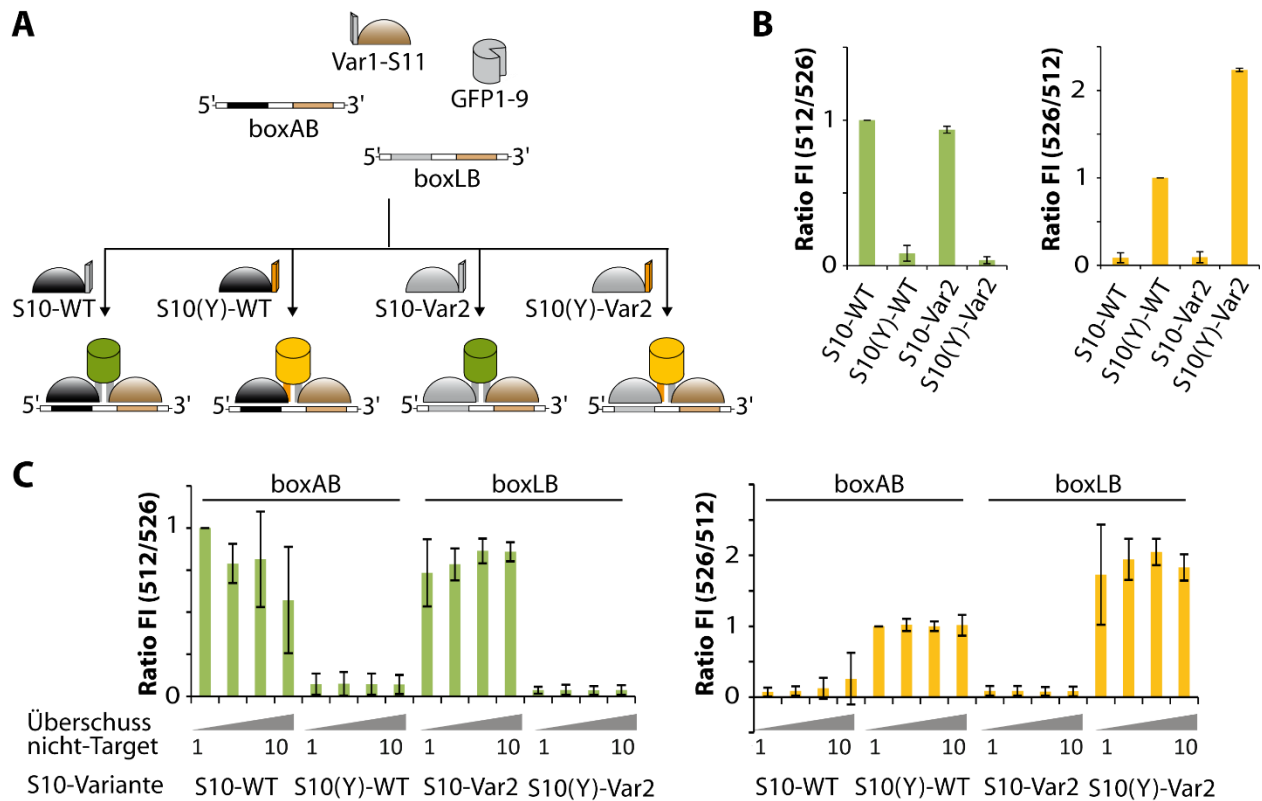


Abbildung 3.27: Spezifische Detektion der Ziel-RNAs boxAB und boxLB in Anwesenheit von nicht-Ziel-RNA. (A) Schematische Darstellung zur RNA-vermittelten Rekonstitution von GFP und YFP in Anwesenheit von nicht Ziel-RNA durch Verwendung verschiedener Pumilio-Fusionsproteine. (B) Fluoreszenz nach Inkubation der Pumilio-Fusionsproteine S10-WT/S10(Y)-WT/S10-Var2/S10(Y)-Var2 (sowie Var1-S11 und GFP1-9) mit einem äquimolaren Gemisch aus boxAB und boxLB. (C) Spezifische Detektion einer Ziel-RNA in Anwesenheit eines Überschuss von nicht-Ziel-RNA. Ziel-RNA (angegeben oberhalb der Balken) wurde mit 1:1, 2:1, 5:1 oder 10:1-fachem Überschuss der nicht-Ziel-RNA sowie den entsprechenden S10-Pumilio-FVarianten (sowie Var1-S11 und GFP1-9) inkubiert. In (B) und (C) ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 512/526$ nm) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 526/512$ nm) gezeigt, normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und 250 nM boxAB/boxLB. Fehlerbalken in (B) und (C) geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung an.

Eine weitere interessante Fragestellung war, wie sich die Anwesenheit einer nicht bindenden S10-Pumilio-Variante auf die Detektion einer Ziel-RNA auswirkt. Hierfür wurde neben demjenigen S10-Fusionsprotein, das die Ziel-RNA bindet, zusätzlich eine Variante eingesetzt, welche nicht an diese, sondern an die entsprechend andere Ziel-RNA bindet und bei unspezifischer Komplementierung ein abweichendes Fluoreszenzsignal bewirken sollte (schematisch dargestellt in Abbildung 3.28A). Die Zugabe von S10-WT und S10(Y)-Var2 zu boxAB sollte hierbei aufgrund der Bindung von Pum-WT und boxA in der Ausbildung eines grünen Fluoreszenzsignals resultieren, während dieselben Fusionsproteine in Anwesenheit von boxLB zu gelber Fluoreszenz führen sollten. Analog sollte die Detektion von boxAB in Anwesenheit von S10(Y)-WT und S10-Var2 mittels gelber Fluoreszenz erfolgen, während die Zugabe derselben Fusionsproteine zu boxLB in einem grünen Fluoreszenzsignal resultieren sollte.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung sind in Abbildung 3.28B gezeigt. Die Zugabe von S10-WT und S10(Y)-Var2 zu boxAB (in Kombination mit Var1-S11 und GFP1-9) führte entsprechend den Erwartungen zu einem grünen Fluoreszenzsignal. Hierbei wurde ein 16-fach höheres Signal im Vergleich zur grünen Fluoreszenz des Ansatzes mit S10(Y)-WT und S10-Var2 erhalten. Für diesen Ansatz wurde aufgrund der S10-Pumilio-Variante S10(Y)-WT erwartungsgemäß ein gelbes Fluoreszenzsignal detektiert. Ebenfalls erfolgreich war im umgekehrten Fall die Zugabe von S10(Y)-WT und S10-Var2 zu boxAB, welche in gelber Fluoreszenz resultierte (18-fach erhöht gegenüber der gelben Fluoreszenz des Ansatzes mit S10-WT und S10(Y)-Var2).

Im Vergleich hierzu betrugen die entsprechenden Werte bei Verwendung von S10-WT (in Abwesenheit von S10(Y)-Var2) 57 ± 7 für die grüne Fluoreszenz, und bei Verwendung von S10(Y)-WT (in Abwesenheit von S10-Var2) 67 ± 27 für das gelbe Fluoreszenzsignal (Vergleich Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.23). Bei Verwendung der Ziel-RNA boxAB wurde die Spezifität der Komplementierung in Anwesenheit einer nicht-bindenden S10-Pumilio-Variante somit deutlich verringert. Dennoch war eine Spezifität weiterhin gegeben und ausreichend für die Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen.

Weniger eindeutig war es hingegen bei der Detektion von boxLB mit den beschriebenen Proteinkombinationen. Das gelbe Fluoreszenzsignal war nach Zugabe von S10-WT und S10(Y)-Var2 lediglich um den Faktor 1.6 gegenüber der Zugabe von S10(Y)-WT und S10-Var2 erhöht. Nach Zugabe von S10(Y)-WT und S10-Var2 wurde gleichermaßen lediglich ein 1.9-fach höheres grünes Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Ansatz mit S10-WT und S10(Y)-Var2 ermittelt. Im Vergleich

hierzu betrugen die Werte bei Verwendung von S10(Y)-Var2 (in Abwesenheit von S10-WT) 113 ± 109 (gelbe Fluoreszenz) und bei Verwendung von S10-Var2 (in Abwesenheit von S10(Y)-WT) 51 ± 4 (grüne Fluoreszenz) (Vergleich Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.23).

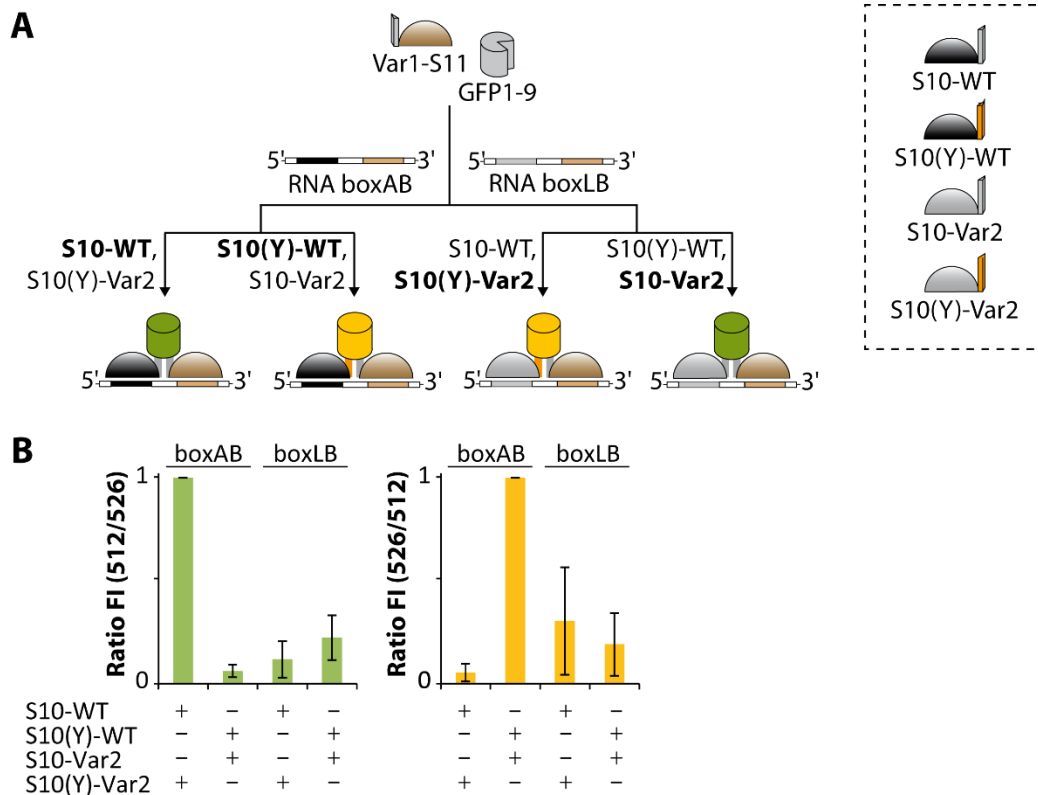


Abbildung 3.28: Detektion von boxAB und boxLB in Anwesenheit eines weiteren S10-Fusionsproteins. (A) Schematische Übersicht des Experiments. Die bindenden S10-Pumilio-Varianten sind jeweils fett geschrieben. **(B)** Fluoreszenz nach Inkubation der RNAs boxAB und boxLB mit äquimolaren Mengen an S10-WT und S10(Y)-Var2 oder S10(Y)-WT und S10-Var2. Gezeigt ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 512/526$ nm) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 526/512$ nm), normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und boxAB. Fehlerbalken in (B) geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung an.

Dies deutet darauf hin, dass die Wahl der unterschiedlichen Ziel-Sequenzen und der entsprechenden Pumilio-Fusionsproteine eine wichtige Rolle darstellt, und dass im Idealfall Pumilio-Varianten verwendet werden sollten, die ähnliche Affinitäten für ihre Ziel-RNAs, jedoch keinerlei Affinität für die entsprechende nicht-Ziel-RNA aufweisen. Eine Bindung von S10-WT an boxL und somit eine unspezifische TetFC ist unwahrscheinlich, da diese in früheren Studien nicht beobachtet wurde,^[311] kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Umgekehrt bindet Var2 ebenfalls nicht an boxA.^[135] Die Affinität von WT für boxA ist jedoch mit $0.48-2$ nM^[129, 311] bis zu 30-fach höher

als die Affinität von Var2 für boxL ($K_D = 15 \pm 6 \text{ nM}^{[135]}$), was die besseren Werte bei Verwendung der boxAB RNA im Vergleich zu boxLB erklären würde.

3.2.6 Versuch der parallelen Komplementierung von Split-GFP und Split-YFP

Eine zusätzliche Voraussetzung für die simultane Detektion zweier RNAs mittels TetFC ist, dass die Komplementierung des jeweiligen Split-Proteins auch in Anwesenheit anderer RNA-Sequenzen und S10-Fusionsproteine spezifisch erfolgt. Um die rekonstituierten Split-Varianten unabhängig voneinander hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysieren zu können, war jedoch eine räumliche Trennung der komplementierten Proteine notwendig. Um dies zu erreichen, wurde biotinylierte RNA eingesetzt. Das Ziel war, eine simultane Komplementierung von Split-GFP und Split-YFP zu erhalten und die entsprechenden rekonstituierten RNA/Protein-Komplexe anschließend anhand der Biotin-Streptavidin-Interaktion voneinander zu trennen und mittels Fluoreszenzmessung zu analysieren.

Zunächst wurde getestet, ob boxAB und boxLB trotz Biotinylierung die Rekonstitution von GFP und YFP bewirken können. Analog zu den in Abbildung 3.23 gezeigten Ergebnissen, wurden die als B-boxAB und B-boxLB bezeichneten RNAs für die duale TetFC eingesetzt. Wie in Abbildung 3.29A zu erkennen ist, konnten auch diese RNAs jeweils mittels grüner und gelber Fluoreszenz nachgewiesen werden, wobei die Komplementierung (im Vergleich zu analogen Ansätzen mit unmodifizierter RNA) mit S10-Var2 und boxLB deutlich schwächer ausfiel als mit S10-WT und boxAB (Vergleich Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.23).

Für die parallele Komplementierung wurden sowohl boxAB als auch boxLB in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt, wobei jeweils eine RNA biotinyliert und eine RNA unmodifiziert vorlag (Abbildung 3.29B). Mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten Beads (Dynabeads®) sollte die Trennung der komplementierten Proteine und somit der entsprechenden Fluoreszenzsignale erreicht werden. Nach 15-stündiger Inkubation der Ansätze wurde die Fluoreszenz gemessen und die Proben zwecks Vernetzung von RNA und Proteinen mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Proben jeweils zweimal mit Streptavidin-Beads inkubiert und die Fluoreszenz des Überstandes erneut gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29C dargestellt.

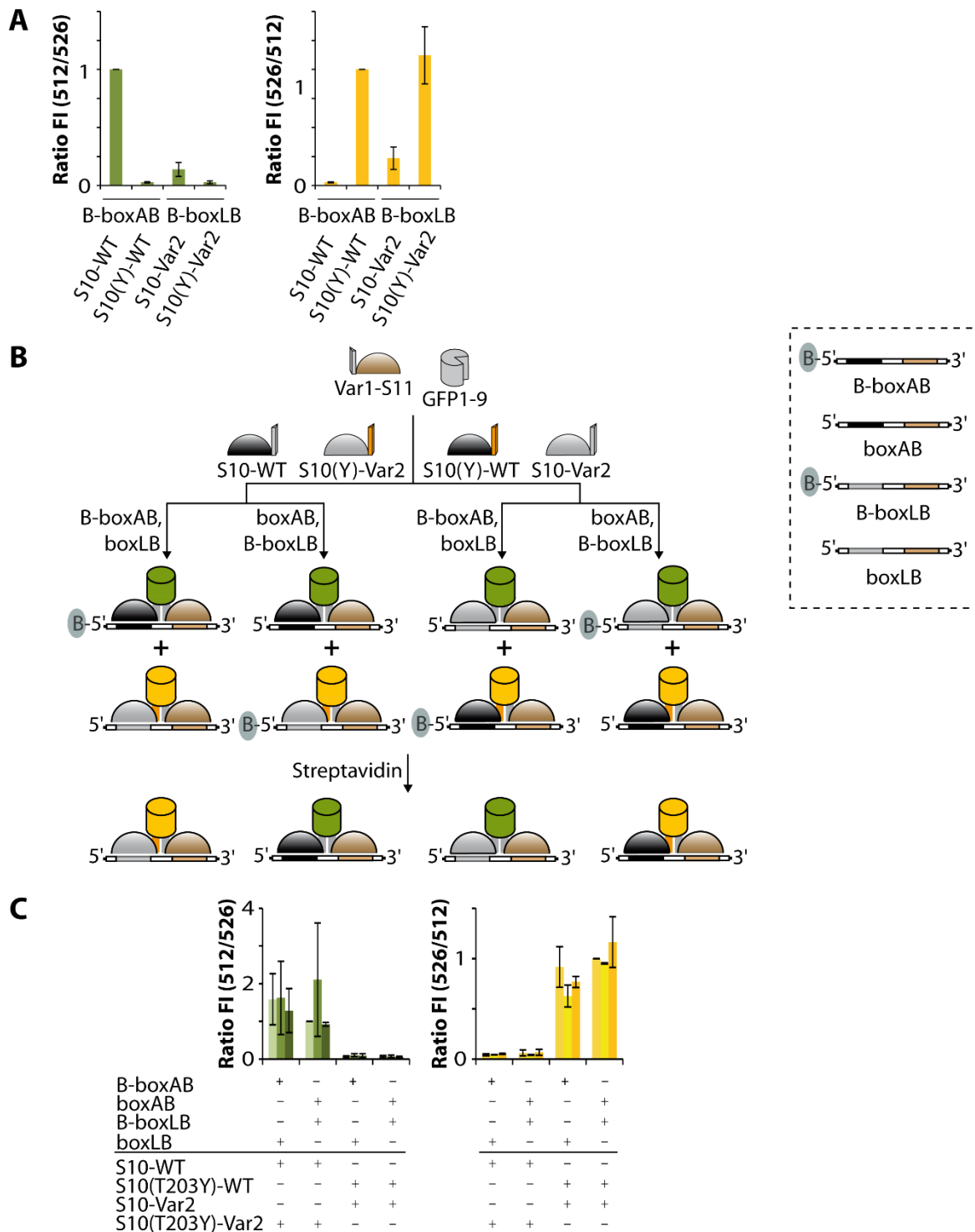


Abbildung 3.29: Versuch der Trennung von rekonstituiertem Split-GFP und Split-YFP anhand von biotinylierter RNA. (A) Verwendung von biotinylierter RNA (B-boxAB, B-boxLB) zur dualen TetFC. Gezeigt ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 512/526$ nm) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 526/512$ nm), normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und B-boxAB. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung an. **(B)** Schematische Darstellung zur Trennung von rekonstituiertem GFP und YFP. Anhand der Kombination aus unmodifizierter und biotinylierter RNA soll eine Isolierung der resultierenden RNA/Protein-Komplexe mittels Biotin-Streptavidin-Interaktion ermöglicht werden. **(C)** Fluoreszenz der in (A) veranschaulichten RNA/Proteinkombinationen vor

und nach zweimaligem Abtrennen biotinylierter RNA mittels Streptavidin-Beads. Gezeigt ist das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 512/526$ nm) und das Verhältnis von gelber zu grüner Fluoreszenz (■, $\lambda_{em} = 526/512$ nm), normiert auf die entsprechenden Ansätze mit Pum-WT und boxAB vor Streptavidin-Zugabe. Balken geben die Mittelwerte von zwei Experimenten an.

Auffällig war zunächst, dass vor Streptavidin-Zugabe jeweils stärkere Fluoreszenzsignale bei der Kombination aus Pum-WT und boxAB als bei Pum-Var2 und boxLB erhalten wurden und dies unabhängig von einer Biotinylierung der Ziel-RNA war. Im Idealfall sollte das Verhältnis von grüner zu gelber Fluoreszenz in jedem Fall vor Streptavidin-Zugabe 1 betragen, da sowohl 250 nM rekonstituiertes GFP als auch YFP entstehen könnten. Die Tatsache, dass dieser Fall nicht eingetreten ist, lässt sich, wie bereits in Kapitel 3.2.5 erwähnt, auf die unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen Pumilio-Varianten für ihre Ziel-RNAs zurückführen.

Erwartet wurde, dass das gelbe Fluoreszenzsignal von dem Ansatz mit boxAB, B-boxLB, S10-WT und S10(Y)-Var2 nach Inkubation mit den Streptavidin-Beads aufgrund der Interaktion des Komplexes aus B-boxLB und S10(Y)-Var2 (sowie Var1-S11 und GFP1-9) mit den Beads sinkt. Entsprechend würde aufgrund der Entfernung des rekonstituierten Split-YFPs aus dem Gemisch aus Split-GFP und Split-YFP der Anteil an rekonstituiertem Split-GFP dominieren, was sich durch eine Zunahme des entsprechenden Fluoreszenzsignals ($\lambda_{em} = 512/526$ nm) äußern würde. Umgekehrt sollte das grüne Fluoreszenzsignal mit den gleichen RNAs, aber Verwendung von S10(Y)-WT und S10-Var2, sinken und das gelbe Fluoreszenzsignal steigen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Stattdessen blieben die Fluoreszenzsignale auch nach Zugabe der Streptavidin-Beads weitestgehend unverändert. Ähnlich verhielt es sich bei der umgekehrten Kombination aus B-boxAB und boxLB. Hier sank zwar nach Streptavidin-Zugabe die grüne Fluoreszenz der Probe mit S10-WT und S10(Y)-Var2 leicht, es ist jedoch kein Anstieg der gelben Fluoreszenz zu beobachten. Analog konnte nach Inkubation von S10(Y)-WT und S10-Var2 mit denselben RNAs nur eine sehr geringe Abnahme der gelben Fluoreszenz, und keine Zunahme des grünen Fluoreszenzsignals detektiert werden. Die parallele Komplementierung und anschließende Trennung von GFP und YFP anhand der Biotin-Streptavidin-Interaktion war somit im Rahmen dieses Experiments nicht erfolgreich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung anhand einer einzigen Aminosäuresubstitution auf eine zweifarbige Nachweismethode für RNA ausgeweitet werden kann. Es war möglich, durch geschickte Wahl verschiedener GFP/Pumilio-Fusionsproteine zwei verschiedene Ziel-RNAs jeweils mittels grüner und gelber Fluoreszenz

nachzuweisen. Dieses duale System funktionierte bei äquimolarer Konzentration der Pumilio-Fusionsproteine und einer minimalen Ziel-RNA-Konzentration von 32 nM. Bei einem Überschuss von Pumilio-Fusionsproteinen reichte eine Konzentration von lediglich 16 nM Ziel-RNA aus. Weiterhin war die spezifische Detektion der Ziel-RNA in eukaryotischen Zelllysaten und bei einem bis zu zehnfachen Überschuss von nicht-Ziel-RNA möglich. Die spezifische Komplementierung war je nach Wahl der Kombination aus Ziel-RNA und entsprechender Pumilio-Variante teilweise auch in Anwesenheit von weiteren S10-Pumilio-Varianten möglich, verdeutlichte jedoch die Wichtigkeit der Wahl geeigneter Pumilio-Paare bei der dualen TetFC.

3.3 Sequenzspezifische RNA-Modifizierung

Die Pumilio Homologie-Domäne ist bereits für eine Vielzahl von Designerproteinen eingesetzt worden, die eine sequenzspezifische Steuerung der Translation, von Spleißvorgängen, oder auch der Restriktion von RNA ermöglichen (Kapitel 1.2.6). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Pum-HD auch als Binde-Domäne in Kombination mit einem Enzym eingesetzt werden kann, um eine sequenzspezifische Modifizierung der 5'-Kappe von mRNA zu erreichen und so bestimmte mRNAs detektieren zu können.

Anhand der *Giardia lamblia* Trimethylguanosinsynthase 2-Variante V34A (GlaTgs2-V34A) ist es möglich, die 5'-Kappe unter Verwendung verschiedener AdoMet-Analoga als Cosubstrat mit verschiedenen funktionellen Gruppen zu versehen, und diese in einem weiteren Schritt für die Modifizierung mit Fluorophoren zu nutzen (Kapitel 1.3.1.2).^[230, 234, 236, 333-335] Bislang war diese Modifizierung lediglich von der Anwesenheit des Kappen-Analogons abhängig, was bedeutete, dass sämtliche Kappen-tragende mRNAs modifiziert werden. Für eine Detektion oder Visualisierung einer bestimmten RNA ist es jedoch erforderlich, dass diese Modifizierung spezifisch erfolgt. Diese Spezifität sollte anhand eines Fusionsproteins aus GlaTgs2-V34A und der Pum-HD erreicht werden. Die Idee war, die Modularität der Pum-HD zu nutzen und eine Variante zu erzeugen, die an eine bestimmte 8 nt-Sequenz am 5'-Ende der Ziel-RNA bindet. Durch die Fusionierung mit dieser Pum-Variante würde eine sequenzspezifische Modifizierung der 5'-Kappe durch GlaTgs2-V34A erreicht werden. Die enzymatisch modifizierte Kappe wäre anschließend für eine weitere chemische Modifizierung mittels Klick-Reaktion zugänglich (Abbildung 3.30). Eine Studie von Haase hatte bereits gezeigt, dass die Fusionierung einer Variante der HsPum-HD an GlaTgs2-V34A generell möglich ist.^[336]

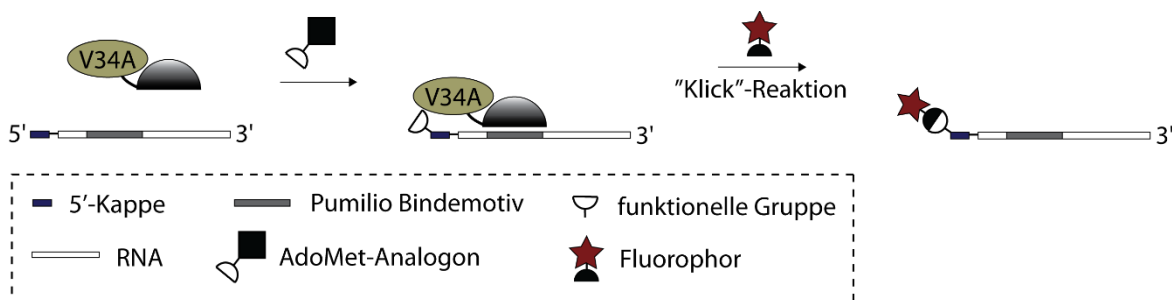


Abbildung 3.30: Ansatz zur sequenzspezifischen Detektion von RNA basierend auf der Modifizierung der 5'-Kappe durch das Designerprotein Pum-Tgs. Durch Fusionierung der Pumilio-HD an die *Giardia lamblia* Trimethylguanosinsynthase 2-Variante V34A (Pum-Tgs) soll die sequenzspezifische Modifizierung der mRNA 5'-Kappe mit funktionellen Gruppen ermöglicht werden. Die Funktionalisierung wird hierbei durch GlaTgs2-V34A unter Verwendung von AdoMet-Analoga als Substrat erreicht. In einem zweiten Schritt wird ein Fluorophor mittels Klick-Chemie eingebracht.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse zur Generierung verschiedener Varianten der Pumilio-GlaTgs2-V34A (Pum-Tgs)-Fusionsproteine, ihrer Reinigung und der Einsatz von Pum-Tgs zur Modifizierung der 5'-Kappe beschrieben.

3.3.1 Generierung und Reinigung verschiedener Pum-Tgs-Varianten

Bei der Fusionierung von GlaTgs2-V34A mit der Pum-HD zur Generierung des Fusionsproteins Pum-Tgs ist generell eine C- oder N-terminale Fusionierung denkbar. In Anlehnung an PUF-PIN, welches die sequenzspezifische Restriktion von RNA erlaubt,^[133] wurde eine Fusionierung von Pum an den N-Terminus von GlaTgs2-V34A bevorzugt. Zu beachten ist hierbei, dass die Bindung der Pum-HD an die RNA antiparallel erfolgt (Kapitel 1.2.3). Da die Linker-Sequenz, die für die Fusionierung zweier Proteine verwendet wird, mitunter einen hohen Einfluss auf die Löslichkeit oder die Flexibilität des Fusionskonstruktes haben kann,^[337] wurden unterschiedliche Linker für Pum-Tgs ausgewählt und getestet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Protein-Linker für Pum-Tgs. Aufgeführt sind die Aminosäuresequenzen sowie die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der für die Pum-Tgs-Varianten verwendeten Linker.

Bezeichnung	Typ ^a	Aminosäuresequenz
GRK		GRKGSGDPGKKKQ ^b
GRKs		GGKKQ ^b
GS	flexibel	GGGSGGGGS ^c
HL3	starr	LAEEAAKEAAKEAAKAAA ^d
HL3s	starr	EAAKEAAK ^d

^a nach ^[337], ^b Quelle: ^[338], ^c Quelle: (GGGS)₃ aus ^[339], ^d Quelle: ^[340]

Der GRK-Linker (GRKGSGDPGKKKQ) wurde von Sulej *et al.* zur Generierung einer sequenzspezifischen RNase basierend auf einem Zinkfingerprotein als Binde-Domäne genutzt^[338] und bereits von Haase zur Klonierung der Pum-Tgs-Variante Var1-GRK-Tgs eingesetzt.^[336] Eine verkürzte Version des GRK-Linkers wurde von Sulej *et al.* ebenfalls beschrieben (GRKs, GGKKQ^[338]) und für die Fusionierung der Pum-HD an GlaTgs2-V34A gewählt. Zusätzlich wurden für Pum-Tgs ein flexibler Linker (GS, (GGGSGGGGS)) und zwei verschiedene Längen eines α -helikalen, starren Linkers verwendet (HL3 (LAEEAAKEAAKEAAKAAA), HL3s (EAAKEAAK)).^[340] Ein GS-ähnlicher Linker war von Haase ebenfalls verwendet worden.^[336] Die Verwendung eines HL3-Linkers war bislang nicht erfolgreich.^[336] Die für *E. coli* Codon-optimierten Nukleotidsequenzen der fünf

verschiedenen Linker wurden mittels PCR zwischen die für GlaTgs2-V34A und die für WT Pum-HD codierenden Sequenzen kloniert, und die jeweiligen Fusionskonstrukte in pET16+ eingebracht (Plasmide pSJK21 bis pSJK25). Auf diese Weise erhielten die Fusionskonstrukte zusätzlich einen N-terminalen His-Tag.

Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine Pum-GRK-Tgs, Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und Pum-HL3s-Tgs erfolgte analog zur Produktion der TetFC-Pumilio-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) pLysS Zellen.^[302] In Abbildung 3.31 ist die Überprüfung der rekombinanten Proteinproduktion sowie der anschließenden Reinigung mittels IMAC dargestellt.

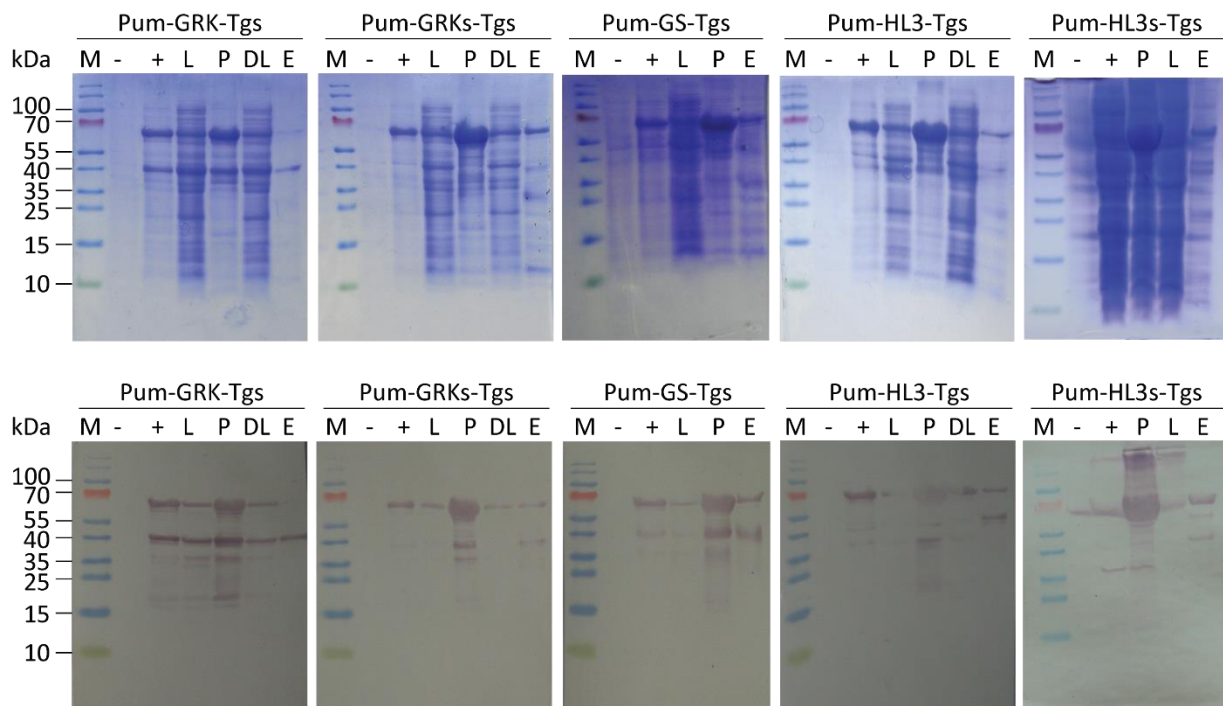


Abbildung 3.31: Produktion und Reinigung der Pumilio/GlaTgs2-V34A-Fusionsproteine Pum-GRK-Tgs, Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und Pum-HL3s-Tgs. (oben) 10 %ige SDS-PAA-Gele nach Coomassie-Färbung, **(unten)** NC-Membranen nach Inkubation mit Anti-His- und Anti-Maus-AP-Antikörper. (M) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Zellen (-) vor und (+) nach Induktion mit IPTG, (L) Überstand nach Zellyse, (P) Pellet nach Zellyse, (DL) Durchlauf der HisTrap™ Säule, (E) konzentriertes Eluat nach Zugabe von 150 mM Imidazol.

Je nach Linkerlänge besitzen die Pum-Tgs-Varianten ein Molekulargewicht von 72.5-73.8 kDa und sind erfahrungsgemäß etwas unterhalb dieser Höhe bei der gelelektrophoretischen Trennung zu finden.^[135, 302, 311, 320] Entsprechende Proteinbanden wurden sowohl mittels Coomassie-Färbung, als auch mittels Western Blot nach Induktion mit IPTG detektiert, was für eine erfolgreiche Produktion der Fusionsproteine spricht (Abbildung 3.31, Spur „+“). Zusätzlich zu der Pum-Tgs zugeordneten Bande wurde im Falle von Pum-GRK-Tgs eine weitere dominierende Bande bei einem

Molekulargewicht von etwa 40 kDa detektiert. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um die Pum-HD (40 kDa) mit dem N-terminalen His-Tag. Der Linker GRK war somit nicht für ein Fusionsprotein aus Pum und GlaTgs2-V34A geeignet.

Abbildung 3.31 kann zudem entnommen werden, dass der überwiegende Teil sämtlicher Pum-Tgs Fusionsproteine unlöslich produziert wurde, lösliches Protein jedoch mittels IMAC gereinigt werden konnte (Spuren „L“, „P“ und „E“). Die Ausbeute der fünf Fusionsproteine betrug 0.6 mg (Pum-GRK-Tgs) bis 2 mg (Pum-HL3s-Tgs) pro Liter Kultur. Von den Pum-Tgs-Varianten Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs und Pum-HL3-Tgs wurde jeweils 1 mg pro Liter Kultur erhalten.

3.3.2 Untersuchung der Enzymaktivität der Pum-Tgs-Varianten

Nach erfolgreicher Produktion und Reinigung der Pum-Tgs-Varianten Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und Pum-HL3s-Tgs (Kapitel 3.3.1), wurden diese hinsichtlich ihrer Aktivität auf die Cosubstrate AdoMet und AdoPropen (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-enylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) zur enzymatischen Modifizierung der Kappen-Analoga m^7 GTP und m^7 GpppA untersucht. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob die Fusionierung von GlaTgs2-V34A mit Pum die Aktivität des Enzyms beeinträchtigt. Das Fusionsprotein Pum-GRK-Tgs wurde aufgrund der geringen Ausbeute für diese Experimente nicht verwendet (Kapitel 3.3.1).

Die Umsetzung des Kappen-Analogon m^7 GTP **1** mit AdoMet (*S*-Adenosyl-L-Methionin) **2**, dem natürlichen Substrat der Trimethylguanosinsynthase, erfolgte analog zur Biokonversion unter Verwendung von GlaTgs2-V34A.^[335] Jeweils 2 μ M der Pum-Tgs-Variante wurden mit 500 μ M m^7 GTP **1** und 750 μ M AdoMet **2** eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Das Reaktionsschema, bei dem das hypermethylierte Kappen-Analogon $m^{2,7}$ GTP **3** entsteht, ist in Abbildung 3.32A veranschaulicht. Als Coprodukt entsteht zusätzlich *S*-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) **4**. Die Reaktion wurde mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) überprüft. Die Analyse des Ansatzes zum Zeitpunkt t_{End} bei einer Wellenlänge von 300 nm ist in Abbildung 3.32B dargestellt. Mit allen vier Pum-Tgs-Varianten konnte nach Ablauf der Reaktion ein zusätzliches Signal bei einer Retentionszeit von $t_R = 8.2$ min erhalten werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Umsetzung von m^7 GTP mit AdoMet und der humanen Tgs hTGS1_{618–853} zu $m^{2,7}$ GTP **3** ($t_R = 8.5$ min).^[341] Erwartungsgemäß wurde das Produkt bei der Negativkontrolle, bei der kein Enzym eingesetzt wurde, nicht detektiert (Abbildung 3.32B). Bei einer vorangegangenen Deaktivierung der Enzyme durch fünfminütige Inkubation bei 96 °C,

oder der Analyse der Reaktion zum Zeitpunkt t_0 wurde das Produkt ebenfalls nicht detektiert. Ein weiteres schwaches Signal bei $t_R = 11.9$ min konnte dem Pumilio Dialysepuffer zugeordnet werden

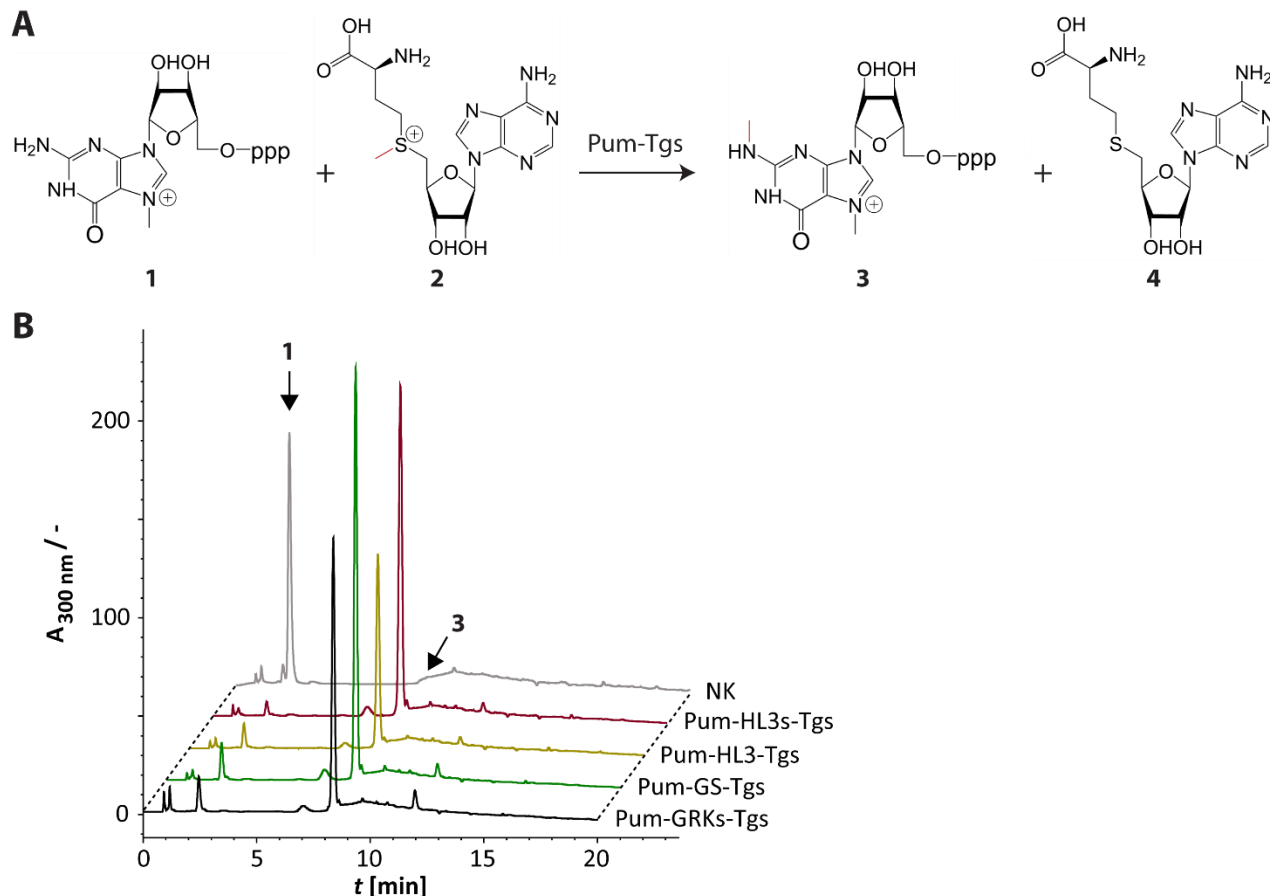


Abbildung 3.32: Umsetzung von m^7 GTP zu $m^{2,7}$ GTP mittels verschiedener Pum-Tgs-Varianten. (A) Reaktionsschema der GlaTgs2-V34A katalysierten Umsetzung von m^7 GTP **1** zu $m^{2,7}$ GTP **3** unter Verwendung von AdoMet **2** als Cosubstrat. GlaTgs2-V34A katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe vom Cosubstrat AdoMet **2** auf das Kappen-Analogon m^7 GTP **1** in Position N^2 . Als zusätzliches Coprodukt entsteht AdoHcy **4**. **(B)** Analyse der Biokonversion mittels RP-HPLC. Gezeigt sind Proben der Reaktionen nach einstündiger Inkubation mit den Pum-Tgs-Varianten Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und Pum-HL3s-Tgs, oder (NK) ohne Enzym bei 37 °C. Gezeigt ist die Absorption bei 300 nm.

Bei der Umsetzung von m^7 GTP **1** zu $m^{2,7}$ GTP **3** mit AdoMet **2** als Cosubstrat wurden in drei unabhängigen Experimenten folgende Ausbeuten erhalten: Pum-GRKs-Tgs: 91 ± 9 %, Pum-GS-Tgs: 94 ± 6 %, Pum-HL3-Tgs: 88 ± 8 % und Pum-HL3s-Tgs: 86 ± 17 %. Die entsprechende Ausbeute bei Verwendung von GlaTgs2-V34A betrug 93 ± 10 %. Somit ergab sich eine relative Aktivität der Pum-Tgs-Varianten von 82-101 % im direkten Vergleich zu GlaTgs2-V34A (Tabelle 3.2). Im Hinblick auf diese Daten konnte somit unter den verwendeten Reaktionsbedingungen kaum eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität von GlaTgs2-V34A nach Fusionierung mit der Pum-HD

beobachtet werden. Dies stellte eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung in der sequenzspezifischen Modifizierung von mRNA durch Pum-Tgs dar.

Weiterhin wurde die Aktivität der Pum-Tgs-Varianten auf das AdoMet-Analogon AdoPropen **6** bei der Biokonversion von m^7 GpppA **5** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **7** (Abbildung 3.33A) analysiert. Auf diese Weise sollte verifiziert werden, dass der Transfer einer größeren funktionellen Gruppe auf ein Kappen-Analogon trotz der Fusionierung von GluTgs2-V34A an die Pum-HD weiterhin möglich ist.

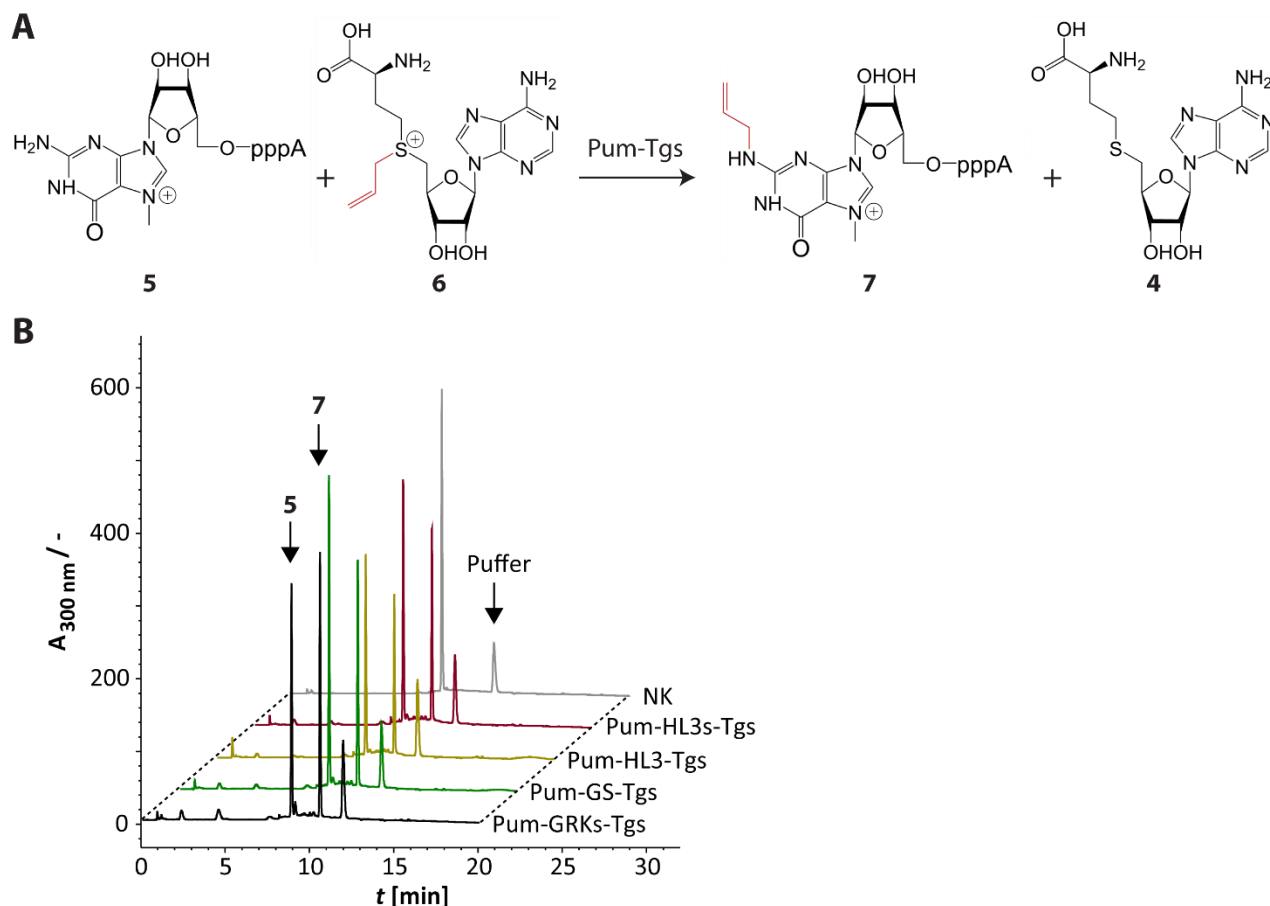


Abbildung 3.33: Umsetzung von m^7 GpppA zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA mittels verschiedener Pum-Tgs-Varianten. (A) Reaktionsschema der GluTgs2-V34A katalysierten Umsetzung von m^7 GpppA **5** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **7** unter Verwendung von AdoPropen **6** als Cosubstrat. GluTgs2-V34A katalysiert die Übertragung einer Allylgruppe von Substrat AdoPropen **6** auf das Kappen-Analogon m^7 GpppA **5** in Position N^2 . Als zusätzliches Coprodukt entsteht AdoHcy **4**, welches durch MTAN und LuxS zu Homocystein abgebaut wird. **(B)** Analyse der Biokonversion mittels RP-HPLC. Gezeigt sind Proben der Reaktionen nach dreistündiger Inkubation mit den Pum-Tgs-Varianten Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und Pum-HL3s-Tgs, oder (NK) ohne Enzym bei 37 °C. Gezeigt ist die Absorption bei 300 nm.

Hierfür wurden, analog zur Umsetzung mit GluTgs2-V34A,^[230, 234, 334, 335] 2-14 μ M Pum-Tgs, 1 mM m^7 GpppA **5** und 900 μ M AdoPropen **6** eingesetzt und 3 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Zur

Degradation des Coprodukts AdoHcy **4**, welches eine Produktinhibierung bewirkt,^[342] zu Homocystein wurden 3 μ M 5'-Methylthioadenosin/S-Adenosylhomocystein Nukleosidase (MTAN)/S-Ribosylhomocystein Lyase (LuxS) verwendet.^[230, 234, 334, 335] Auch in diesem Fall erfolgte die Überprüfung der Reaktion chromatographisch. Erwartungsgemäß konnte nach Inkubation mit den Pum-Tgs-Varianten ein zusätzliches Produkt detektiert werden, während ein entsprechendes Signal nach Inkubation ohne Enzym fehlte (Abbildung 3.33B). In Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Retentionszeit des Produkts *N*²-Allyl-m⁷GpppA **7** betrug die Retentionszeit des neuen Peaks $t_R = 10.6$ min.^[230] Der zusätzliche Peak bei $t_R = 11.9$ min konnte, wie bereits bei der Biokonversion mit AdoMet **2** (Abbildung 3.32), dem Reaktionspuffer zugeordnet werden. Die verschiedenen Pum-Tgs-Varianten ermöglichten eine Generierung des Produkts *N*²-Allyl-m⁷GpppA **7** mit einer 29-45 %igen Ausbeute. Die relative Aktivität der Pum-Tgs Fusionsproteine betrug somit 56-86 % der Aktivität von GlaTgs2-V34A bei Verwendung von AdoPropen **6** als Cosubstrat (Tabelle 3.2). Folglich wurde, je nach verwendetem Protein-Linker, eine leicht bis stark verringerte Enzymaktivität von GlaTgs2-V34A auf AdoPropen nach der Fusionierung an die Pum-HD beobachtet. Diese fiel bei Pum-GRKs-Tgs mit 56 % im Vergleich zu GlaTgs2-V34A am geringsten aus. Bei der Biokonversion von AdoPropen **6** durch Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und HL3s-Tgs wurde hingegen mit 72-86 % in Bezug auf die Ausbeute mit GlaTgs2-V34A eine deutlich bessere Aktivität erhalten. Die Daten von Haase hatten zuvor auf einen fast vollständigen Verlust der Aktivität auf AdoPropen nach Fusionierung von GlaTgs2-V34 an Pumilio Var1 hingedeutet.^[336] Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Tabelle 3.2: Übersicht der Enzymaktivität der Pum-Tgs-Varianten im Vergleich zu GlaTgs2-V34A. Aufgeführt sind der prozentuale Umsatz der Substrate AdoMet **2**, der Umsatz von AdoPropen **6** und der Umsatz von AdoEnYn **9**, relativ zum Umsatz bei Verwendung von GlaTgs2-V34A.

Bezeichnung	Aktivität auf AdoMet ^a	Aktivität auf AdoPropen ^a	Aktivität auf AdoEnYn ^a
Pum-GRKs-Tgs	98 $\pm$ 10 %	56 $\pm$ 40 %	26 $\pm$ 25 %
Pum-GS-Tgs	101 $\pm$ 6 %	86 $\pm$ 13 %	12 $\pm$ 13 %
Pum-HL3-Tgs	95 $\pm$ 9 %	74 $\pm$ 44 %	9 $\pm$ 4 %
Pum-HL3s-Tgs	92 $\pm$ 18 %	72 $\pm$ 17 %	2 $\pm$ 2 %

^a Aktivität angegeben im Verhältnis zur Aktivität von GlaTgs2-V34A auf das entsprechende AdoMet-Analogon.

Als drittes Cosubstrat wurde das AdoMet-Analogon AdoEnYn (5'-[(*R/S*)-[(3*S*)-3-Amino-3-carboxypropyl]pent-2-en-4-inylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) **9** getestet, welches eine

Penteninylgruppe am Schwefelatom trägt (Abbildung 3.34A).^[343] Diese funktionelle Gruppe ist besonders für eine anschließende chemische Modifizierung interessant. Die Biokonversion von m^7 GpppA **5** zu N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA mittels AdoEnYn **9** und GlpTgs2-V34A wurde bereits charakterisiert.^[230, 334] Nach einer dreistündigen Inkubation von Pum-Tgs, AdoEnYn, dem Kappen-Analogon m^7 (3'-O-Methyl)GpppG (Anti-Reverse Kappen-Analogon, ARCA) sowie MTAN und LuxS bei 37 °C, wurden die Proben chromatographisch untersucht (Abbildung 3.34B). Die Wahl des Kappen-Analogon war durch die Verwendung in späteren Experimenten mit Kappen-tragender RNA, begründet.

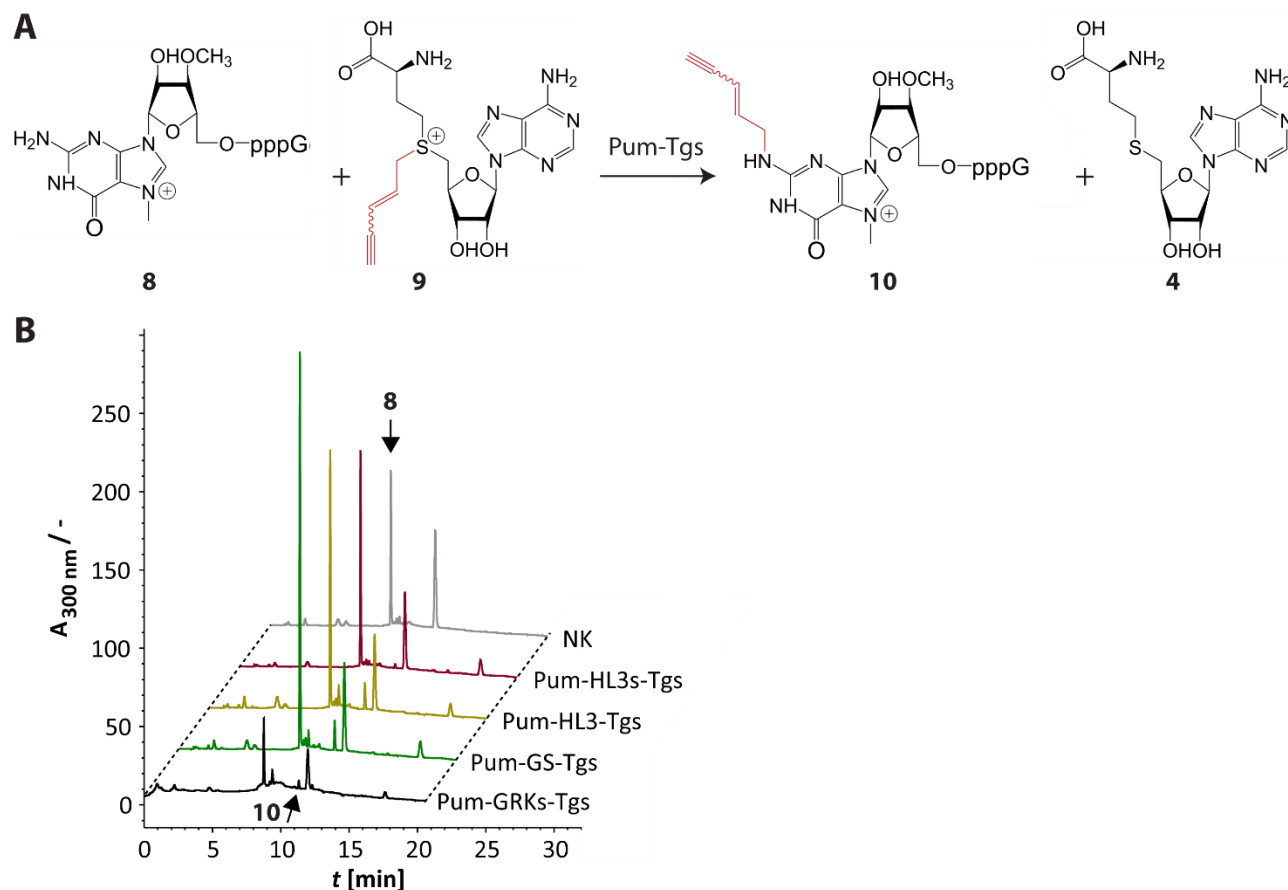


Abbildung 3.34: Umsetzung von m^7 (3'-O-Methyl)GpppG zu N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 (3'-O-Methyl)GpppG mittels verschiedener Pum-Tgs-Varianten. (A) Reaktionsschema der GlpTgs2-V34A katalysierten Umsetzung von m^7 (3'-O-Methyl)GpppG **8 zu N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 (3'-O-Methyl)GpppG **10** unter Verwendung von AdoEnYn **9** als Cosubstrat. GlpTgs2-V34A katalysiert die Übertragung einer Pentenylgruppe von Substrat AdoEnYn **11** auf das Kappen-Analogon m^7 (3'-O-Methyl)GpppG in Position N^2 . Als zusätzliches Coprodukt entsteht AdoHcy **4**, welches durch MTAN und LuxS zu Homocystein abgebaut wird. (B) Analyse der Biokonversion mittels RP-HPLC. Gezeigt sind Proben der Reaktionen nach dreistündiger Inkubation mit den Pum-Tgs-Varianten Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und Pum-HL3s-Tgs, oder (NK) mit zuvor denaturiertem Enzym bei 37 °C. Gezeigt ist die Absorption bei 300 nm.**

Bei der chromatographischen Analyse der in Abbildung 3.34A dargestellten Biokonversion konnte ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von $t_R = 11.3$ min detektiert werden, der dem Produkt N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- $m^7(3'$ -O-Methyl)GpppG **10** zugeordnet wurde. Die Verwendung von zuvor denaturiertem Enzym resultierte in der Abwesenheit dieses Peaks (Abbildung 3.34B). Der zusätzliche Peak bei $t_R = 11.9$ min konnte erneut dem Puffer zugeordnet werden (Vergleich Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33). Die Ausbeute der Umsetzung des AdoMet-Analogons AdoEnYn **9** unter Verwendung der Pum-Tgs-Varianten Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs und HL3s-Tgs betrug 2-21 %. Im Vergleich zu GlATgs2-V34A, anhand dessen eine maximale Ausbeute von 66 % erhalten wurde, betrug die relative Aktivität der Pum-Tgs-Varianten somit 2-26 % (Tabelle 3.2). Dies bedeutet, dass die Fusionierung von GlATgs2-V34A an die Pum-HD unter den verwendeten Reaktionsbedingungen einen deutlichen Verlust der Enzymaktivität zur Folge hatte, eine Aktivität jedoch weiterhin gegeben war.

Im Allgemeinen konnte bei der Biokonversion von m^7 GTP **1** und $m^{2,7}$ GpppA **5** mit AdoMet **2** und AdoPropen **6** gezeigt werden, dass mit den Pum-Tgs-Varianten die erhaltenen Ausbeuten unter der verwendeten Reaktionsbedingungen vergleichbar mit der Ausbeute nach Verwendung von GlATgs2-V34A war. Das Enzym war weiterhin aktiv und akzeptierte die verwendeten AdoMet-Analoga als Cosubstrate trotz Fusionierung mit einem 40 kDa Protein. Unter Verwendung des sterisch anspruchsvolleren AdoMet-Analogons AdoEnYn **9** war diese Aktivität jedoch stärker beeinträchtigt. Die Tatsache, dass eine generelle Fusionierung von GlATgs2-V34A an die Pum-HD unter Beibehaltung der enzymatischen Aktivität möglich ist, stellt eine gute Voraussetzung für die Modifizierungen der mRNA 5'-Kappe durch Pum-Tgs dar.

3.3.3 Versuch der sequenzspezifischen Modifizierung von RNA

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach einer Fusionierung von GlATgs2-V34A mit der Pum-HD die Aktivität des Enzyms auf die Cosubstrate AdoMet **2** und AdoPropen **6** weiterhin gegeben ist und trotz verringerter Aktivität auf das Substrat AdoEnYn **9** eine Biokonversion erhalten werden konnte (Kapitel 3.3.2), wurden die verschiedenen Pum-Tgs-Varianten zur Modifizierung von Kappen-tragender RNA eingesetzt. Hierfür sollte das für die anschließende chemische Modifizierung geeignete AdoMet-Analogon AdoEnYn **9** verwendet werden. Die penteninylierte Kappe kann in diesem Fall sowohl mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-(1,3)-Cycloaddition (CuAAC) als auch mittels photoinduzierter Cycloaddition (Photoklick) chemisch modifiziert werden.^[230, 334]

Die Reaktionsschemata für die Pum-Tgs-katalysierte Modifizierung Kappen-tragender RNA sowie die anschließende Markierung mittels CuAAC sind in Abbildung 3.35 dargestellt. Pum-Tgs transferiert die Penteninygruppe von AdoEnYn **9** auf die m⁷(3'-O-Methyl)GpppG-tragende RNA **11**, wodurch RNA mit dem Kappen-Analogon N²-(Pent-2-en-4-ynyl)-m⁷(3'-O-Methyl)GpppG **12** und S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) **4** entsteht (Abbildung 3.35A). Nach Zugabe von Cu(I)-Ionen und Acetonitril (ACN) als Stabilisator soll die enzymatisch übertragende Penteninygruppe mit dem Reporter-Molekül Cy5-Azid **13** in einer CuAAC zu einem Triazol **14** reagieren (Abbildung 3.35B).

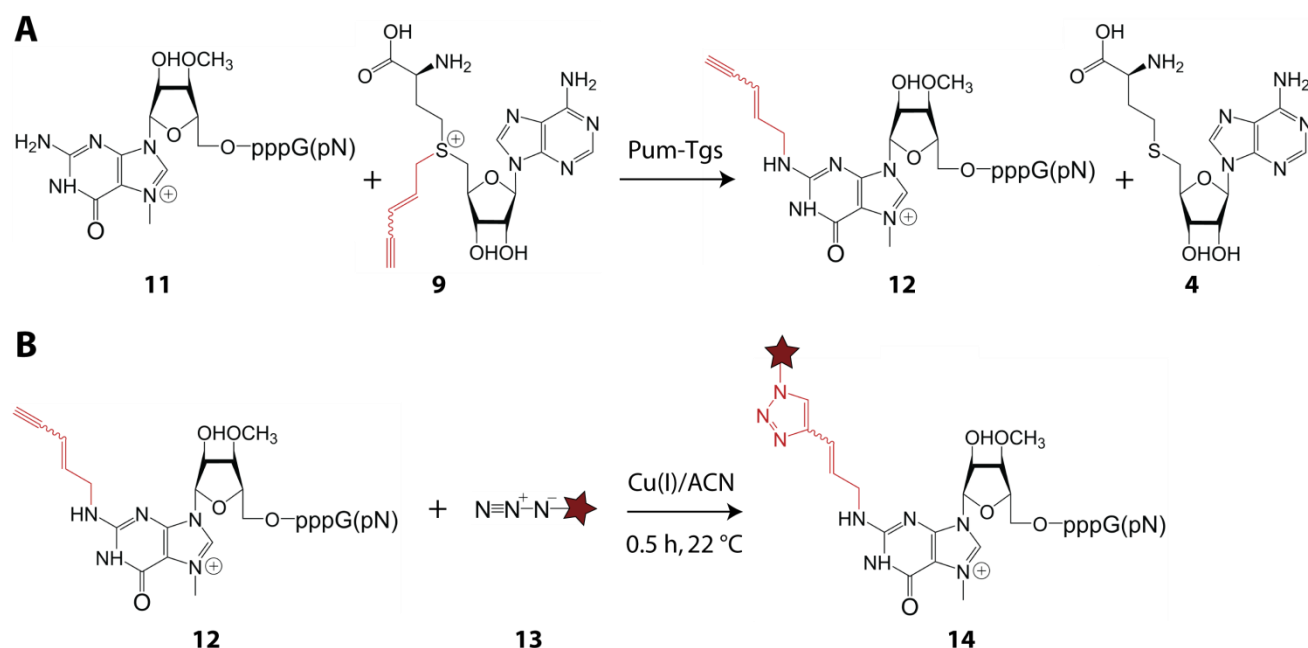


Abbildung 3.35: Ansatz zur enzymatischen Modifizierung Kappen-tragender RNA mittels Penteninylierung und chemischer Markierung anhand von CuAAC. (A) Reaktionsschema der GlaTgs2-V34A katalysierten Umsetzung von m⁷(3'-O-Methyl)GpppG-tragender RNA **11** zu N²-(Pent-2-en-4-ynyl)-m⁷(3'-O-Methyl)GpppG-tragender RNA **12** unter Verwendung von AdoEnYn **9** als Cosubstrat. GlaTgs2-V34A vermittelt die Übertragung einer Penteninygruppe von Substrat AdoEnYn **9** auf das Kappen-Analogon m⁷(3'-O-Methyl)GpppG in Position N². Als zusätzliches Coprodukt entsteht AdoHcy **4**, welches durch MTAN und LuxS zu Homocystein abgebaut wird. **(B)** Reaktionsschema zur chemischen Modifizierung der penteninylierten Kappe von RNA **12** mittels CuAAC. Die Zugabe von Cy5-Azid **13** zu dem Alkin **12** in Anwesenheit eines Cu(I)-Katalysators und Ligand ACN resultiert in der Bildung eines Triazols **14** und der gleichzeitigen Cy5-Markierung der RNA.

Als Ziel-RNA wurde ein Bereich aus der 3'-UTR der *D. melanogaster hunchback* mRNA verwendet, welche das Bindemotiv boxA der WT Pum-HD natürlicherweise enthält (Abbildung 3.36A). Mittels PCR wurde das Pum-Bindemotiv boxA so angefügt, dass es sich in der *in vitro* hergestellten RNA in einem Abstand von 20 nt zur 5'-Kappe befindet (Abbildung 3.36A). Basierend auf der hohen Affinität der WT Pum-HD für boxA ($0.48 \pm 0.21 \text{ nM}$)^[129] sollte GlaTgs2-V34A in räumliche Nähe der 5'-Kappe rekrutiert werden und eine Modifizierung derer erlauben. Bei einer Kontroll-RNA wurde

ein entsprechendes Oligonukleotid ohne boxA verwendet. Um beide RNAs gelelektrophoretisch unterscheiden zu können, wurden die jeweiligen Oligonukleotide so gewählt, dass sich Ziel- und Kontroll-RNA in ihrer Länge um 200 nt unterscheiden.

Die Herstellung der RNA erfolgte mittels T7-Transkription *in vitro*. Hierbei wurde das ARCA verwendet (Abbildung 3.35), dessen Methoxygruppe am 3'-Kohlenstoffatom den korrekten Einbau der Kappe während der Transkription bewirkt.^[344] Die Zugänglichkeit des ARCA für die enzymatische Modifizierung durch Pum-Tgs wurde überprüft und war trotz zusätzlicher Methoxygruppe weiterhin gegeben (Kapitel 3.3.2).

Zur sequenzspezifischen Modifizierung der RNA wurde die Pum-Tgs-Variante Pum-HL3s-Tgs eingesetzt, da deren vergleichsweise hohe Ausbeute (Kapitel 3.3.1) eine höhere Enzymkonzentration erlaubte. Zudem lieferte diese Variante bei der Biokonversion von m⁷(3'-O-Methyl)GpppG zu N²-(Pent-2-en-4-ynyl)-m⁷(3'-O-Methyl)GpppG die konstantesten Werte (Tabelle 3.2). Während einer halbstündigen Inkubation eines äquimolaren Gemisches aus boxA-tragender Ziel-RNA und Kontroll-RNA ohne boxA (je 0.63 µM) mit 0.54 µM Pum-HL3s-Tgs sollte die Bindung der Pum-HD an boxA erfolgen. Anschließend wurden 3.8 µM AdoEnYn **9** und 3 µM MTAN/LuxS hinzugefügt und die Reaktion 3 h bei 37 °C durchgeführt. Aufgrund der Bindung der Pum-HD an boxA sollte eine bevorzugte Penteninylierung der Ziel-RNA erfolgen, während die Modifizierung der 5'-Kappe bei der Kontroll-RNA deutlich schwächer ausfallen sollte. Das Produkt dieser Reaktion wurde im Anschluss für eine Markierung mittels CuAAC eingesetzt. Hierbei sollte die enzymatisch transferierte Penteninylgruppe zusammen mit Cy5-Azid **13** ein Triazol bilden und so die chemische Markierung der RNA ermöglichen (Abbildung 3.35B). Die Durchführung der CuAAC anhand der von Schulz *et al.* beschriebenen einstündigen Inkubation bei 37 h^[230] resultierte in einem starken Abbau der RNA, sodass die Analyse der chemo-enzymatischen Modifizierung der RNA nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden die Reaktionsbedingungen geändert und die Reaktion stattdessen für 10 min bei 22 °C vorgenommen. Weiterhin wurde anstelle von Cu(I)-Bromid Cu(II)-Sulfat verwendet, was eine verringerte Klick-Effizienz bewirkte, aber gleichzeitig die Integrität der RNA deutlich verbesserte. Die gelelektrophoretische Überprüfung der chemo-enzymatischen Modifizierung der RNA mit diesen optimierten Bedingungen ist in Abbildung 3.36B dargestellt.

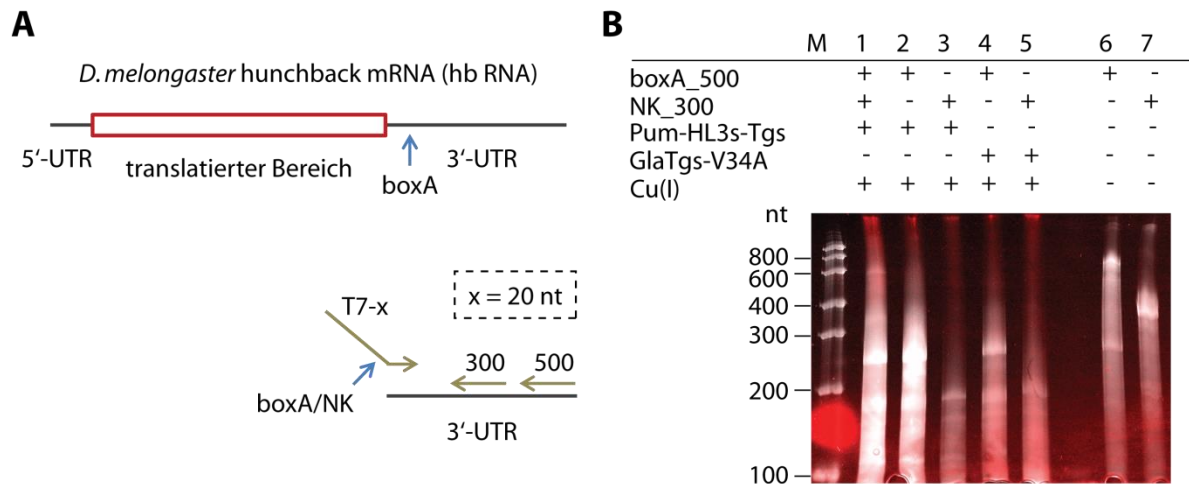


Abbildung 3.36: Sequenzspezifische Modifizierung Kappen-tragender RNA. (A) Design der Ziel-RNA. Als Ziel-RNA wurde ein Bereich der 3'-UTR der *D. melanogaster* *hb* mRNA gewählt, welche boxA natürlicherweise enthält. Pum-Bindemotiv boxA (oder eine Kontroll-Sequenz ohne Bindemotiv) wurde mittels Oligonukleotiden mit einem Abstand von $x = 20$ nt zum 5'-Ende des entsprechenden DNA-Konstrukts eingeführt, welches als Templat für die T7-Transkription diente. Eine zusätzliche T7-Promotorsequenz soll die *in vitro* Transkription ermöglichen. Anhand eines zweiten Oligonukleotids wurde die Länge der RNA variiert. **(B)** Analyse der chemischen Markierung sequenzspezifisch-modifizierter RNA. Nach Pentenylierung der boxA-enthaltenden RNA durch Pum-HL3s-Tgs wurde diese mittels Cy5-Azid und CuAAC markiert. Als Kontroll-RNA wurde eine um 200 nt kürzere RNA ohne Bindemotiv boxA verwendet. Als weitere Kontrolle wurde GlaTgs2-V34A verwendet. Die verschiedenen Kombinationen aus RNA und Enzym sind angezeigt. 5 %iges denat. PAA-Gel, Überlagerung der Signale nach Färbung mit SYBR® Gold (grau, $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} \geq 520$ nm) und Detektion der Cy®5-Fluoreszenz (rot, $\lambda_{ex} = 635$ nm, $\lambda_{em} \geq 670$ nm).

Zu erwarten war, dass nach der chemo-enzymatischen Modifizierung der Ziel-RNA boxA_500 (500 nt) mittels Pum-HL3s-Tgs sowie anschließender CuAAC eine fluoreszierende Bande auf einer Höhe von ca. 500 nt detektiert werden würde. Dies war jedoch nicht in allen Proben, die boxA_500 enthielten, der Fall (Abbildung 3.36B). Vielmehr konnte anstelle von definierten Banden eine generelle Zunahme der Fluoreszenz der Proben, insbesondere im Bereich kleinerer RNA-Fragmente, beobachtet werden. Dies ist vermutlich durch den Abbau der RNA zu begründen. Zusätzlich konnte entgegen den Erwartungen bei denjenigen Proben, die anstelle von boxA_500 die 300 nt-Negativkontrolle ohne Pumilio-Bindemotiv enthielten ebenfalls eine Fluoreszenz bei kleineren RNA-Fragmenten beobachtet werden. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass das Fusionsprotein Pum-HL3s-Tgs nicht gebunden vorliegt, sondern, analog zu den von Schulz *et al.* und Muttach und Rentmeister beschriebenen Experimenten,^[230, 333] die unspezifische Markierung sämtlicher 5'-Kappen-tragender RNAs mittels GlaTgs2-V34A, AdoEnYn als Cosubstrat und CuAAC erlaubt. Bei der parallelen Verwendung von boxA_500 und NK_300 sowie eines Unterschusses an Pum-HL3s-Tgs war jedoch erwartet worden, dass Pum-HL3s-Tgs an boxA_500 bindet und lediglich eine chemo-enzymatische Modifizierung von boxA_500 erhalten wird. Aufgrund des Abbaus der

RNA und den daraus resultierenden unterschiedlich großen RNA-Fragmenten, konnte eine generelle Zunahme des Fluoreszenzsignals keiner der eingesetzten RNAs zugeordnet werden.

Der Vergleich der Proben, bei denen das Enzym GlaTgs2-V34A anstelle von Pum-Tgs zur Modifizierung der einzelnen RNAs boxA_500 oder NK_300 verwendet worden war, zeigte zudem, dass hier zwar ein allgemein höheres Fluoreszenzsignal detektiert wurde, gleichzeitig jedoch ein stärkerer Abbau der RNA stattgefunden hat. Aus diesem Grund konnte keine Aussage darüber getroffen werden, zu welchem Maße die Modifizierung der RNA erfolgte. Die zuvor beobachtete höhere Aktivität von GlaTgs2-V34A im Vergleich zu Pum-Tgs gegenüber AdoEnYn (Kapitel 3.3.2) konnte in diesem Experiment nicht reproduzierbar beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach der CuAAC mit zuvor penteninylierter RNA ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, die Stabilität der RNA unter den verwendeten Reaktionsbedingungen jedoch problematisch ist und keine Aussage über eine Sequenzspezifität bei der chemo-enzymatischen Modifizierung mittels *G. lamblia* Trimethylguanosinsynthase 2-Variante V34A gemacht werden konnte.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Pumilio Homologie-Domäne (Pum-HD) eine geeignete Binde-Domäne in diversen Designerproteinen im Bereich der sequenzspezifischen Detektion oder Modifizierung von RNA darstellt. Insbesondere sollte unter anderem analysiert werden, ob die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC) in *E. coli* etabliert und darauf aufbauend ein Hochdurchsatzverfahren zum Screening von Pumilio-Varianten zur Bindung bestimmter Ziel-RNAs entwickelt werden kann (Kapitel 4.1.1, 4.1.2). Weiterhin wurde untersucht, ob eine Erweiterung der TetFC auf ein duales System die Detektion zweier verschiedener Ziel-RNAs ermöglicht (Kapitel 4.1.3). In einem dritten Projekt wurde schließlich die Anwendbarkeit der Pum-HD als Binde-Domäne für die sequenzspezifische Modifikation der mRNA 5'-Kappe erforscht (Kapitel 4.2).

4.1 Sequenzspezifische RNA-Detektion

4.1.1 Etablierung von TetFC *in vivo*

Zur gerichteten Evolution RNA-bindender Proteine wurden bislang verschiedene Methoden genutzt. Ein System zur Analyse von Zinkfinger-Varianten stellt beispielsweise das Phagen-Display dar.^[345, 346] Ein vielfach genutztes System zur Untersuchung von Pumilio-RNA-Interaktionen ist das von SenGupta *et al.* entwickelte Hefe-Drei-Hybrid-System.^[347] Anhand dessen wurden beispielsweise diejenigen Aminosäuren identifiziert, die die sequenzspezifische Detektion von Cytosin durch die Pum-HD erlauben.^[130, 131] *S. cerevisiae* steht jedoch nicht jedem Labor zur Verfügung, während *E. coli* einen weitaus häufiger eingesetzten Organismus darstellt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand verschiedener Ansätze versucht, die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung in *E. coli* zu etablieren und zur Analyse von Pumilio-RNA-Interaktionen mittels Durchflussszytometrie zu nutzen. Der Übersicht halber sind die verwendeten Expressionssysteme in Abbildung 4.1 vergleichend zusammengefasst.

Für die Etablierung des TetFC-Systems *in vivo* war es zunächst notwendig die entsprechenden Gene in *E. coli* einzubringen, sodass sowohl die drei Proteinkomponenten (S10-WT, Var1-S11 und GFP1-9) als auch die Ziel-RNA von der zellulären Maschinerie hergestellt werden können.

In einem ersten Ansatz wurde *gfp1-9* in das Genom von *E. coli* integriert, da das Detektor-Fragment GFP1-9 die einzige TetFC-Komponente darstellt, die im Zuge des Screenings verschiedener Pumilio-Varianten, oder RNAs unverändert bleiben würde (Abbildung 4.1A). Die chromosomale Integration

an drei verschiedenen Positionen im Genom von *E. coli* BL21(DE3) war erfolgreich, was durch die Vitalität der Stämme und den Nachweis von löslichem GFP1-9 durch BiFC mit Pum-S10-S11 bestätigt werden konnte. Da jedoch jeweils lediglich eine Kopie von *gfp1-9* in das *E. coli* Genom eingebracht wurde, wurde eine relativ geringe Konzentration von GFP1-9 erwartet, die hauptsächlich von der Stärke des verwendeten Promotors abhängt. Der Vergleich mit Zellen, die die *gfp1-9* Genkassette auf einem Plasmid codiert vorliegen hatten, bestätigte diese Annahme (Kapitel 3.1.1).

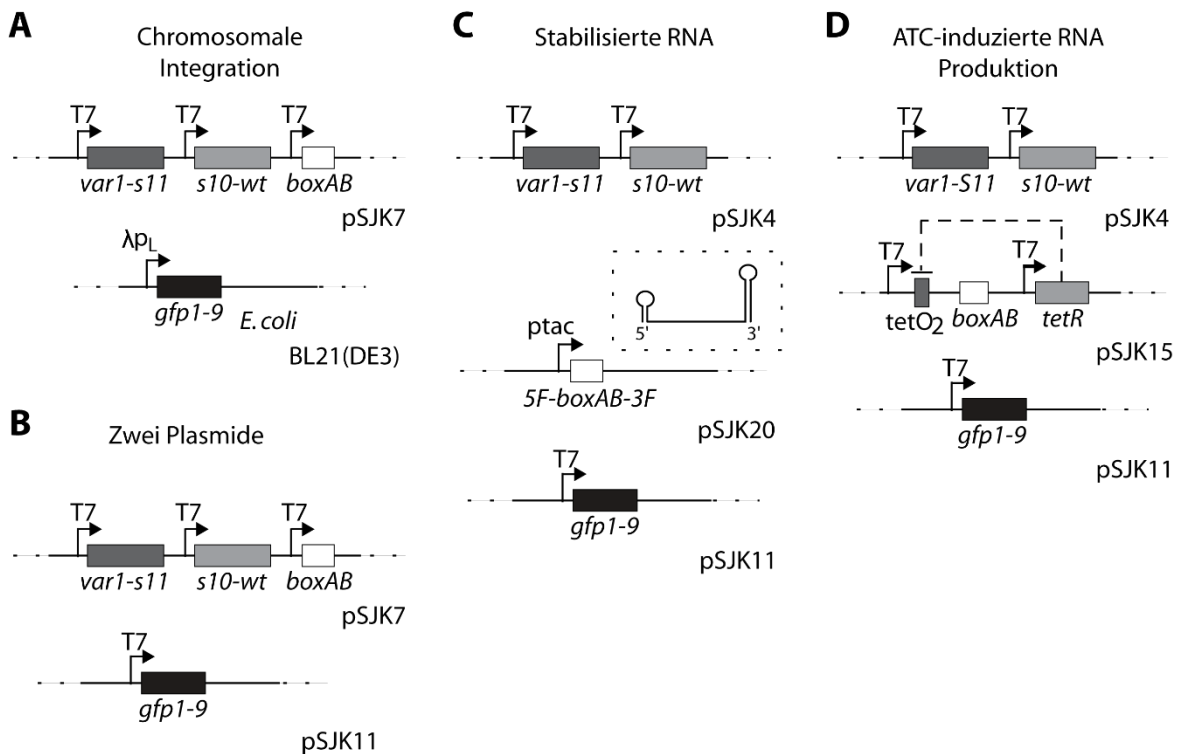


Abbildung 4.1: Übersicht der verwendeten Expressionssysteme zur Etablierung von TetFC *in vivo*. (A) Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie der Ziel-RNA boxAB erfolgt unter Kontrolle von drei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe mit Hilfe des Plasmids pSJK7. *gfp1-9* wird mittels chromosomaler Integration in das Genom von *E. coli* BL21(DE3) eingebracht und unter der Kontrolle des Promotors λp_L konstitutiv exprimiert. (B) Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 sowie der Ziel-RNA boxAB erfolgt mit Hilfe des Plasmids pSJK7 unter Kontrolle von drei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe. *gfp1-9* wird anhand des Plasmids pSJK11 in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht und ebenfalls unter der Kontrolle eines T7-Promotors rekombinant produziert. (C) Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 erfolgt mit Hilfe des Plasmids pSJK4 unter Kontrolle von zwei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe. *gfp1-9* wird anhand des Plasmids pSJK11 in *E. coli* BL21-Gold(DE3) eingebracht und ebenfalls unter der Kontrolle eines T7-Promotors rekombinant produziert. Die Produktion der mittels Haarnadelschleifen 5F und 3F stabilisierten Ziel-RNA boxAB erfolgt unter Kontrolle des Promotors p_{tac} nach IPTG-Zugabe. (D) Die rekombinante Produktion der Fusionsproteine S10-WT und Var1-S11 erfolgt mit Hilfe des Plasmids pSJK4 unter Kontrolle von zwei T7-Promotoren nach IPTG-Zugabe. *gfp1-9* wird anhand des Plasmids pSJK11 in *E. coli* BL21-Gold(DE3) eingebracht und ebenfalls unter der Kontrolle eines T7-Promotors rekombinant produziert. Die Produktion der Ziel-RNA boxAB ist aufgrund der Bindung von tetR an den zweifachen Tetracyclinoperator (tetO₂) zunächst inhibiert und erfolgt erst nach Zugabe von Tetracyclin(-Derivaten).

Aus diesem Grund wurde in einem zweiten Versuch ein vollständig Plasmid-basierter Ansatz gewählt, bei dem *gfp1-9* mittels eines Plasmids in *E. coli* eingebracht wurde und *s10-wt*, *var1-s11* und *boxAB* unter Kontrolle von individuellen T7-Promotoren auf einem zweiten Plasmid vorlagen (Abbildung 4.1B). Die Produktion der einzelnen Komponenten konnte mittels *in vitro* Fluoreszenzkomplementierung sowie Northern und Western Blots nachgewiesen werden. Eine tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung *in vivo* war jedoch nicht erfolgreich (Kapitel 3.1.2), obwohl eine erfolgreiche TetFC in Anwesenheit von prokaryotischem Zelllysate und prokaryotischer Total-RNA zuvor bereits gezeigt werden konnte.^[302] Als mögliche Ursache wurde eine unzureichende Verfügbarkeit der Ziel-RNA angenommen.

Einen möglichen Hinweis darauf, dass die Stabilität der RNA in *E. coli* verringert oder die RNA-abhängige Komplementierung im Vergleich zu anderen Organismen erschwert ist, liefert das MS2-System. Während in Hefe oder Säugerzellen lediglich 24 Kopien MCP-bindenden Aptamers notwendig waren um ein ausreichend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten,^[248, 348, 349] verwendeten Golding *et al.* 96 Kopien für die Visualisierung einzelner RNA-Moleküle in *E. coli*.^[240]

Um die Verfügbarkeit der Ziel-RNA *boxAB* zu erhöhen, wurde diese mit stabilisierenden Haarnadelstrukturen versehen (Abbildung 4.1C), oder ihre Produktion durch Verwendung eines zweiten Promotors von der der Proteinkomponenten entkoppelt (Abbildung 4.1D). Die *in vivo* Produktion der stabilisierten RNA konnte ebenfalls mittels Northern Blot nachgewiesen werden. Zudem zeigten *in vitro* Studien, dass das Anfügen der Haarnadelstrukturen am 5'- und 3'-Ende die TetFC nicht behinderten. Im Gegenteil: es wurden im Vergleich zu einem unstabilisierten Konstrukt bis zu dreifach höhere Fluoreszenzsignale detektiert, was auf eine verbesserte Stabilität der RNA, oder auf eine bessere Zugänglichkeit der Pumilio-Bindemotive hindeutet. Die Fähigkeit der Pum-HD, an Zielsequenzen zu binden, die innerhalb doppelsträngiger Bereiche liegen und diese auf diese Weise zu entwinden, wurde bereits von Kedde *et al.* und Filipovska *et al.* beschrieben.^[112, 130] In ihrer Studie detektierten Filipovska *et al.* lediglich eine signifikant verschlechterte Bindung an Sequenzen in vollständig doppelsträngig vorliegenden Bereichen.^[130] Da dies unter den verwendeten Bedingungen weder auf *boxAB* noch auf die mittels zweier stabilisierenden Haarnadelstrukturen verlängerte RNA *boxAB* (5F-*boxAB*-3F) zutreffen sollte, dürfte die Sekundärstruktur der Ziel-RNA keinen Einfluss auf die Bindung der Pumilio-Fusionsproteine haben. Zudem ist für die Bindung der Pum-HD keine bestimmte Struktur der Ziel-RNA notwendig. Eine Auswirkung der Länge des zwischen den beiden Pumilio-Bindemotiven liegenden Linkers auf die

Fluoreszenzkomplementierung wurde beschrieben.^[135, 302] Dieser Abstand ist jedoch für beide RNAs identisch (5 nt). Eine systematische Analyse der Auswirkungen von RNA-Sekundärstrukturen auf die TetFC ist bis *dato* jedoch noch nicht vorgenommen worden. Die durchflusszytometrische Analyse der RNA 5F-boxAB-3F produzierenden *E. coli* Zellen ergab, dass – trotz der verbesserten Komplementierung *in vitro* – kein Fluoreszenzsignal *in vivo* detektiert werden konnte (Kapitel 3.1.3). Einen möglichen Grund könnte eine zu hohe Temperatur während der Komplementierung *in vivo* darstellen. Bei einer Untersuchung zur Temperaturabhängigkeit der TetFC *in vitro* wurde beobachtet, dass die Komplementierung bei einer Temperatur von 10-30 °C erfolgreich verläuft, die erhaltenen Fluoreszenzsignale jedoch mit zunehmender Temperatur sinken.^[311] Bei höheren Temperaturen (37-42 °C) konnte hingegen kein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet werden.^[311] Dies ist in Einklang mit der Erwartung, dass die Bindung der Pum-HD an die 8 nt-Sequenz der RNA bei steigender Temperatur geschwächt ist. Diese Temperaturempfindlichkeit der TetFC könnte daher ein wichtiger Punkt bei der Etablierung von TetFC *in vivo* darstellen. Eine 12-stündige Inkubation der Zellen bei 8 °C nach rekombinanter Proteinproduktion bei 37 °C, oder eine durchgehende Inkubation bei 17 °C brachten jedoch ebenfalls keinen Erfolg (Kapitel 3.1.3). Dies spricht dafür, dass nicht die Temperatur, sondern weiterhin (trotz Stabilisierung der Ziel-RNA boxAB) die Verfügbarkeit der einzelnen Komponenten eine entscheidende Rolle spielt.

Zur gezielten Stabilisierung bestimmter RNAs kämen weitere Ansätze in Frage. Eine Möglichkeit wäre die Inkorporation von Zielsequenzen in stabile RNA-Konstrukte, wie beispielsweise anstelle der Anticodonschleife in tRNAs.^[350] Eine weitere Alternative wäre eine Steuerung der RNA Lokalisation, um einen verzögerten Abbau zu erreichen,^[351] oder eine zusätzliche Produktion von RNA Chaperonen.^[352]

Eine Alternative zur direkten und indirekten RNA-Stabilisierung stellt die zeitlich verzögerte Produktion der Ziel-RNA dar. Mit dem Ziel, die Produktion der Ziel-RNA zeitlich von der Produktion der TetFC-Proteine zu entkoppeln, wurde ein System eingesetzt, welches von Valencia-Burton *et al.* für eine Aptamer-abhängige Komplementierung von zwei GFP-Fragmenten entwickelt wurde (Abbildung 4.1D).^[321] Zur Induktion der RNA-Produktion wurden drei verschiedene Tetracyclin-Derivate getestet: Anhydrotetracyclin (ATC), Doxycyclin (DC) und Minocyclin (MC). Insbesondere nach der Zugabe von ATC konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz der Zellen mittels Durchflusszytometrie beobachtet werden (Kapitel 3.1.4). Dieser Effekt fiel bei denjenigen *E. coli* Zellen, die alle vier TetFC-Komponenten produzieren, stärker aus als bei

Kontrollzellen, denen das Plasmid zur Produktion der boxAB RNA fehlte. Aufgrund der starken Fluoreszenz von ATC ist es jedoch notwendig, eine unspezifische Fluoreszenzzunahme auszuschließen und die RNA-abhängige Zunahme der Fluoreszenz zu verifizieren. Aus diesem Grund wurden TetFC-Zellen, die alle vier TetFC-Komponenten produzieren, mit Kontrollzellen gemischt, denen das Plasmid zur Produktion der boxAB RNA fehlte. Anhand von fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) und anschließender Antibiotikaresistenz-Selektion konnte gezeigt werden, dass es sich bei bis zu 99 % der sortierten Zellen um die TetFC-Zellen handelte (Kapitel 3.1.4). Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass eine spätere, ATC-induzierte Produktion der Ziel-RNA der ausschlaggebende Punkt war, um eine ausreichend hohe Konzentration an boxAB zu erreichen und eine erfolgreiche Komplementierung von GFP in *E. coli* zu bewirken. Die Adaption des von Valencia-Burton entwickelten Systems^[321] und das daraus im Rahmen dieser Arbeit entwickelte System konnte daher als geeignete Strategie für die Etablierung von TetFC in *E. coli* identifiziert werden. Eine Adaption des Systems mit alternativen Induktoren, die keine Eigenfluoreszenz aufweisen (z.B. Arabinose), war aus diesem Grund nicht notwendig.

Für die Etablierung des Systems war neben einem geeigneten Expressionssystem auch die Wahl der Expressionsbedingungen von Bedeutung. *In vitro* Studien des TetFC-Systems hatten gezeigt, dass die Ausbildung des Fluoreszenzsignals mit zunehmender Anzahl der GFP-Fragmente mehr Zeit benötigt und ein maximales Fluoreszenzsignal bei TetFC nach 12-16 h erhalten wird.^[302] Obwohl *in vitro* bereits nach 10-20 min eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob eine Fluoreszenzkomplementierung stattgefunden hat,^[302] wäre es für ein TetFC-basiertes Screening in *E. coli* empfehlenswert ein maximales Fluoreszenzsignal in vergleichbarer Zeit zu erhalten. Um eine optimale GFP-Komplementierung zu erreichen war daher eine Inkubation der Zellen bei möglichst geringer Temperatur notwendig. Für zelluläre Anwendungen, wie die Analyse des Transports von RNAs, ist TetFC daher weniger geeignet; für das Screening von Pumilio-Varianten in *E. coli* mittels FACS stellt diese Voraussetzung jedoch kein Hindernis dar.

4.1.2 FACS-basiertes Screening von Pumilio-RNA-Interaktionen mittels TetFC in *E. coli*

Im Vergleich zu anderen Systemen, bei denen die RNA-vermittelte Komplementierung von zwei statt drei GFP-Fragmenten in *E. coli* mittels Durchflusszytometrie analysiert wurde, fiel die Fluoreszenzzunahme bei Verwendung des TetFC-Systems deutlich schwächer aus.^[249, 252, 321, 353] Einen Grund hierfür stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit die geringere Effizienz bei einer Komplementierung mit steigender Anzahl der beteiligten Komponenten dar. Zusätzlich sollte

erwähnt werden, dass Systeme mit lediglich zwei GFP-Fragmenten im Allgemeinen eine deutlich höhere unspezifische Fluoreszenzkomplementierung aufweisen.^[19, 293-295] So musste die Gruppe um Broude beispielsweise sowohl die Konzentration des Induktors IPTG senken, um weniger rekombinant produziertes Protein zu erhalten und auf diese Weise die unspezifische Komplementierung der einzelnen Fragmente zu verringern, damit bei der durchflusszytometrischen Analyse ein Unterschied zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle detektierbar war.^[249, 353] In der Studie von Valencia-Burton aus dem Jahre 2009 ist sowohl eine deutliche Zunahme der Ziel-RNA-Produktion, als auch die Zunahme der Fluoreszenz der Zellen nach ATC-Zugabe gezeigt.^[321] Ein Vergleich mit einer Negativkontrolle ohne Ziel-RNA fehlte jedoch.^[321]

Das TetFC-System zeichnet sich durch ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus (bis zu 70-fachen Signalanstieg).^[302] Das Einbüßen von Fluoreszenzintensität aufgrund des geringeren Anteils komplementierter GFP-Moleküle im Vergleich zu einem System mit lediglich zwei GFP-Fragmenten steht daher einer Verringerung der falsch-positiven Signale aufgrund von unspezifischer GFP-Komplementierung gegenüber. Es werden somit insgesamt weniger positive, aber dafür verlässlichere Signale erhalten. Zur Identifikation von Pumilio-Varianten die *in vivo* an bestimmte Ziel-RNAs binden und so ein Fluoreszenzsignal auslösen, stellt ein geringeres (detektierbares) Fluoreszenzsignal somit kein Hindernis dar, solange eine ausreichende Anzahl von Zellen analysiert wird. Eine Methode anhand derer dies realisiert werden kann, ist die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung. FACS ermöglicht die Analyse von Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz und gegebenenfalls die direkte Sortierung der Zellen. Je nach Flussrate kann ein Durchsatz von mehreren Tausend Zellen innerhalb weniger Sekunden bis Minuten erreicht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TetFC-Zellen in nur einer Screening-Runde mit einer Genauigkeit von bis zu 99 % aus dem Gemisch mit einer Kontrolle ohne Ziel-RNA mittels FACS isoliert werden konnten. Bei Verwendung von Zellen, die anstelle von keiner Ziel-RNA eine RNA mit zwei oder drei veränderten Nukleotiden produzierten, lag dieser Anteil bei maximal 77-92 %. (Kapitel 3.1.4). Dieser Wert lag erwartungsgemäß unter demjenigen Wert, der bei einem Gemisch mit Zellen ohne Ziel-RNA erhalten wurde. Auffällig ist jedoch, dass bei Verwendung der RNA boxG (5'-UUUAUAUA-3'), welche sich in lediglich einer Position von boxA (5'-UGUAUAUA-3') unterscheidet, ein höherer Anteil positiver Kolonien nach der FACS erhalten wurde, als bei Verwendung von boxC (5'-CCCAUAUA-3'). Unter Berücksichtigung der Affinität von S10-WT für die

entsprechenden Bindemotive ($K_D(\text{WT, boxA}) = 0.48 \pm 0.21 \text{ nM}$,^[129] im Vergleich zu $K_D(\text{WT, boxG}) = 59 \pm 12 \text{ nM}$,^[129] und $K_D(\text{WT, boxC})$ nicht bestimmbar^[311]) umgekehrte Effekt erwartet worden (die erschwerte Trennung der TetFC-Zellen und den Zellen, die boxG produzieren). Die erhaltenen Daten sind möglicherweise dem experimentellen Design der Selektion geschuldet. Da sowohl die TetFC- als auch die Kontrollzellen in diesem Fall (mit Ausnahme von *boxA/boxG/boxC*) jeweils die gleichen Plasmide enthielten, konnte nicht anhand einer unterschiedlichen Antibiotika-Resistenz selektiert werden. Stattdessen wurden die positiven Kolonien mittels PCR identifiziert, ein Verfahren, bei dem weitaus weniger Proben getestet werden konnten. Dies hatte wahrscheinlich eine höhere Schwankung der Werte zur Folge. Zusätzlich werden bei Hochdurchsatz-Screenings zur Evolution von Proteinen üblicherweise mehrere Screening-Runden durchgeführt. Dieser Vorgang, und ein größerer Stichprobenumfang, wären daher für eine zukünftige Anwendung der Methode zur Selektion von Pumilio-Varianten empfehlenswert. Eine weitere Möglichkeit für die erhaltenen Daten wäre die Sekundärstruktur der RNA, die (wie bereits in 4.1.1 diskutiert) in diesem Fall jedoch ebenfalls keine Auswirkung auf die Fluoreszenzkomplementierung haben sollte, da Pum-HD unabhängig von eventuellen Sekundärstrukturen bindet und der Abstand zwischen den beiden Pumilio-Bindemotiven in den unterschiedlichen Ziel-RNAs identisch ist. Eine dritte Möglichkeit wäre eine unspezifische Interaktion der Pumilio-Varianten (oder der Ziel-RNAs), mit weiteren RNAs *in vivo*, welche die Ziel-RNA-Pumilio-Interaktion beeinträchtigt.

Die schwache Bindung verschiedener Pumilio-Varianten an nicht Ziel-RNAs ist von unterschiedlichen Gruppen beschrieben worden.^[129, 153] Diese Promiskuität ist in bestimmten PUF-Repeats der Pum-HD stärker ausgeprägt als in anderen, was unter anderem durch unterschiedliche RNA-Konformationen bewirkt wird.^[42, 57, 129] Bereits erste Studien mit verschiedenen Pumilio-Varianten zeigten, dass diese neben der spezifischen Bindung an ihre Ziel-RNA auch noch eine (wenn auch geringere) Affinität gegenüber RNA-Sequenzen hatten, die sich lediglich in einem Nukleotid unterschieden. So weist die WT Pum-HD beispielsweise eine Dissoziationskonstante K_D von $0.48 \pm 0.21 \text{ nM}$ gegenüber der RNA boxA (UGUAUAUA) auf, während der Wert gegenüber den RNAs G2U (UUUAUAUA) $59 \pm 12 \text{ nM}$, G2A (UAUAUAUA) $16 \pm 3.9 \text{ nM}$, A6G (UGUAUGUA) 0.72 ± 0.11 , A6U (UGUAUUUA) 8.0 ± 3.1 und A8G (UGUAUAUG) 1.6 ± 0.15 beträgt.^[129] In Übereinstimmung mit diesen Daten stellten Adamala *et al.* fest, dass noch eine spezifische Bindung bei einem veränderten Nukleotid erhalten wird, während bei zwei veränderten Nukleotiden bereits eine deutliche verringerte Bindung, und bei drei oder mehr veränderten Nukleotiden kein spezifisches Signal mehr

detektiert werden konnte.^[292] Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass in den von Adamala *et al.* getesteten RNA-Sequenzen mit Ausnahme der RNAs, bei denen alle 8 Nukleotide verändert wurden, lediglich die Nucleobasen am 3'-Ende des Bindemotivs und somit von den am N-Terminus lokalisierten PUF-Repeats R1-3 erkannten Nucleobasen ausgetauscht wurden.^[292] Eine geringere Auswirkung auf die Affinität zwischen Protein und RNA bei Veränderungen am 3'-Ende der RNA waren zuvor bereits beschrieben worden.^[129]

Zudem wurde in der kürzlich von Adamala *et al.* veröffentlichten Studie die Bindung von Pumilio an verschiedene Ziel-RNAs mit unterschiedlichen Nukleotiden vor und nach dem 8 nt-Bindemotiv untersucht.^[292] Hierbei stellte sich heraus, dass diese die Bindeeffizienz der Pumilio-Variante beeinflussten.^[292] Die Autoren postulierten, dass die Sequenz der restlichen RNA und somit die Sekundärstruktur der RNA einen Einfluss auf die Bindung der Pum-HD hat.^[292] Insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen alternativen Binde-Modi wäre es jedoch auch denkbar, dass die RNA-Sequenz selbst, und nicht die Struktur der RNA, eine entscheidende Rolle spielt. Studien von Koh *et al.* und Campbell *et al.* belegen, dass nicht nur die beiden Aminosäuren, die anhand von Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräften mit der Watson-Crick-Kante für die sequenzspezifischen Erkennung der Nucleobase essentiell sind, sondern auch die dritte Aminosäure zur spezifischen Erkennung beiträgt, obwohl ihr zunächst nur eine affinitätssteigernde Rolle zugeschrieben worden war.^[42, 354] Entsprechend führte der Austausch einzelner Aminosäuren nicht nur zu einer Spezifitätsänderung an der entsprechenden Position, sondern auch zu einer Spezifitätsänderung für die benachbarten Nucleobasen.^[42] Dies ist ein weiterer für das Design von Pumilio-Varianten relevanter Punkt.

Zusätzlich zur geringfügigen Promiskuität innerhalb des allgemeinen Pumilio-Bindecodes spielen weitere Faktoren eine wichtige Rolle beim Screening von Pumilio-Varianten – insbesondere bei zunehmender Anzahl von Aminosäuresubstitutionen. Je mehr sich einzelne Pumilio-Varianten von der WT Pum-HD unterscheiden, desto größer werden vermutlich weitere Effekte, wie eine geringere Löslichkeit, oder das Auftreten von alternativen Binde-Modi, ins Gewicht fallen. Dabei müssen alternative Binde-Modi keineswegs einen Nachteil darstellen. So kann beispielsweise die zusätzliche Erkennung von Cytosin in Position -2 zu dem eigentlichen Pumilio-Bindemotiv eine Erweiterung der Spezifität bedeuten.^[119, 126] Ein Wegdrehen einzelner Nucleobasen vom Protein, wie es für unterschiedliche PUF-Proteine beobachtet wurde,^[91, 124, 145, 146, 355] würde jedoch eine

verringerte Spezifität bedeuten. Eine Beeinträchtigung der Löslichkeit von Pum-HD-Varianten ist bereits von Abil *et al.* beschrieben^[153] und auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet worden.

Auch wenn der Pumilio-Bindecode eine nützliche Basis zur Vorhersage von Ziel-Sequenzen und zur Generierung neuer Pum-Varianten ist,^[39-42, 90, 129, 131, 133-135] so ist das Protein-Design aufgrund möglicher alternativer Binde-Modi komplexer als zunächst angenommen. Dies verdeutlicht, dass zusätzlich zum rationalen Design eine individuelle Optimierung der entsprechenden Pumilio-Varianten von hoher Wichtigkeit zu sein scheint. Ein FACS-basiertes Screening könnte hierbei die Identifizierung potentieller Varianten erleichtern.

Ein weiterer Faktor, der die Notwendigkeit einer Hochdurchsatz-Methode unterstreicht, ist die zunehmende Verfügbarkeit von Bibliotheken zur Generierung verschiedenster PUF-Varianten und die Erweiterung des Bindecodes durch den Vergleich verschiedenster natürlicher PUF-Proteine.^[42, 153, 292]

Die Modul-basierte Klonierung von Pumilio-Konstrukten (Zusammenfügen bestimmter PUF-Repeats) erleichtert die Generierung verschiedener Varianten mit größerer Anzahl von Aminosäuresubstitutionen enorm und ist erstmals von Abil *et al.* beschrieben worden.^[153] Ein ähnliches System zur Generierung von Proteinen, welche RNA sequenzspezifisch binden, wurde erst kürzlich von Adamala *et al.* entwickelt. Anders als bei der von Abil *et al.* beschriebenen Golden-Gate-Klonierungsmethode (Kapitel 1.2.5) generierten sie jedoch lediglich vier verschiedene Module zur Erkennung der vier verschiedenen RNA-Basen.^[292] Als Ausgangskonstrukt verwendeten sie hierbei PUF-Repeat 6 und kombinierten die einzelnen Module zu den gewünschten, als Pumby-Varianten (von *Pumilio-based assembly*) bezeichneten Proteinen.^[292] Im Unterschied hierzu behielten Abil *et al.* die acht ursprünglichen PUF-Repeats bei und verwendeten lediglich die entsprechenden Aminosäuresubstitutionen für die unterschiedliche Sequenzspezifität.^[153] Die Pumby-Varianten zeigten im direkten Vergleich mit den entsprechenden Pum-HD-basierten Varianten eine leicht erhöhte Affinität gegenüber ihren Ziel-RNAs auf.^[292]

Das neue System von Adamala *et al.* zeichnet sich aufgrund der 1-PUF-Repeat-Struktur zudem durch eine größere Flexibilität aus. Im Unterschied zur Klonierungsmethode von Abil *et al.*^[153] erlaubt diese Methode die Generierung von Varianten, die mehr oder weniger als die acht PUF-Repeats der klassischen Pum-HD enthalten.^[292] Für die TetFC wurde eine optimale Linkerlänge von 5 nt zwischen den beiden Pumilio-Bindemotiven bestimmt.^[302] Ist es aus bestimmten Gründen (z. B. bei zwei ähnlichen Sequenzen in diesem Abstand) vorteilhaft zwei Sequenzen einer Ziel-RNA zu

wählen, die etwas weiter auseinander liegen, könnten dementsprechend ein oder zwei der Pumilio-Varianten in ihrer Anzahl der PUF-Repeats angepasst werden, um den optimalen Linkerabstand zu erhalten. Allerdings sollte hierbei beachtet werden, dass bei einer Zunahme der Zahl an PUF-Repeats einzelne nicht erkannte Nucleobasen einen geringeren Einfluss auf die Spezifität der Protein-RNA-Bindung haben sollten, als es bei kürzeren Pum-Varianten der Fall ist. Filipovska *et al.* beschrieben bereits 2011 eine Verlängerung von acht auf sechzehn PUF-Repeats.^[130] Die Autoren argumentierten, dass eine Verlängerung der Pum-HD zur Bindung von entsprechend längeren RNA-Sequenzen in eukaryotischen Systemen, aufgrund des komplexeren Transkriptoms im Vergleich zu prokaryotischen Systemen, vorteilhaft wäre.^[130] Sie postulierten aufgrund der Verlängerung des Bindemotivs eine höhere Spezifität für bestimmte Ziel-RNAs und generierten ein Konstrukt mit zusätzlichen acht PUF-Repeats zwischen Repeat 5 und 6.^[130] Im Vergleich zu dem entsprechenden 8-Repeat-Konstrukt wies das Konstrukt mit den 16 Repeats eine höhere Affinität gegenüber der entsprechenden Ziel-RNA auf.^[130] Die Auswirkungen einzelner veränderter Nukleotide wurden jedoch nicht analysiert.^[130] Lediglich der bereits zuvor beschriebene Austausch von UGU zu CCC führte zu einer drastischen Verschlechterung der Bindung.^[130] Die von Adamala *et al.* generierten Pumby-Varianten mit bis zu 18 Modulen wurden zwar hinsichtlich ihrer Bindung an nicht-Ziel-RNA analysiert, es wurden jedoch RNAs verwendet, die an jeder der entsprechenden Positionen verändert worden waren.^[292] Eine systematische Studie zum Einfluss einzelner oder mehrerer veränderter Nucleobasen auf Pum-Varianten mit mehr als acht Modulen steht daher noch aus. Ein Hochdurchsatz-Screening könnte trotz all der genannten Implikationen vergleichsweise schnell die geeignete Pumilio-Variante für eine bestimmte Ziel-RNA liefern.

Im Detail könnte ein FACS-basiertes Screening von Pumilio-Varianten folgendermaßen aussehen: *E. coli* Zellen, die bereits die Plasmide pSJK11 (zur Produktion von dem Detektor-Molekül GFP1-9) und pSJKX (zur Produktion einer beliebigen Ziel-RNA tragen), werden mit einem dritten Plasmid transformiert. Dieses enthält zusätzlich zu *s10-wt* oder *var1-s11* die DNA-Bibliothek zur Produktion verschiedener Pumilio-Varianten (fusioniert an GFP-Faltblatt S11 oder S10, Abbildung 4.2). Hierbei können als Ausgangsprotein sowohl die klassische Pum-HD, weitere Mitglieder der PUF-Familie, oder, wie von Adamala *et al.* beschrieben, synthetische Proteine fungieren.^[292] Die Art der Mutagenese-Methode zur Herstellung der Bibliothek hängt dabei sowohl von dem Ausgangsprotein als auch von der erwarteten Variante ab. Je mehr sich die Sequenz der Ziel-RNA von natürlichen

Ziel-RNAs unterscheidet und somit Protein-Varianten erwartet werden, die sich in mehreren Aminosäurepositionen von natürlichen Varianten unterscheiden, desto eher wird zusätzlich zu einem rationalen Design auch eine Zufallsmutagenese notwendig sein. Bislang erfolgte die Generierung von Pumilio-Varianten hauptsächlich durch Substitution einzelner Aminosäuren basierend auf dem Bindecode oder der Kombination von einzelnen PUF-Repeats.^[39-42, 90, 129, 131, 133-135, 153, 292] Ein zusätzliches Screening an weiteren Positionen zur Verbesserung der mittels rationalen Designs erhaltenen Varianten wurde hingegen nicht beschrieben. Das von Abil *et al.* beschriebene Löslichkeitsproblem^[153] oder die Verringerung der Spezifität der Varianten mit zunehmender Anzahl substituierter RNA-bindender Aminosäuren könnten möglicherweise durch zusätzliche Mutagenese der nicht an der RNA-Bindung beteiligten Aminosäuren verringert oder ganz behoben werden.

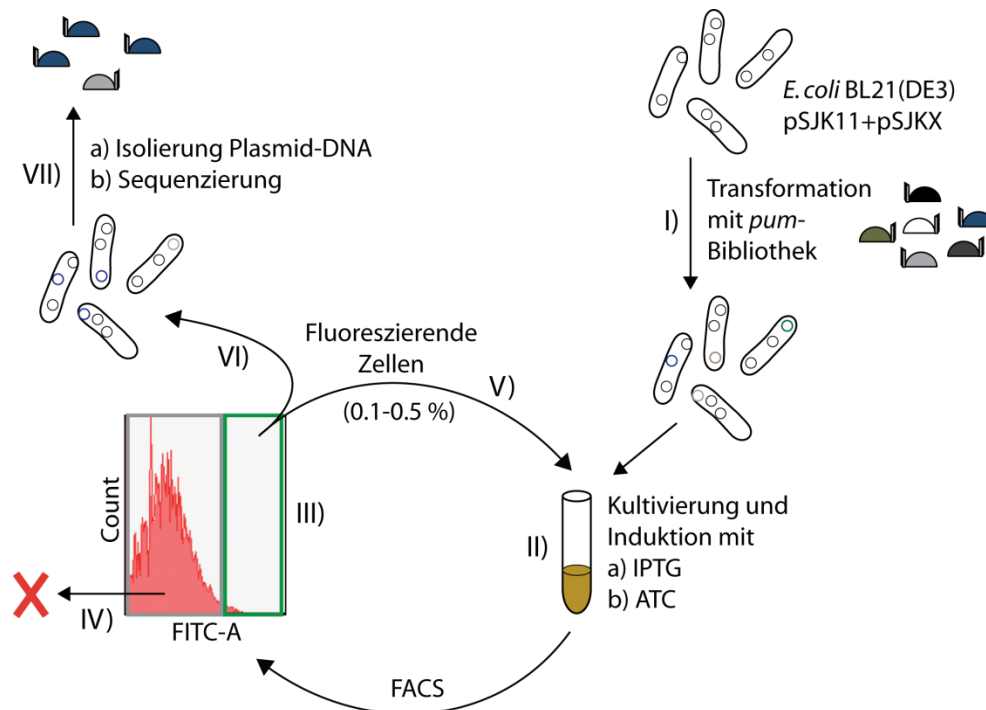


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung eines FACS-basierten Screenings von Pumilio-Varianten mittels TetFC in *E. coli*. I) *E. coli* BL21(DE3) Zellen, welche Plasmid pSJK11 zur Produktion von Reporter GFP1-9 sowie Plasmid pSJKX zur Produktion einer bestimmten Ziel-RNA tragen, werden mit einem dritten Plasmid transformiert. Dieses enthält neben der *pum*-Bibliothek (*s10-pum*, oder *pum-s11*) die genetische Information für das entsprechende zweite Pumilio-Fusionsprotein. II) Die Zellen werden kultiviert und a) zunächst die Proteinproduktion mittels IPTG induziert. b) Im Anschluss erfolgt die Produktion der Ziel-RNA durch ATC-Zugabe. III) Die Zellen werden durchflusszytometrisch hinsichtlich grüner Fluoreszenz (FITC-A) analysiert und V) diejenigen Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität (0.1-0.5 %) gesammelt und IV) der Rest verworfen. Die Schritte II)-V) werden beliebig wiederholt und VI) schließlich die Plasmid-DNA der angereicherten Klone VII) isoliert und sequenziert. Die DNA-Bibliothek der Pumilio-Fusionskonstrukte ist der Übersicht halber *in vitro* schematisch als entsprechende Protein-Varianten (Halbkreise) und in *E. coli* Zellen als Plasmide (farbige Ringe) dargestellt.

Zu beachten ist, dass die Größe der Bibliothek durch die Transformationseffizienz der Zellen begrenzt ist, welche erfahrungsgemäß geringer ausfällt, wenn die Zellen bereits zusätzliche Plasmide tragen. Hierbei wäre eine Optimierung des Transformationsprotokolls ein wichtiger Schritt um das Potenzial des anschließenden Hochdurchsatz-Screenings durch Erreichen der benötigten Diversität (abhängig von der Bibliotheksgröße) voll ausschöpfen zu können. Weiterhin ist sicherzustellen, dass bei der Transformation der Zellen mit der Bibliothek (dem dritten Plasmid) jeweils nur ein Plasmid pro Zelle aufgenommen wird, da es ansonsten zur Kombination verschiedener Pumilio-Varianten kommen kann, was die Identifikation geeigneter Pumilio-Varianten erschweren würde.

Nach rekombinanter Produktion der Proteine sowie der zeitlich versetzten Produktion der Ziel-RNA mittels IPTG und ATC werden die Zellen anhand von FACS sortiert. Diejenigen Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität werden isoliert und für eine weitere Screening-Runde eingesetzt. Die Anzahl der Screening-Runden sollte in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der Zellen, den FACS-Bedingungen und/oder der Diversität der Bibliothek gewählt werden. Die Fluoreszenzintensität der Zellen sollte aufgrund der Anreicherung von Zellen, die geeignete Pumilio-Varianten produzieren, mit steigender Rundenzahl zunehmen. Schließlich wird die Plasmid-DNA derjenigen Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität isoliert und sequenziert. Nach dem Screening sollte eine Validierung der spezifischen Protein-RNA-Interaktion und die Bestimmung der Bindungsaffinität *in vitro* erfolgen. Hierbei bieten sich etablierte Methoden wie der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) oder neuere Methoden wie die Mikro-Thermophorese, welche ohne die Verwendung radioaktiv markierter RNA auskommt, an.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten darauf hinweisen, dass das TetFC-basierte System eine ausreichend hohe Sensitivität besitzt, um geeignete Pumilio-Varianten mittels FACS zu identifizieren, die Limitierung jedoch durch die Transformation der Zellen mit der entsprechenden Bibliothek gegeben ist. Im Falle einer Bibliothek, die auch nach Optimierung der Transformationsbedingungen nicht optimal für eine Verwendung in *E. coli* ist, könnte die Verwendung einer *in vitro* Evolutionsmethode in Betracht gezogen werden, welche beispielsweise zur Identifikation von DNA- oder RNA-bindenden Zinkfingerproteinen eingesetzt wurde.^[356, 357] Die Eignung einer zellfreien Evolutionsmethode für die mitunter wenig löslichen Pumilio-Proteine müsste jedoch analysiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zum Screening von Pumilio-Varianten mittels TetFC und FACS ist jedoch nicht nur auf die Pum-HD oder auf die Familie der PUF-Proteine beschränkt. Ebenso wäre eine Ausweitung des Systems auf die Familie der PPR-Proteine denkbar, da diese, ähnlich wie die PUF-Proteine, einer 1:1 Interaktion zwischen Nucleobase und PPR-Repeat folgen.^[140-142]

Im menschlichen Genom sind sieben Gene, die für PPR-Proteine codieren, bekannt.^[358] In Pflanzen ist hingegen mit bis zu 400 identifizierten Genen eine weitaus größere Anzahl von PPR-Proteinen vorhanden.^[358] Ähnlich wie die PUF-Proteine enthalten die PPRs jeweils zwei bis dreißig konservierte Motive, von denen jeweils zwei definierte Aminosäuren für die sequenzspezifische Erkennung einer Nucleobase verantwortlich sind.^[139-142, 359, 360] Analog zu den Arbeiten von Campbell *et al.* und Adamala *et al.*, die eine Vielzahl natürlicher PUF-Proteine zur Generierung der universeller PUF-Repeats heranzogen,^[42, 292] konstruierten Coquille *et al.* synthetische PPR-Domänen basierend auf der Konsensussequenz von knapp 24000 PPR-Proteinen.^[52] Bislang wurden jedoch nur wenige PPR-Varianten generiert und keinerlei Anwendungen beschrieben, bei denen PPR-Proteine als Basis für Designer-Proteine verwendet wurden.^[52, 140, 143] Ein Hochdurchsatz-Screening könnte auch in diesem Bereich dazu beitragen, geeignete Varianten für die RNA-Detektion zu identifizieren.

4.1.3 Erweiterung von TetFC *in vitro* durch Split-YFP

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Erweiterung der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung auf ein duales System, welches die Detektion zweier Ziel-RNAs anhand unterschiedlicher Fluoreszenzsignale ermöglicht. Zu den Vorteilen bereits etablierter Systeme zählen vor allem ein einfaches Design und eine hohe Sensitivität, während die Notwendigkeit zur vorangegangenen RNA-Modifizierung oder die Transformation/Transfektion der Zellen dagegen nachteilig für bestimmte Anwendungen ist (Kapitel 1.3). Ein System zur dualen Detektion von RNA basierend auf RNA-bindenden Proteinen hätte hingegen den Vorteil der genetischen Codierbarkeit.

Mit dem Ziel, die duale TetFC zunächst als eine duale RNA-Detektionsmethode *in vitro* zu etablieren, wurde eine einzelne Aminosäuresubstitution in einem der drei Fragmente des Split-GFPs vorgenommen. Der Austausch von Threonin zu Tyrosin an Position 203 (T203Y) des GFP führt bekanntermaßen zu einem bathochromen Effekt, der das eigentlich grün fluoreszierende Protein grün-gelb fluoreszieren lässt.^[273, 279] Für das TetFC-System stellt Position 203 zudem eine geeignete

Position dar, da sich die entsprechende Aminosäure in β -Faltblatt S10 des GFP befindet. Durch Fusionierung der S10-Varianten mit unterschiedlichen Pumilio-Varianten könnten so verschiedene Fusionsproteine generiert werden, anhand derer die Detektion unterschiedlicher Ziel-RNAs mittels grünem oder gelbem Fluoreszenzsignal ermöglicht wird.

Erste Experimente mit GFP-Varianten, bei denen sich entweder Threonin oder Tyrosin an Position 203 befanden, und welche zusätzlich 22 Aminosäuresubstitutionen für das Split-GFP-System trugen, zeigten eine Differenz im Anregungsmaximum von 26 nm, während das Emissionsmaximum um 14 nm verschoben wurde (Kapitel 3.2.1). Unter Verwendung geeigneter Messinstrumente (mit einer Bandbreite von ≤ 7 nm) stellt dies einen ausreichenden großen Unterschied zur Trennung der Signale dar. Zu beachten ist jedoch, dass die Fluoreszenzintensität der grün fluoreszierenden Variante die der gelb fluoreszierenden Variante um einen Faktor von 15 übertraf. Da die Fluoreszenz nicht nur auf einen diskreten Wert beschränkt ist, sondern ein Emissionsspektrum vorliegt, weist GFP zusätzlich eine vergleichsweise geringfügige Fluoreszenz im gelben Wellenlängenbereich auf. In Kombination mit der stärkeren Fluoreszenzintensität der des GFP im Vergleich zur gelb fluoreszierenden Variante war daher eine Bestimmung der absoluten Werte in diesem Fall nicht zielführend. Stattdessen wurde jeweils für beide Varianten die grüne und die gelbe Fluoreszenzintensität ermittelt und anhand des Verhältnisses bestimmt, ob ein grünes oder ein gelbes Fluoreszenzsignal vorlag.

Die Fusionierung der entsprechenden S10- oder S10(Y)-Faltblätter an zwei verschiedene Pumilio-Varianten ermöglichte erwartungsgemäß die Detektion der entsprechenden Ziel-RNAs jeweils mittels grüner oder gelber Fluoreszenz (Kapitel 3.2.3). Die minimale RNA-Konzentration des dualen Systems betrug 16 nM RNA in Anwesenheit eines Überschusses der Proteinkomponenten, und 31 nM RNA mit äquimolarer Konzentration der Pumilio-Fusionsproteine. In beiden Fällen war ein Überschuss des Detektor-Moleküls GFP1-9 gegeben (Kapitel 3.2.4). Die Intensität der gelben Fluoreszenz war hierbei entscheidend für die Sensitivität des Systems. Es wäre zu erwarten, dass eine Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der Split-YFP-Variante (beispielsweise durch Verwendung von Aminosäuresubstitutionen, die bekanntermaßen die Helligkeit des YFPs verbessern) demnach die allgemeine Sensitivität des dualen TetFC-Systems weiter erhöhen würde. Die Spezifität des Systems in Anwesenheit von Ziel-RNA im Vergleich zu nicht-Ziel-RNA, der gleichzeitigen Anwesenheit beider RNAs, oder in Anwesenheit eines Überschusses an nicht-Ziel-RNA, war hoch (Kapitel 3.2.5). Einzig die Komplementierung in Anwesenheit von mehr als einer S10-

Pumilio-Variante bereitete teilweise Schwierigkeiten. So konnte die sequenzspezifische Komplementierung unter Verwendung von boxAB und zwei verschiedenen Pumilio-Varianten durchgeführt werden, während ein analoges Experiment mit boxLB keine eindeutigen Ergebnisse lieferte (Kapitel 3.2.5). Grund hierfür ist aller Wahrscheinlichkeit nach die bereits in Kapitel 4.1.2 diskutierte Promiskuität der Pum-HD-Varianten. Die Wahl geeigneter RNA-Sequenzen und der entsprechenden Pumilio-Varianten ist daher für eine duale Detektion essentiell. Bestenfalls sollte bereits vor einer Verwendung des Systems bekannt sein, mit welcher Affinität die einzelnen Varianten an ihre Ziel-Sequenzen und die entsprechenden nicht-Ziel-RNAs binden. Im Idealfall würde die Bindung an die Ziel-Sequenzen gleich stark erfolgen, und beide Proteinvarianten würden jeweils keine Affinität zur nicht-Ziel-RNA aufweisen.

Die Überprüfung der parallelen Komplementierung von Split-GFP und Split-YFP war nicht erfolgreich (Kapitel 3.2.6). Um eine Trennung der Signale erreichen zu können, war jeweils eine der beiden RNAs mit Biotin modifiziert worden. Anhand der Biotin-Streptavidin-Interaktion sollte anschließend entweder das rekonstituierte GFP oder YFP aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Der Misserfolg dieses Experiments bedeutet jedoch nicht, dass eine spezifische und parallele Detektion zweier RNAs in Anwesenheit sämtlicher Komponenten unmöglich ist. Vielmehr zeigte dieses Experiment, dass die Isolierung des RNA-Protein-Komplexes nicht gelang. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der Anteil der am rekonstituierten Protein gebundenen biotinylierten RNA relativ gering war und die Bindestellen des Streptavidins hauptsächlich mit ungebundener biotinylierter RNA belegt waren. Es wurde versucht, die RNA anhand von Crosslinking mit den Pumilio-Fusionsproteinen zu verknüpfen; allerdings ist dies nur möglich für diejenigen RNA-Moleküle, die in dem entsprechenden Moment tatsächlich an die Pumilio-Varianten gebunden vorlagen. Aufgrund der starken Interaktion zwischen der Pum-HD und dem Pumilio-Bindemotiv ist eine längerfristige Bindung gut möglich. Es wäre allerdings genauso gut möglich, dass die RNA lediglich als Fundament zur Rekonstitution der Split-Proteine dient und sich schnell wieder von diesem löst. Letzteres steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Rekonstitution des dreiteiligen Split-Systems deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt, als ein System mit lediglich zwei GFP-Fragmenten. Solange die RNA zur Komplementierung aller Komponenten benötigt wird, und sie sich in einem ständigen Wechsel zwischen gebundener und ungebundener Form befindet, sinkt die Wahrscheinlichkeit drastisch, dass sich alle vier Komponenten (RNA, S10-WT, Var1-S11 und GFP1-9) gleichzeitig an demselben Ort befinden und GFP rekonstituieren kann.

Eine über die duale Anwendung hinausreichende Anwendung als Multiplex-Methode zum Nachweis von mehr als zwei verschiedenen RNAs ist für das TetFC-System eher unwahrscheinlich. Zum einen wird es mit zunehmender Anzahl der Ziel-RNAs schwieriger geeignete Pumilio-Varianten zu finden, die mit ähnlicher Affinität an ihre Ziel-Sequenzen binden und dabei eine möglichst geringe Affinität gegenüber anderen oder ähnlichen Sequenzen aufweisen. Zum anderen gestaltet sich die Veränderung des Fluoreszenzsignals bei einem dreiteiligen Split-System deutlich schwieriger als bei einem zweiteiligen System. Für die BiFC wurde zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen eine Kombination von verschiedenen GFP/YFP/CFP- und BFP-Fragmenten realisiert und führte zu insgesamt sieben verschiedenen Emissionsspektren.^[361] Insbesondere für cyan oder blau fluoreszierende Varianten des GFPs ist jedoch eine Substitution der das Chromophor-bildende Aminosäuren notwendig. Diese befinden sich in einem helikalen Bereich zwischen den β -Faltblättern S3 und S4. Für das TetFC-System wäre es allerdings notwendig, dass sich diejenigen Aminosäuren, die die Fluoreszenz des rekonstituierten Proteins verändern, in einem der β -Faltblätter befinden, die an die Pumilio-Varianten fusioniert sind. Dies sind üblicherweise die β -Faltblätter S10 und S11.^[302] Eine veränderte Fragmentierung des Proteins, sodass anstelle von S10 und S11 zwei andere GFP- β -Faltblätter an die Pumilio-Varianten fusioniert sind, wäre grundsätzlich vorstellbar, würde jedoch eine erneute Optimierung des Split-Systems bedeuten.

Die erfolgreiche Etablierung von TetFC in *E. coli* (Kapitel 3.1) und die Komplementierung von Split-GFP und Split-YFP in HeLa Zelllysate (Kapitel 3.2.3) sind wichtige Hinweise darauf, dass eine Anwendung des dualen TetFC-Systems *in vivo* generell möglich wäre. Die Verwendung, beispielweise zur dualen Analyse der Lokalisation zweier RNAs, setzt jedoch eine Reihe von Optimierungen voraus, die entweder die Pumilio-RNA-Interaktion, oder die Fluoreszenzeigenschaften des rekonstituierten Proteins betreffen.

Die bereits erwähnte Wahl geeigneter Pumilio-Varianten könnte beispielweise durch die Erhöhung der Spezifität erreicht werden. Hierbei bieten sich die in Kapitel 4.1.2 diskutierten Möglichkeiten, wie die Verlängerung der erkannten RNA-Sequenz durch zusätzliche PUF-Repeats, oder die Verwendung artifizieller PUF-Repeats mit verbesserten Bindungseigenschaften, an.^[42, 292] Eine weitere Möglichkeit wäre ein kombiniertes System mit jeweils einer Variante der Pum-HD und einem PPR-Protein. Obwohl für beide Proteine ein Bindecode definiert wurde und sie beide generell so modifiziert werden können, dass sie jede beliebige 8 nt-Sequenz (oder längere Sequenzen) binden können, weisen vor allem die PUF-Proteine eine bevorzugte Ziel-Sequenz auf. Durch

geschickte Verwendung zweier verschiedener RNA-bindender Proteine könnte möglicherweise die Promiskuität für die entsprechende nicht-Ziel-RNA verringert werden.

Eine Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften des rekonstituierten Split-YFP ist insofern notwendig, als dass zu erwarten ist, dass der Hintergrund im zellulären Kontext steigt und eine eindeutige Detektion der gelben Fluoreszenz erschwert ist. Es wurde eine Vielzahl von YFP-Varianten beschrieben, die in ihrer Stabilität, ihren Fluoreszenzeigenschaft, oder ihrer Sensitivität auf beispielsweise den pH-Wert oder Chlorid-Ionen verbessert wurden.^[291, 362-364] Im Vergleich zu dem häufig verwendeten eGFP besitzen viele gelb fluoreszierende Varianten eine stärkere Helligkeit, sind allerdings deutlich weniger photostabil.^[291] Der direkte Vergleich von GFP-Varianten mit Varianten, die lediglich die Aminosäuresubstitution T203Y und keine weiteren Aminosäuresubstitutionen enthalten, ist in der Literatur nicht systematisch beschrieben. Die GFP-Variante S65T T203Y besitzt beispielsweise einen Extinktionskoeffizienten, der weniger als die Hälfte des Koeffizienten der entsprechenden Variante ohne T203Y beträgt.^[273] Eine Angabe über entsprechenden Werte zur Quantenausbeute fehlen jedoch,^[273] sodass keine endgültige Aussage über die Fluoreszenzintensitäten gemacht werden kann. Gleiches gilt für den Vergleich zwischen *superfolder* GFP (sfGFP, Basis für das dreiteilige Split-GFP-System)^[301, 303] und der entsprechenden YFP-Variante mit T203Y. Hier berichteten Pédelacq *et al.* lediglich, dass beide Varianten als Fusionspartner mit schlecht faltendem Ferritin zu stark fluoreszierenden *E. coli* Kolonien führten.^[303] Bei der Evolution der YFP-Varianten dienten bislang vollständige Proteine, und nicht das dreiteilige Split-System, als Basis. Die Verwendung zusätzlicher YFP-verbessernder Aminosäuresubstitutionen, die nicht für das duale Split-GFP/YFP-System übernommen wurden, könnte daher eine geeignete Möglichkeit zur Verbesserung der Split-YFP-Fluoreszenz darstellen. Insbesondere Aminosäuresubstitutionen der Varianten Venus^[365] oder Citrine^[363] könnten hierbei von Interesse sein, da sie im Vergleich zu eYFP eine bessere Effizienz im BiFC-System aufweisen.^[366] Es müsste jedoch getestet werden, wie sich zusätzliche Aminosäuresubstitutionen auf die Rekonstitution des GFP auswirken.

Die für das duale TetFC-System verwendeten autofluoreszierenden Proteine weisen definierte Absorptions- beziehungsweise Emissionsmaxima auf, die sich jedoch im Unterschied zu anderen Kombinationen fluoreszierender Proteine in einem ähnlichen Größenbereich befinden. Dies bedeutet die teilweise Überlappung der einzelnen Emissionsspektren. Optimal wären Fluoreszenzsignale, die weiter auseinander liegen. Etablierte Systeme wie die FRET-basierte Analyse

von Protein-Protein-Interaktionen verwenden häufig eine Kombination aus blau und gelb fluoreszierenden Proteinen.^[364, 367-369] Im Hinblick auf die Vitalität der Zellen wären jedoch vor allem solche Varianten interessant, die anhand energiearmer Strahlung zum Fluoreszieren gebracht werden können. Varianten des GFP aus *A. victoria*, die ausschließlich eine rote Fluoreszenz aufweisen, sind bislang nicht beschrieben worden. Es wurden jedoch GFP-ähnliche, rot fluoreszierende Proteine (RFPs) aus diversen *Anthozoa* Spezies isoliert und weiter entwickelt.^[287-291] Ein Beispiel stellt mCherry dar, welches bereits für die Markierung von Proteinen mittels spontaner BiFC eingesetzt wurde.^[370-372] Bei Verwendung von RFPs würde jedoch das Problem bestehen bleiben, dass vermutlich mehr als eine Aminosäuresubstitution notwendig ist, um aus einer roten eine grüne Variante (oder anders herum) zu erhalten.

Ein weiterer Faktor, der bei der Verwendung von *Anthozoa* RFPs zu beachten ist, ist die Tendenz der Proteine, Di- oder Tetramere zu bilden.^[291] Dies mag für einige Anwendungen vorteilhaft sein, da auf diese Weise eine Signalverstärkung erhalten wird. Allerdings kann die Bildung von Di- oder Oligomeren auch die Quantifizierung erschweren, da möglicherweise kein linearer Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der Ziel-RNA-Konzentration vorliegt. Zusätzlich ist es je nach Ausrichtung der Proteine möglich, dass die Bindung an die Ziel-RNA, oder die Komplementierung der Split-Fragmente beeinträchtigt wird.

Für eine Anwendung *in vivo* wäre außerdem das Milieu des zu untersuchenden Organismus zu beachten. Die pH-Sensitivität von YFP ist bereits wiederholt beschrieben und unter anderem als Indikator für den Zelltod eingesetzt worden.^[373] Im Unterschied zu den entsprechenden grün fluoreszierenden Varianten ist für die Rekonstitution gelb- oder rot fluoreszierender Split-Proteine zudem eine Temperaturabhängigkeit beschrieben worden.^[366, 371] Da für das TetFC-System *in vivo* ebenfalls eine Inkubationstemperatur von weniger als 37 °C vorgeschlagen wird (Kapitel 3.1.4, 4.1.1), stellt diese Temperaturempfindlichkeit keinen zusätzlichen Schwachpunkt dar. Die Verwendung von Pumilio (oder PPR)-Varianten, die längere RNA-Sequenzen erkennen sowie die Verwendung stabilisierender Aminosäuresubstitutionen in die Fragmente der autofluoreszierenden Proteine könnten möglicherweise diese Empfindlichkeit verringern.

Was mögliche *in vivo* Anwendungen eines dualen TetFC-Systems betrifft, so ist zu beachten, dass zum einen die für die Ausbildung des Chromophors benötigte Zeit limitierend ist, und zum anderen das rekonstituierte GFP oder YFP auch nach Abbau der RNA erhalten bleibt.^[39] Zudem ist aufgrund der nicht-kovalenten Bindung zwischen Ziel-RNA und Detektor-Molekül ein Wegdiffundieren des

rekonstituiertem Proteins möglich, was die Pumilio-basierte Detektion von RNA zwischen kovalente Methoden und beispielsweise enzymatische Methoden, bei denen ein direktes Wegdiffundieren des produzierten Produkts erfolgt, platziert. Durch eine Kombination mit der FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Technologie könnte jedoch sichergestellt werden, dass lediglich neu komplementiertes Protein detektiert wird.^[39, 374] Anhand der Kombination aus Pumilio-Proteinen und GFP ist die Detektion von einzelnen RNA-Molekülen bereits gelungen^[41] und sollte sich generell ebenfalls auf ein duales System anwenden lassen. Für dynamische Anwendungen, wie das Tracking von RNAs, ist das TetFC-System hingegen aufgrund der genannten Gründe ungeeignet. Hinzu kommt, dass hier Effekte wie das Photobleichen eine größere Rolle spielt, was insbesondere für gelb fluoreszierende Proteine eine Limitierung darstellen könnte.

Für sämtliche RNA-Detektionsmethoden, die auf der Bindung von Proteinen als Reporter-Molekülen basieren, gilt, dass anhand weiterer Verfahren validiert werden sollte, ob die Methode einen Einfluss auf das Lokalisationsverhalten hat. Tilsner *et al.* berichteten, dass die Lokalisation der Ziel-RNA durch die Bindung der Pum-HD nicht beeinflusst zu werden scheint.^[40] Dies sollte jedoch für jede Anwendung, bei der unterschiedliche Ziel-RNAs/Pum-Varianten/Organismen verwendet werden, explizit validiert werden.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass eine Anwendung des dualen TetFC-Systems zur Detektion von RNA *in vivo* generell denkbar wäre und eine wertvolle Alternative zu denjenigen Systemen darstellen könnte, die auf der Hybridisierung mit Sonden basieren, welche zunächst in die Zelle eingebracht werden müssen, oder Systemen, die die Verlängerung von RNAs mit entsprechenden Erkennungssequenzen für bestimmte Sonden benötigen. Voraussetzung ist jedoch insbesondere eine Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften des Split-YFP.

4.2 Sequenzspezifische RNA-Modifizierung

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Pum-HD in Kombination mit der *Giardia lamblia* Trimethylguanosinsynthase 2-Variante V34A zur sequenzspezifischen RNA-Modifizierung eingesetzt werden kann.

GlaTgs2-V34A ist in der Vergangenheit bereits erfolgreich zur chemo-enzymatischen Markierung der 5'-Kappe von mRNA verwendet worden (Kapitel 1.3.1.2). Die gezielte Modifizierung bestimmter mRNAs in einem Gemisch verschiedener RNAs wurde bislang jedoch nicht umgesetzt. Basierend auf der Tatsache, dass die Pum-HD bereits mit einer Reihe verschiedener Effektor-Domänen zur Manipulation bestimmter Ziel-RNAs verwendet wurde (Kapitel 1.2.6), war postuliert worden, dass

sie analog zur sequenzspezifischen Modifizierung von mRNA eingesetzt werden kann.^[336] Dies würde gegenüber Protein-basierten Systemen den Vorteil haben, dass eine kovalente Bindung zwischen Ziel-RNA und Fluorophor möglich ist. Nachteilig wäre hingegen, dass nicht alle Komponenten des Systems genetisch codierbar sind, wie es beispielweise bei TetFC der Fall ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Herstellung von Fusionsproteinen bestehend aus der WT HsPum-HD, GlaTgs2-V34A und einem von vier verschiedenen Linkern erfolgreich vorgenommen werden (Kapitel 3.3.1). Bei dem Versuch, V34A an eine feste Phase zu koppeln, war in früheren Studien ein Verlust der enzymatischen Aktivität von V34A beobachtet worden (Stummer und Holstein, unveröffentlichte Daten). Im Unterschied hierzu war eine Aktivität von GlaTgs2-V34A als Teil eines Pumilio-Fusionsproteins weiterhin vorhanden (Kapitel 3.3.2). Im direkten Vergleich zu GlaTgs2-V34A zeigten die resultierenden Pum-Tgs-Varianten einen ähnlich hohen Umsatz bei der Biokonversion von m⁷GTP **1** zu m^{2,7}GTP **3** unter Verwendung von dem Cosubstrat AdoMet **2**. Zudem war die Promiskuität von GlaTgs2-V34A gegenüber den AdoMet-Analoga AdoPropen **6** und AdoEnYn **9** weiterhin gegeben. Es konnte hierbei jedoch eine teilweise stark verringerte Aktivität des Enzyms beobachtet werden. Die Tatsache, dass die Aktivität der Pum-Tgs-Varianten im Vergleich zu GlaTgs2-V34A gegenüber den Cosubstraten AdoPropen **6** und AdoEnYn **9** deutlich schwächer ausfiel, als bei Verwendung von AdoMet **2**, könnte unter anderem an der Zugänglichkeit der Substrat-Bindetasche liegen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Aktivität der Pum-Tgs-Varianten aufgrund der Fusionierung mit dem Protein Pumilio schwächer ausfiel – unabhängig von den gewählten Cosubstraten. Bei der ohnehin schnellen Umsetzung von m⁷GTP **1** mit AdoMet **2** wurde unter Verwendung von GlaTgs eine nahezu vollständige Umsetzung des Cosubstrates erhalten. Ein Unterschied in der Enzymaktivität würde sich unter den verwendeten Reaktionsbedingungen daher weniger bemerkbar machen, als bei den langsamer ablaufenden Biokonversionen mit den AdoMet-Analoga AdoPropen **6** und AdoEnYn **9**.

Zur Analyse, ob Pum-Tgs zur sequenzspezifischen Modifizierung von RNA geeignet ist, wurden die verschiedenen Pum-Tgs-Varianten zum Transfer der Penteninygruppe von AdoEnYn **9** auf m⁷(3'-O-Methyl)GpppG-tragende RNA **8** eingesetzt. Die anschließende Markierung der modifizierten RNA erfolgte mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-(1,3)-Cycloaddition (CuAAC). Trotz nachgewiesener Aktivität der verschiedenen Pum-Tgs-Varianten auf das Cosubstrat AdoEnYn **9**, und der Optimierung der CuAAC-Bedingungen, konnte die sequenzspezifische Modifizierung 5'-Kappen-tragender RNA nicht erreicht werden (Kapitel 3.3.3). Neben der Modifizierung der Ziel-RNA war in

allen Fällen zudem die Modifizierung einer Kontroll-RNA ohne Pumilio-Bindemotiv detektiert worden, was dafür spricht, dass eine unspezifische Modifizierung durch Pum-Tgs erfolgt war.

Der Versuchsaufbau war so gewählt worden, dass zunächst eine Bindung der Pum-HD (und somit des Fusionsproteins Pum-Tgs) an das Pumilio-Bindemotiv nahe der 5'-Kappe erfolgt, bevor die enzymatische Reaktion stattfindet. Auf diese Weise sollte gewährleistet werden, dass sämtliches Pum-Tgs an die RNA gebunden vorliegt und kein freies Enzym zur 5'-Kappe diffundieren und diese modifizieren kann. Ein möglicher Grund dafür, dass die Negativkontrolle trotzdem modifiziert wurde, ist die bereits im Rahmen der TetFC diskutierte Bindung von Pumilio an die Ziel-RNA: Solange sich die Binde-Domäne des Fusionsproteins Pum-Tgs in einem Gleichgewicht zwischen gebundener und ungebundener Form befindet (Kapitel 4.1.2, 4.1.3), kann in der ungebundenen Form eine Modifizierung der 5'-Kappe durch die Effektor-Domäne erfolgen. Dies war erwartet worden, erklärt allerdings nicht, warum beide RNAs gleichermaßen modifiziert wurden, und keine stärkere Modifizierung der boxA-enhaltenen RNA detektiert wurde. Die unspezifische Bindung eines Pum-Tgs-Konstruktes an RNA ist zuvor bereits beschrieben worden, allerdings konnte die Ursache hierfür nicht geklärt werden.^[336] Die Tatsache, dass die Pum-HD bereits als Binde-Domäne in einer Vielzahl verschiedener Designer-Proteine eingesetzt wurde,^[39-41, 43, 51, 90, 130, 131, 133, 154, 155] spricht dafür, dass die Bindung an die Ziel-RNA im Allgemeinen stark genug ist, um einen sequenzspezifischen Effekt zu erzielen. Allerdings wäre zu untersuchen, ob die für die Biokonversion des AdoMet-Analogons AdoEnYn 9 optimierte Reaktion^[230] möglicherweise für die Verwendung von Pum-Tgs anstelle von GlATgs2-V34A angepasst werden muss, um ein temperaturabhängiges Lösen der Pum-HD von der RNA zu vermeiden. Möglich wäre auch, dass der Misserfolg dieses Experiments in der Zugänglichkeit der 5'-Kappe während der gebundenen Form der RNA begründet ist. Es wäre denkbar, und aufgrund der hohen Affinität der WT HsPum-HD für boxA (K_D von 0.48 ± 0.21 nM) wahrscheinlich, dass ein großer Anteil von Pum-Tgs zwar an der RNA gebunden vorliegt, die enzymatische Funktion des Fusionsproteins jedoch aufgrund der räumlichen Entfernung zwischen Bindetasche und 5'-Kappe nicht ausgeführt werden kann. Hier wäre es interessant, weitere Konstrukte zu testen, die eine veränderte Ausrichtung der beiden Domänen zueinander besitzen. Beispiele wären eine Fusionierung der Pum-HD an den C-Terminus des Enzyms und/oder die Verwendung längerer und flexibler Linker. Dies könnte möglicherweise zu einer besseren Zugänglichkeit der 5'-Kappe in gebundener Form des Proteins führen und so die Effizienz der

enzymatischen Modifizierung erhöhen. Ein weiterer Ansatz wäre, den Abstand zwischen 5'-Kappe und Pumilio-Bindemotiv zu variieren.

Zudem könnten weitere Systeme getestet werden, um eine Sequenzspezifität bei der RNA-Modifizierung zu vermitteln. Möglich wäre neben weiteren RNA-bindenden Proteinen wie λ N₂₂,^[48] PCP,^[243] BglG^[244] oder U1Ap^[245, 246] beispielsweise die Verwendung des CRISPR/Cas9-System, anhand dessen erst kürzlich die Detektion von RNA in lebenden Zellen gelang.^[214] Anstelle des von Nelles *et al.* verwendeten Reporter-Moleküls GFP,^[214] wären weitere Effektor-Domänen durchaus denkbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen jedoch, dass eine gründliche Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Adaption der CuAAC für längere RNAs notwendig ist. Bei den von Schulz *et al.*^[230] und Muttach und Rentmeister^[333] verwendeten RNAs handelte es sich um kurze und stabile Konstrukte, die folglich weniger anfällig für einen Kupfer(I)-bedingten Abbau waren. Durch die Optimierung der CuAAC-Bedingungen (Verringerung von Temperatur und Reaktionszeit, Verwendung von Cu(II)-Sulfat anstelle von Cu(I)-bromid) konnte der Abbau der weniger stabilen RNAs verringert werden. Dennoch konnte keine Sequenzspezifität bei der chemo-enzymatischen Modifizierung mittels Pum-Tgs und anschließender CuAAC erhalten werden (Kapitel 3.3.3). Beide RNAs wurden jeweils gleichermaßen modifiziert und auch in gleichzeitiger Anwesenheit beider RNAs konnte kein Unterschied bei der Modifizierung festgestellt werden.

Eine allgemeine Verbesserung des erhaltenen Fluoreszenzsignals nach der CuAAC würde eventuell dazu beitragen, Unterschiede bei der Modifizierung besser zu erkennen. Zu diesem Zweck könnte beispielsweise das Selen-basierte Analogon (SeAdoYn) eingesetzt werden, welches anstelle eines Schwefel- ein Selenatom enthält und dessen Propargylgruppe mit einer höheren Effizienz auf die 5'-Kappe übertragen wird.^[333, 375]

Die chemische Modifizierung der pentenylierten 5'-Kappe ist nicht auf die CuAAC beschränkt. Eine mögliche Option wäre die Verwendung weiterer Klick-Reaktionen. Eine weitere Alternative wäre die Verwendung von AdoMet-Analoga mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen, die als Basis für vielseitige Klick-Reaktionen dienen können.^[221, 222]

Im Idealfall würde durch die Kombination aus GlaTgs2-V34A und einer RNA-bindenden Domäne ein vielseitig einsetzbares System generiert werden, anhand dessen eine programmierbare Modifizierung bestimmter Ziel-RNAs möglich ist. Ein System, das dies auf DNA-Ebene erlaubt ist DamID (DNA-Adenin-Methyltransferase-Identifikation).^[376] Durch Fusionierung eines DNA-

bindenden Proteins mit der *D. melanogaster* DNA-Adenin-Methyltransferase wird nahe der Ziel-Sequenz der Binde-Domäne die Methylierung eines Adenins in einem GATC-Motiv erhalten, was beispielsweise das Chromatin-Profiling ermöglichte.^[377, 378] Ein weiteres System stellt die Kombination aus DNA-bindenden Zinkfingerproteinen und der Cytosin-methylierenden humanen Methylase hDNMT3a dar, welche die gezielte Modifizierung bestimmter mitochondrialer RNAs erlaubte.^[379] Für eine ähnlich effiziente Modifizierung der mRNA 5'-Kappe ist jedoch sowohl die Optimierung einer Binde-Domäne, als auch die Optimierung der chemo-enzymatischen Modifizierung notwendig.

5 Ausblick

Die Kombination der Pum-HD mit verschiedenen autofluoreszierenden Proteinen oder Enzym-basierten Effektor-Domänen hat zu einer Reihe verschiedener Fusionsproteine für die sequenzspezifischen RNA-Detektion oder Modifikation geführt. Die Verwendung der Pum-HD als Binde-Domäne in diesen Designer-Proteinen bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Systemen: Sie ist genetisch codierbar, bindet sequenzspezifisch und kann rational verändert werden, um unterschiedlichste 8 nt-RNA-Sequenzen zu binden.^[90, 129] Die Erkennung der Ziel-Sequenz erfolgt sogar, wenn sich diese innerhalb von Haarnadelstrukturen einer RNA befindet,^[112, 130] jedoch ist keine bestimmte Sekundärstruktur der Ziel-RNA notwendig.^[161]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten zu verschiedenen Anwendungen der Pum-HD weiter ausgebaut.

Nach der Etablierung des TetFC-Systems *in vivo*, stellt der nächste Schritt nun die Verifizierung des Systems bei der Verwendung von Pum-HD-Bibliotheken dar. Das TetFC-System soll im Anschluss dafür eingesetzt werden, Varianten für die hochaffine Bindung einer bestimmten Ziel-RNA zu selektieren. Dies würde insbesondere bei denjenigen Varianten sinnvoll sein, die sich stark von der WT HsPum-HD unterscheiden.

Ein weiteres Ziel wäre, das TetFC-System zu nutzen, um Varianten der Pum-HD mit einer spezifischen Affinität zu seltenen Nukleosiden, wie beispielweise Inosin oder *N*⁶-Methyladenosin (*m*⁶A), zu identifizieren. Basierend auf der vielseitigen Einsetzbarkeit der Pum-HD, könnten diese als Binde-Domäne in entsprechenden Designerproteinen möglicherweise nicht nur die Detektion, sondern auch die gezielte Modifikation dieser Nukleoside ermöglichen. Im Falle von *N*⁶-Methyladenosin böte sich ein Fusionskonstrukt aus Pum-HD und dem mit Fettleibigkeit-assoziiertem Protein (FTO) oder dem AlkB Homolog 5 (ALKBH5) zur Demethylierung an. Zur Realisierung des entgegengesetzten Effekts, der gezielten Methylierung von Adenosin, könnten die Methyltransferasen METTL3/METTL14 in Kombination mit der Pum-HD verwendet werden.

Das *in vivo* etablierte TetFC-System hätte weiterhin das Potential, neben dem Screening von Varianten der Pum-HD, in einer modifizierten Form für die Selektion von PPR-Proteinen eingesetzt zu werden. Dies wäre von besonderem Interesse, da die Charakterisierung der PPR-Proteine und die Anwendung der PPR als rational modulierbares RNA-bindendes Protein gerade erst begonnen hat. Ein System zur Selektion bestimmter PPR-Varianten könnte einen großen Vorteil für die weitere Analyse und die Verwendung als Binde-Domäne darstellen. Voraussetzung wäre eine geeignete

Methode zur Generierung verschiedenster PPR-Varianten. Sinnvoll wäre, zunächst eine Plasmid-Datenbank herzustellen, die analog zur Golden-Gate-Klonierung der Pum-HD den modularen Aufbau von PPR-Proteinen erlaubt.^[150, 151, 153] Hierbei würden sich insbesondere die synthetischen PPR-Domänen von Coquille *et al.* anbieten, da die resultierenden Varianten nicht auf eine bestimmte Anzahl von Modulen beschränkt sind, und somit eine Flexibilität in der Länge der erkannten RNA-Sequenz gegeben ist.^[52]

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die TetFC auf ein duales System ausgeweitet werden kann, um *in vitro* zwischen zwei ähnlichen RNA-Sequenzen zu unterscheiden. Für eine Anwendung *in vivo*, beispielsweise zur Multiplex-RNA-Lokalisation, sind jedoch eine Reihe zusätzlicher Optimierungen notwendig. Zum einen könnte die Sensitivität des Systems durch Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften des Split-YFP weiter verfolgt werden, sodass eine Fluoreszenzintensität ähnlich der des Split-GFP erhalten würde. Ideal wäre jedoch, auf eine Kombination mit einem Split-RFP umzusteigen, dessen Fluoreszenzsignal weniger mit dem des Split-GFP oder Split-YFP überlappt, und die Verwendung energieärmerer Strahlung ermöglicht. Aufgrund des Nichtvorhandenseins rot fluoreszierender GFP-Varianten aus *A. victoria* wäre die Verwendung von analogen Proteinen aus beispielsweise diversen *Anthozoa* Spezies eine Möglichkeit. Voraussetzung wäre hierbei die Optimierung der entsprechenden Varianten für ein dreiteiliges Split-System. Zudem müsste untersucht werden, ob es möglich ist, Varianten zu generieren, bei denen die für die Veränderung des Fluoreszenzverhaltens verantwortlichen Aminosäuresubstitutionen analog zu dem SplitGFP/YFP-System lediglich in einem von drei Protein-Fragmenten vorliegen.

Im Hinblick auf die Verbesserung der Affinität der Pum-HD-Varianten für die Ziel-RNA, könnte zum anderen in folgenden Arbeiten die Verwendung der von Campbell *et al.* und Amidala *et al.* generierten PUF-Repeats mit verbesserten Bindungseigenschaften, oder mit der Möglichkeit zur Herstellung von Varianten mit mehr als acht PUF-Repeats angestrebt werden.^[42, 292]

Für die BiFC wurde eine unterschiedliche Tendenz zur Selbstassemblierung in Abhängigkeit des verwendeten Organismus beobachtet.^[300] Während dieser Effekt besonders stark in *X. laevis* ausfiel, war er dagegen in *C. elegans* sehr gering.^[300, 380, 381] Für die TetFC wurde diese Selbstassemblierung durch geeignete Kontrollen *in vitro*, in prokaryotischem und eukaryotischem Zelllysats sowie in *E. coli* ausgeschlossen.^[302, 320] Für eine mögliche Verwendung in weiteren Organismen sollte dies jedoch zunächst getestet werden.

Bezüglich einer Anwendung der Pum-HD als Binde-Domäne in humanen Zellen, z.B. bei der Untersuchung von RNA-Lokalisation in Neuronen, wäre es auch eine Überlegung wert, Varianten der PPR-Proteine (ohne humane Ziel-RNAs) oder beispielsweise das PUF-Protein FBF-2 anstelle der WT HsPum-HD zu verwenden. Da diese eine geringere Sequenzübereinstimmung mit den HsPum-HDs 1 und 2 aufweisen, binden sie potentiell weniger an endogene Pum-Targets in humanen Zellen und sollten dementsprechend die natürliche Funktion der HsPum-HDs nicht beeinträchtigen.^[42, 56]

Die Verwendung der Pum-HD als Binde-Domäne zur sequenzspezifischen Modifizierung von RNA durch die *Giardia lamblia* Trimethylguanosinsynthase 2-Variante V34A war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Trotz genereller Aktivität der Effektor-Domäne der entsprechenden Fusionsproteine auf unterschiedliche AdoMet-Analoga, konnte keine Sequenzspezifität bei der mittels CuAAC chemo-enzymatisch modifizierten RNA erzielt werden. Anhand weiterer Studien sollte zum einen versucht werden, die Reaktionsbedingungen des enzymatischen Reaktionsschrittes weiter zu optimieren. Weiterhin wäre zu analysieren, ob die Bindung der Pum-HD an die Ziel-RNA unter den Standard-Bedingungen zur Modifizierung weiterhin gegeben ist. Zum anderen sollten weitere AdoMet-Analoga eingesetzt werden, deren funktionale Gruppen mit einer größeren Effizienz auf die 5'-Kappe übertragen werden und die auf diese Weise zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal bei der anschließenden CuAAC führen. Die Verwendung weiterer AdoMet-Analoga übertragender Enzyme, wie beispielsweise *Encephalitozoon cuniculi* m⁷G-Methyltransferase (Ecm1) (Holstein, unveröffentlichte Daten) käme ebenfalls in Betracht. Als Machbarkeitsnachweis könnte zudem zunächst mit einer stabileren RNA gearbeitet und das System optimiert werden.

Als letzter Punkt bliebe die Wahl der Klick-Reaktion zur chemischen Modifizierung der enzymatisch modifizierten 5'-Kappe. Mit zunehmender Anzahl etablierter Klick-Reaktionen steigt das Repertoire an Reaktionen, die für die Modifizierung von RNA eingesetzt werden können. Insbesondere im Hinblick auf eine Anwendung *in vivo* wäre die Etablierung bio-orthogonaler Reaktionen zur sequenzspezifischen RNA-Modifikation sinnvoll.^[220]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pum-HD das Potential hat, als Binde-Domäne in weiteren Designer-Proteinen eingesetzt zu werden und dass Methoden zur Identifikation geeigneter Pumilio-Varianten hierbei eine wichtige Rolle spielen. Die Pum-HD ist dabei nicht nur auf die Rekrutierung einzelner Effektor-Domänen an bestimmte Ziel-RNAs beschränkt. Denkbar wäre

auch eine Kombination mit unterschiedlichen Proteinen, deren Zusammenspiel für das Auslösen enzymatischer Reaktionen notwendig ist.

Es bleibt abzuwarten, ob sich eines der verschiedenen Systeme (RNA-bindende Proteine, Guide-RNAs, das erst kürzlich auf RNA ausgeweitete CRISPR/Cas9-System, oder eventuell sogar das RNA-spezifische Pendant C2c2 aus *Leptotrichia shahii*^[382]) durchsetzt, oder die Wahl der Binde-Domäne von der Art der Applikation abhängig bleibt. Fest steht jedoch, dass die Pum-HD bereits einen wertvollen Beitrag zur Detektion und Modifikation verschiedener RNAs in unterschiedlichen Organismen beigetragen hat. Die erfolgreiche Etablierung von Methoden wie dem TetFC-basierten Hochdurchsatz-Screening oder die Kombination mit verschiedenen autofluoreszierenden Proteinen lässt annehmen, dass die unterschiedlichen Anwendungsbereiche der Pum-HD zukünftig weiter ausgebaut werden können und die Entschlüsselung der vielseitigen RNA-Funktionen weiter voran getrieben wird.

6 Material

6.1 Geräte, Software und Datenbanken

Tabelle 6.1: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Agilent 1260 Infinity HPLC mit Diode Array Detector (190 nm-640 nm)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, D
ÄKTApurifier™ mit UPC-900	GE Healthcare, München, D
Autoklav VX-120, VX-150	Systec GmbH, Linden, D
BioPhotometer® D30	Eppendorf AG, Hamburg, D
PCR-Cycler	
C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
MyCycler™ Thermal Cycler Gradient	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
peqSTAR 2X	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
peqSTAR 2X Gradient	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Exposure Cassette for Unmounted Screen	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Elektrophoreseapparaturen	
Mini-PROTEAN® Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
PerfectBlue™ Gel System Mini L (12x14 cm)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Semi-Dry Blotter V20-SDB	Scie-Plas, Cambridge, UK
EOS Digital Rebel XT	Canon, Melville, USA
Eporator®	Eppendorf AG, Hamburg, D
FACSAria™ III	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Feinwaage CP2245	Sartorius AG, Göttingen, D
FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-6	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, D
Geldokumentationsanlage	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
Hybridisierungssofen MINI 10	Hybaid GmbH, Santa Fe, USA
Incubator IN110	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Infinite® M1000 PRO	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Inkubationsschüttler Multitron Standard, 50 mm Schüttelhub	Infors AG, Bottmingen, CH
KühlThermomixer MKR 13	DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim, D
Membranpumpe MZ 2C NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Mikrowelle 900 & Grill	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern, D
MR Hei-Mix S	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.1: Verwendete Geräte.

Phosphorimager BAS-1800 II	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, D
Pipetten Research® plus, Einkanal (0.1-1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipetten Research® plus, Achtkanal (30-300 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Power Supply EV261	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Power Supply peqPOWER 300 Volt	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Präzisionswaage PCB 1000-2	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Raytest Eraser	Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, D
Reinstwassersystem arium® 6MVf	Sartorius AG, Göttingen, D
Rotator für Reagenz- und Probenröhrchen	VWR International GmbH, Langenfeld, D
Sonopuls GM 3100 mit Sonotrode UW 3100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Storage Phosphor Screen BAS-IP MS 2025 E	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Multipurpose Standard	
Typhoon™ FLA 9500	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Zentrifugen	
5424 R, 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Avanti® J-25, Rotor JA-14	Beckman Coulter, Krefeld, D
PerfectSpin Mini	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D

Tabelle 6.2: Verwendete Software und Datenbanken.

Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems Incorporated
AIDA 2.43	Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, D
CFX Manager™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
ChemStation Revision B.04.03	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, D
Chromas Lite 2.1.1	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, AU
CloneManager 9	Scientific & Educational Software, Cary, USA
EcoCyc <i>E. coli</i> Database	SRI International, Menlo Park, USA
EXPASy	SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, CH
i-control™ 1.10	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
ImageQuantTL	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Intas GDS	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
mfold web server	M. Zuker, University at Albany, Albany, USA ^[318]
OligoCalc 3.26, 3.27	W. A. Kibbe, Northwestern University, Chicago, USA ^[383]
OLYMPUS Viewer 3	Olympus Corporation
Protein Molecular Weight Calc.	Science Gateway
PyMOL v1.5.0.4.	Schrödinger, LLC
UNICORN™ 5.31	GE Healthcare, München, D

6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Standardchemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, D), Merck KgaA (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D) oder VWR International GmbH (Darmstadt, D) bezogen. Dynabeads® M-280 Streptavidin wurden ebenfalls von Merck bezogen. Anhydrotetracyclin wurde bei der Firma IBA GmbH (Göttingen, D) erworben. Cy5-Azid stammt von Jena Bioscience GmbH (Jena, D).

Tabelle 6.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
DC-Fertigfolien Alugram® Xtra SIL G/UV	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
Einmalküvetten (UV-transparent)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Einmalspritzen Injekt®-F (1 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einmalspritzen 20 mL (24 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, D
Einweg-Kanülen (0.9 x 40 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einweg-Laborhandschuhe (Vinyl/Nitril)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Elektroporationsküvetten (1 mm)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Filtrierpapiere MN-615	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
Gel-Blotting-Papier	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glaskugeln	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Kulturröhrchen (13 ml, PP)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
MF-Millipore™ Durapore® Membrane Filters (0.22 µm)	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Mikrotiterplatten (384 Well (schwarz), 96 Well (klar))	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Millipore Express® PLUS Membrane Filters	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Nitrocellulosemembran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Nylonmembran (positiv geladen)	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Parafilm	Bemis Company, Inc, Neenah, USA
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Petrischalen (92 x 16 mm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Platten MegaBlock® (96 Well, 2.2 ml, PP)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (0.2-2.0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Schraubröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Serologische Pipetten (steril, 1.0-25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S (0.2 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Zentrifugalfiltereinheiten Amicon® Ultra-15	Merck KgaA, Darmstadt, D
Zentrifugalfiltereinheiten Vivaspin® 500	Sartorius AG, Göttingen, D

6.3 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Die für mikrobiologische Methoden eingesetzten Nährmedien wurden für 20 Minuten bei 120 °C und 5 bar Dampfdruck autoklaviert. Die eingesetzten Lösungen und Puffer wurden sterilfiltriert.

Tabelle 6.4: Verwendete Nährmedien, Lösungen und Puffer für mikrobiologische Methoden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
2YT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/mL Ampicillin in 70 % (v/v) Ethanol
Chloramphenicol-Stammlösung	34 mg/mL Chloramphenicol in Ethanol
Glucose-Lösung	33 % (w/v) D-(+)-Glucosemonohydrat in ddH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	25 mg/mL Kanamycin in ddH ₂ O
LB-Agar	15 g/L Agar, 13 g/L Trypton, 8 g/L Hefeextrakt, 4 g/L NaCl
LB-Medium	10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 1 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4
SOC-Medium	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 12.5 mM NaCl, 20 mM Glucose, 10 mM MgCl ₂ , 2.5 mM KCl, pH 7.0
TSS-Puffer	20 % (v/v) DMSO, 10 % (w/v) PEG6000, 30 mM MgCl ₂ in LB-Medium

Die für molekularbiologische Methoden verwendeten Puffer sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt.

Tabelle 6.5: Verwendete Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
DNA Ladepuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNase Puffer (10x) ^a	100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl ₂ , 5 mM CaCl ₂
Ethidiumbromid-Färbelösung	4 µg/mL Ethidiumbromid in TAE-Puffer
FD-Puffer (für FastDigest TM Enzyme) ^a	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D
GC-Puffer (für Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 10x) ^a	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
HF-Puffer (für Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 10x) ^a	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
iTaq TM universal SYBR [®] Green supermix (2x)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Lysepuffer	0.5 mg/mL Lysozym in TE-Puffer, frisch hinzu gegeben
PCR-Puffer (reaction buffer B, für FIREPol [®] DNA Polymerase, 10x) ^a	800 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM Ammoniumsulfat, 0.2 % (w/v) Tween-20
RNA Elutionspuffer	0.3 M Natriumacetat, pH 5.2
RNA Ladepuffer (2x)	95 % (v/v) Formamid, 0.025 % (w/v) SDS, 0.5 mM EDTA, (0.025 % (w/v) Bromphenolblau, 0.025 % (w/v) Xylen Cyanol FF)

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.5: Verwendete Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.

Roti®-Hybri-Quick	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
RT Puffer (5x) ^a	250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat
SYBR® Gold-Färbelösung	0.1x SYBR® Konzentrat in TAE-Puffer
T4 DNA Ligase-Puffer (10x) ^a	400 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM Natriumacetat, 0.1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA
Transkriptionspuffer 1 (3x)	120 mM Tris, pH 8.1, 15 mM DTT, 6 mM Spermidin, 4.5 % (v/v) PEG6000, 0.03 % (v/v) Triton-X-100
Transkriptionspuffer 2 (5x) ^a	200 mM Tris-HCl, pH 7.9, 30 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM Spermidin

^a im Lieferumfang des entsprechenden Enzyms vorhanden.

Die für proteinbiochemische Methoden und die TetFC verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 6.6 zusammengefasst. Die für die Chromatographiemethoden verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert.

Tabelle 6.6: Verwendete Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Anodenpuffer	40 mM Tris, pH 8.9
BCIP-Lösung	0.5 % (w/v) BCIP in 70 % (v/v) DMF
Blockierlösung	4 % (w/v) BSA in 1x PBS
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0.25 % (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>
Denaturierungspuffer	9 M Harnstoff, 5 mM DTT
Entwicklerlösung	100 mM Tris, pH 9.5, 4 mM MgCl ₂
GFP Bindepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.8
GFP Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 M NaCl
GFP Lysepuffer	entspricht GFP Bindepuffer
GlaTgs Bindepuffer	50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 300 µM PMSF, 10 % (v/v) Glycerol
GlaTgs Dialysepuffer	50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerol
GlaTgs Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 300 µM PMSF, 10 % (v/v) Glycerol
GlaTgs Lysepuffer	entspricht GlaTgs Bindepuffer
Hepes-Bindepuffer	10 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01 % (v/v) Tween-20, 0.1 mg/mL BSA

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.6: Verwendete Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.

Kathodenpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.6, 100 mM Tricin, 0.1 % (w/v) SDS
LuxS Bindepuffer	15 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.2, 500 mM NaCl
LuxS Dialysepuffer	50 mM Hepes, pH 8.0, 10 % (v/v) Glycerol
LuxS Elutionspuffer	15 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.2, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol
LuxS Lysepuffer	15 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.2, 500 mM NaCl
MTAN Bindepuffer	26 mM Na ₂ HPO ₄ , 24 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.5
MTAN Dialysepuffer	50 mM Hepes, pH 7.0, 10 % (v/v) Glycerol
MTAN Elutionspuffer	26 mM Na ₂ HPO ₄ , 24 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.5, 250 mM Imidazol
MTAN Lysepuffer	Entspricht MTAN Bindepuffer
NBT-Lösung	50 mg/mL NBT in 70 % (v/v) DMF
PBST	0.1 % (v/v) Tween-20 in 1x PBS
Protein Ladepuffer (3x)	188 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30 % (v/v) Glycerol, 6 % (w/v) SDS, 0.03 % Bromphenolblau
Pumilio Bindepuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 µM PMSF
Pumilio Dialysepuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, 1 µM PMSF
Pumilio Elutions- puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 1 µM PMSF
Pumilio Lysepuffer	entspricht Pumilio Bindepuffer
Roti®-Quant (5x)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
TNG-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol
Transferpuffer	25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Isopropanol

Die für die chemischen und biochemischen Methoden verwendeten Puffer und Lösungen sind Tabelle 6.7 zu entnehmen.

Tabelle 6.7: Verwendete Puffer und Lösungen für chemische und biochemische Methoden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
CuAAC Reaktionslösung	81.8 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 % (v/v) Acetonitril, 5.4 mM CuSO ₄ , 5.4 mM Natriumascorbat, 6.4 % Cy5-Azid. Zugabe von Cy5-Azid nach 5 min bei 22°C.
Eluent B, HPLC	50 % (v/v) Acetonitril in Kaliumphosphat-Puffer
Kaliumphosphat-Puffer (Eluent A, HPLC)	100 mM K ₂ HPO ₄ , 100 mM KH ₂ PO ₄ , pH 6.5
PUS-Puffer	100 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NH ₄ Oac, 10 mM MgCl ₂ , 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA
Eluent A, HPLC präparativ	ddH ₂ O, 0.01 % (v/v) TFA
Eluent B, HPLC präparativ	Acetonitril, 0.01 % (v/v) TFA

6.4 Säulen, Kits und Größenstandards

Die verwendeten Säulen für die Reinigung von Proteinen mittels ÄKTApurifier™, die Analyse modifizierter Kappen-Analoga und Reinigung von AdoMet-Analoga mittels HPLC, und die Reinigung der radioaktiv markierten Sonden für die Northern Blot-Analyse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6.8: Verwendete Säulen.

Bezeichnung	Hersteller
HisTrap™ FF, 1 mL	GE Healthcare, München, D
HiTrap™ Q HP, 1 mL	GE Healthcare, München, D
Micro Bio-Spin™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
NUCLEODUR® C18 Pyramid (5 µm, 125 x 4 mm)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
NUCLEODUR® C18 Pyramid (5 µm, 125 x 10 mm)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
Superdex™ 75 10/300	GE Healthcare, München, D

Die verwendeten Kits zur Isolierung, radioaktiven Markierung und Reinigung von Nukleinsäuren sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6.9: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Amersham™ Megaprime™ DNA Labeling System	GE Healthcare, München, D
HiYield® Plasmid Mini Kit	SLG® Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, D
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
RNA Clean & Concentrator™-5	Zymo Research Corporation, Irvine, USA

Für die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren wurden die folgenden Größenstandards verwendet.

Tabelle 6.10: Verwendete Größenstandards.

Bezeichnung	Hersteller
GeneDireX® 100 bp DNA Ladder	GeneDireX, Taipeh, TW
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RiboRuler Low Range RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D

6.5 Bakterienstämme

Sowohl die erworbenen als auch die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 6.11 aufgeführt.

Tabelle 6.11: Verwendete Bakterienstämme.

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
BL21(DE3)	$F^- ompT gal dcm hsdSB(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])$	Novagen, Darmstadt, D
BL21(DE3) I	$F^- ompT gal dcm hsdSB(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) \Delta ryaA::FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$	diese Arbeit
BL21(DE3) II	$F^- ompT gal dcm hsdSB(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) \Delta znuA::FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$	diese Arbeit
BL21(DE3) III	$F^- ompT gal dcm hsdSB(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) 283526-284439 FRT-Kan^R-FRT-gfp1-9$	diese Arbeit
BL21(DE3) pLysS	$F^- ompT gal dcm hsdSB(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysS (Cam^R)$	Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, D
BL21-Gold(DE3)	keine Angaben	Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, D
TOP10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$	Invitrogen AG, Karlsruhe, D
Tuner™(DE3)pLacI	$F^- ompT hsdSB(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1(DE3) pLacI (Cam^R)$	Novagen, Darmstadt, D

6.6 Enzyme, Proteine und Antikörper

Die verwendeten Enzyme, Proteine und Antikörper sind in den Tabellen 6.12, 6.13 und 6.14 aufgeführt.

Tabelle 6.12: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
DNase I, RNase frei, [1 U/μL]	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D
FastAP™ [1 U/μL]	Fermentas, St. Leon-Rot, D
FastDigest™ Restriktionsenzyme (BamHI, BglII, DpnI, EcoRI, NcoI, NdeI, NotI, XbaI, XhoI)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D
FIREPol® DNA Polymerase [5 U/μL]	Solis BioDyne, Tartu, EST

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.12: Verwendete Enzyme.

GlaTgs2-V34A	diese Arbeit, nach ^[384]
LuxS	diese Arbeit, nach ^[384]
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Maxima H Minus Reverse Transkriptase [200 U/μL]	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D
MTAN	diese Arbeit, nach ^[384, 385]
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Pum-Tgs Varianten (Pum-GRK-Tgs, Pum-GRKs-Tgs, Pum-GS-Tgs, Pum-HL3-Tgs, Pum-HL3s-Tgs)	diese Arbeit
Pyrophosphatase, anorganisch [0.1 U/μL]	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D
RiboLock™ RNase Inhibitor [40 U/μL]	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T4 DNA Ligase [5 U/μL]	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T7 RNA Polymerase [20 U/μL]	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D

Tabelle 6.13: Verwendete Proteine.

Bezeichnung	Hersteller
BSA	New England Biolabs, Frankfurt a.M., D
GFP1-9	diese Arbeit, nach ^[302]
Pum-S10-S11	diese Arbeit
S10(Y)-Var2	diese Arbeit
S10(Y)-WT	diese Arbeit
S10-Var2	diese Arbeit, nach ^[135]
S10-WT	diese Arbeit, nach ^[302]
Var1-S11	diese Arbeit, nach ^[302]
wsGFP	diese Arbeit
wsYFP	diese Arbeit

Tabelle 6.14: Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Mouse IgG-Alkalische Phosphatase, Ziege, Sekundärantikörper (1:30000 in 2 % BSA in PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Penta His-Antibody, BSA frei, Maus, Primärantikörper, (1:2000 in 2 % BSA in PBS)	5 PRIME GmbH, Hamburg, D

6.7 Plasmide

Die Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide ist in Tabelle 6.15 zu finden. Zusätzlich zu den wichtigen Elementen ist das Ursprungsplasmid bei den hergestellten Plasmiden angegeben. Die Sequenzen der hergestellten Plasmide sowie des Inserts des käuflich erworbenen Plasmids phbmRNA befinden sich im Anhang.

Tabelle 6.15: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Wichtige Elemente	Hersteller/Quelle
pET16b+	Amp ^R	Novagen, Darmstadt, D
pET16b+ Pum-Var1-S11	Gen codierend für Var1-S11, His-Tag, Amp ^R	Kellermann <i>et al.</i> ^[302]
pET22b+	Amp ^R	Novagen, Darmstadt, D
pET22b+ S10-Pum-Var2	Gen codierend für S10-Var2, His-Tag, Amp ^R	Rath <i>et al.</i> ^[135]
pET22b+ S10-Pum-WT	Gen codierend für S10-WT, His-Tag, Amp ^R	Kellermann <i>et al.</i> ^[302]
pET28b+ GFP1-9	Gen codierend für GFP1-9, Kan ^R	G. S. Waldo, LANL, Los Alamos, USA ^[386]
pET-29a-LuxS	Gen codierend für LuxS, His-Tag, Kan ^R	B. Dräger, Universität Halle, D
phb-mRNA	Sequenz für hb mRNA	Biomatik Corporation, Cambridge, CA
pKD4	FRT-Kan ^R -FRT	Datsenko und Wanner ^[305]
pKD46	Gene codierend für λ Red Rekombinase (Red α , Red β und Red γ)	Datsenko und Wanner ^[305]
pMB38	2x T7-Promotor, Amp ^R	Valencia-Burton <i>et al.</i> ^[252]
pProEx-MTAN	Gen codierend für LuxS, His-Tag, Amp ^R	B. Dräger, Universität Halle, D
pRSET-A-GlaTgs2	Gen codierend für GlaTgs2-V34A, His-Tag, Amp ^R	Schulz <i>et al.</i> ^[230]
pRSFDuet TM -1	Kan ^R	Novagen, Darmstadt, D
pSJK1	(pET22b+) GFP1-9 Genkassette, bestehend aus FRT-Kan ^R -FRT- λ PL- <i>gfp1-9</i> , Amp ^R	diese Arbeit
pSJK2	(pET16b+) Gen codierend für Pum-S10-S11, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK3	(pACYCDuet TM -1) Gen codierend für S10-WT, His-Tag, Cam ^R	diese Arbeit
pSJK4	(pACYCDuet TM -1) 2x T7-Promotor, Gene codierend für S10-WT, Var1-S11, 2x His-Tag, Cam ^R	diese Arbeit
pSJK7	(pACYCDuet TM -1) 3x T7-Promotor, Gene codierend für S10-WT, Var1-S11, 2x His-Tag, Sequenz für RNA hb-boxAB, T7-Terminator, Cam ^R	diese Arbeit

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.15: Verwendete Plasmide.

pSJK8	(pET22b+) Gen codierend für S10(Y)-WT, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK9	(pET16b+) Gen codierend für wsGFP, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK10	(pET16b+) Gen codierend für wsYFP, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK11	(pUC19-T) Gen codierend für GFP1-9, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK13	(pRSFDuet TM -1) Gen codierend für TetR, Kan ^R	diese Arbeit
pSJK14	(pRSFDuet TM -1) Gen codierend für TetR, Sequenz für RNA hb-boxAB, T7-Terminator, Kan ^R	diese Arbeit
pSJK15	(pRSFDuet TM -1) Gen codierend für TetR, tetO ₂ , Sequenz für RNA hb-boxAB, T7-Terminator, Kan ^R	diese Arbeit
pSJK18	p _{tac} -Promotor, Sequenz für RNA hb-boxAB flankiert von Haarnadelschleifen 3F und 5F	diese Arbeit
pSJK18c	p _{tac} -Promotor, Sequenz für RNA hb-boxAC flankiert von Haarnadelschleifen 3F und 5F	diese Arbeit
pSJK19	(pET22b+) Gen codierend für S10(Y)-Var2, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK20	(pRSFDuet TM -1) p _{tac} -Promotor, Sequenz für RNA hb-boxAB flankiert von Haarnadelschleifen 3F und 5F, Kan ^R	diese Arbeit
pSJK20c	(pRSFDuet TM -1) p _{tac} -Promotor, Sequenz für RNA hb-boxAC flankiert von Haarnadelschleifen 3F und 5F, Kan ^R	diese Arbeit
pSJK21	(pET16b+) Gen codierend für Pum-GRK-Tgs, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK22	(pET16b+) Gen codierend für Pum-GRKs-Tgs, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK23	(pET16b+) Gen codierend für Pum-GS-Tgs, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK24	(pET16b+) Gen codierend für Pum-HL3-Tgs, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK25	(pET16b+) Gen codierend für Pum-HL3s-Tgs, His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pSJK32	(pRSFDuet TM -1) Gen codierend für TetR, tetO ₂ , Sequenz für RNA hb-boxGB, T7-Terminator, Kan ^R	diese Arbeit
pSJK33	(pRSFDuet TM -1) Gen codierend für TetR, tetO ₂ , Sequenz für RNA hb-boxCB, T7-Terminator, Kan ^R	diese Arbeit
pSK17-Hb-boxAB	Sequenz für RNA hb-boxAB, Amp ^R	A. Rath, Universität Hamburg, D ^[311]

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.15: Verwendete Plasmide.

pTet-SpecR	Gen codierend für TetR	G. S. Waldo, Los Alamos National Labs, Los Alamos, USA ^[386]
pWH610L3F5F	p _{tac} -Promotor, Sequenzen für Haarnadelschleifen 3F und 5F	A. Hunsicker, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, D ^[316]

6.8 Oligonukleotide, Nukleotide und Kappen-Analoga

Die Sequenzen der käuflich bei Life Technologies Inc. (Darmstadt, D) oder Biolegio B.V. (Nijmegen, NL) erworbenen Oligonukleotide zur Klonierung und zur *in vitro* Transkription sind in Tabelle 6.16 aufgeführt. Käuflich bei biomers.net GmbH (Ulm, D) erworbene RNAs sind in Tabelle 6.17 zu finden. Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit mittels T7-Transkription hergestellten RNAs befinden sich im Anhang. Die Tabellen 6.18 und 6.19 enthalten verwendete Nukleotide und Kappen-Analoga.

Tabelle 6.16: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Templat	Zweck/ Klonierung
2xtetO ₂ _ORF_revco mp	CTGGCGTTCAATGATCGGATCCTCTCTATCACTGATAGGG ATGTCAATCTCTATCACTGATAGGGAGGGCCTAACAGTGG ATCTCTCTATCACTGATAGGGATGTCAATCTCTATCACTGA TAGGGAGGATCCATGATCGCTCAGCG	-	pSJK15
5F_fwd_T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCC	pSJK20	T7- Transkription
A1_fwd	CCACTCTTCACGCACTCTTG	<i>E. coli</i> BL21(DE3)I	Kolonie-PCR
B1_fwd	TAATAATTTACGCGACCACACCG	<i>E. coli</i> BL21(DE3)II	Kolonie-PCR
C1_fwd	CCAATTTTTTGACATGTATCACAAATTTGAA	<i>E. coli</i> BL21(DE3)III	Kolonie-PCR
CCC_fwd	TAATCCCAGAATCCCATATATTAATTTGATATATTCGTAGC ATAAGTTTTCCA	boxAB	pSJK33
CCC_QS_fwd	TAATCCCAGAATTGTATATATTAATCCCATATATTCGTAGC ATAAGTTTTCCA	hb-boxAB	pSJK20c
CCC_QS_rev	TGGAAACTTATGCTACGAATATATGGGATTAATATATAC AATTCTGGGATTA	hb-boxAB	pSJK20c
FRT-Kan-FRT_fwd_BamHI	GATATGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	pKD4	pSJK1

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.16: Verwendete Oligonukleotide.

FRT-Kan-	ATTGTTTGGTAGGTGAGAGATCCCCATATGAATATCCTC	pKD4	pSJK1
FRT_rev_fuse_LPL_2	CTTAGTTCCT		
5			
G2U_fwd	TAATCCCAGAATTTTATATATTAATTTGATATATTCGTAGC ATAAGTTTTCCA	boxAB	pSJK32
GFP1-9_fwd_BamHI	GATCGGGATCCATGAGGAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA	GFP1-9	pSJK9
GFP1-	TAATTTACCAACACTACTACGTTTTAACTGAAACAAACTGG	GFP1-9	pSJK1
9_fwd_fuse_LPL	AGACTGCCATGAGGAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA		
GFP1-9_fwd_XbaI	GATCTCTAGAATGAGGAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA	GFP1-9	pSJK11
GFP1-9_rev_EcoRI	AGCTGAATTCTTATGGTAAAAGGACAGGGCCA	GFP1-9	pSJK1
GFP1-9_rev_fuse_S1	GTGTCGACAGGTAATGGTCGTCTGGTAAAAGGACAGGGC	GFP1-9	pSJK9
0	CATC		
GlaTgs_fwd_GRK	GGGCGTAAAG GCTCTGGTGA TCCGGGAAAA AAAAAACAG ATGAGCACCTGGCTGCTG	GlaTgs2-V34A	pSJK21
GlaTgs_fwd_GRKkur	GGCGGTAAAAAACAA ATGAGCACCTGGCTGCTG	GlaTgs2-V34A	pSJK22
z			
GlaTgs_fwd_GS	GGTGGTGGCG GCAGCGGTGG GGGTGGCTCG ATGAGCACCTGGCTGCTG	GlaTgs2-V34A	pSJK23
GlaTgs_fwd_HL3	CTTGCTGAAG CGGCGGCCAA AGAAGCCGCA GCAAAGGAGG CTGCCGCAAA AGCCGCAGCG ATGAGCACCTGGCTGCTG	GlaTgs2-V34A	pSJK24
GlaTgs_fwd_HL3kurz	GAAG CGGCGGCCAA AGAAGCCGCA GCAAAG ATGAGCACCTGGCTGCTG	GlaTgs2-V34A	pSJK25
GlaTgs2_Stop_rev_B	GATCGGATCCTTATTCACCGCTACCGCGTGT	GlaTgs2-V34A	pSJK21-25
amHI			
Hb300_rev	TAATTTGACTTTGGACTGTTG	3'-UTR hb- mRNA	T7- Transkription
Hb500_rev	AATTATATTGAATAATTGGATTTATTTGATTGA	3'-UTR hb- mRNA	T7- Transkription
HB-A1	AAAGGGGTCCGCATCCGCGAGCCGCAATATACGCAGGGC TGCAAGAAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	pSJK1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)I
HB-A2	GCGAAGGTACAAAAAATTAACGTTTTAGCAATAGCTATAT AATATAGCCTTTATGGTAAAAGGACAGGGCCA	pSJK1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)I
HB-B1	AACGCCAGGGCGACAGAGCGGGCTATCTGTTGCACGTAA TCACTTCCTCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	pSJK1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)II
HB-B2	AATGTTATAATATCACACTTCTCATATTCATTACGATTATTG GTCGCATTTTATGGTAAAAGGACAGGGCCA	pSJK1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)II
HB-C1	TAGATGTATTACATCAACTATCTTTTATTGCACCAACGTCA TTGATATATGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	pSJK1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)III

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.16: Verwendete Oligonukleotide.

HB-C2	CAGAAAAGGAAATACCTTTATGTAAGAAAGTGCACCACCA CCTAATATATTTATGGTAAAAGGACAGGGCCA	pSJK1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)III
hb-N5G_fwd	GTTTGGAAGAACTTATGCTACG	hb-boxAB	qRT-PCR
hb-N5G_rev	CCCATCACCATCACCTTG	hb-boxAB	qRT-PCR
Hbx20NK_fwd	TAATACGACTCACTATAGGGTAATCGTTGTCCAGAATCCC ATATATTCGTAGCATAAGTTTTCCAAACATT	3'-UTR hb- mRNA	T7- Transkription
Hbx20NRE_fwd	TAATACGACTCACTATAGGGTAATCGTTGTCCAGAATTGT ATATATTCGTAGCATAAGTTTTCCAAACATT	3'-UTR hb- mRNA	T7- Transkription
His6_fwd_Mut_NcoI	AGCTCCATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCA CAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTACATGGGCCGAG	Var1-S11	pSJK4
His6_rev_Mut_XhoI	AGCTCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGCC CTAAGTCAACACCGTTC	S10-WT	pSJK4
IdnT_rev	ACAAACGGCGGCGATAGC	<i>E. coli</i>	qRT-PCR
IdnT_fwd	CTGTTTAGCGAAGAGGAGATGC	<i>E. coli</i>	qRT-PCR
LPL1	ATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATATAAAAAACATAC AGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTT	-	pSJK1
LPL1_fwd_fuse_FRT	GGGGATCTCTCACCTACCAACAATGCCCCCTGCAAAAA ATAAATT	LPL1	pSJK1
LPL1_rev	CTCAGTATCACCGCCAGTGGTATTTATGTCAACACCGCCA GAGATAATTTATCA	LPL1	pSJK1
LPL2	GGACGCACTGACCACCATGAAGGTGACGCTCTTAAAAATT AAGCCCTGAAGAAGGGCAGCATTCAAAGCAGAAGGCTTT G	-	pSJK1
LPL2_fwd	CACTGGCGGTGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTG ACCACCAT	LPL2	pSJK1
LPL2_rev_fuse_GFP	TTAAACGCTAGTAGTGTGGTAAATTAGCGCCAATGCTTC GTTTCGTATCACACCCCCAAAGCCTTCTGCTTTGAATGC	LPL2	pSJK1
MCS1_fwd	TGCGACTCCTGCATTAGGAAAT	pACYCDuet™ -1, pMB38	Kolonie-PCR
MCS1_rev	ATCTCCTTCTTATACTTAATAATATACTA	pACYCDuet™ -1, pMB38	Kolonie-PCR
MCS2_fwd	CACGGCCGCATAATCGAAATTAATA	pACYCDuet™ -1, pMB38	Kolonie-PCR
MCS2_rev	TGCTCAGCGGTGGCAGCA	pACYCDuet™ -1, pMB38	Kolonie-PCR
N5G_fwd_XbaI	GACTAGTCTAGACCCATCACCATCACCTTGTTATTATTA	hb-boxAB	pSJK20
N5G_fwd_NcoI	TAGATCCCATGGGAGCTCCCCATCACCATCACC	pSJK7	pSJK15
N5G_fwd_XhoI_Eco	TAGATCCTCGAGTCTGGTAAGAATTCTAATACGACTCACTA	boxAB	pSJK7
RI_T7prom_SacI	TAGAGTCCCCATCACCATCACCTTGTTATT		
N5G_fwd_XhoI_Eco	TAGATCCTCGAGTCTGGTAAGAATTCTAATACGACTCACTA	boxAB/boxCB	pSJK7
RI_T7prom_SacI	TAGAGTCCCCATCACCATCACCTTGTTATT	(aus pSK17)	

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.16: Verwendete Oligonukleotide.

N5G_rev_BglII	TCGATCAGATCTGACAACAAAATAATGTTTGGAAAACCTTA TGC	hb-boxAB	pSJK20
N5G_rev_Term_Eco RI_lang	GATCTAGAATTCCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGA	pSJK7	pSJK15
N5G_rev_XhoI	GATCTACTCGAGGACAACAAAATAATGTTTGGAAAACCT	boxAB	pSJK7
N5G_rev_XhoI	GATCTACTCGAGGACAACAAAATAATGTTTGGAAAACCT	boxAB/boxCB (aus pSK17)	pSJK7
PCR_CCC_fwd	CACTATTATCATATAATCCCAGAATCCC	pSJK33	Verifizierung FACS
PCR_G2U_fwd	TATCACTATTATCATATAATCCCAGAATTT	pSJK32	Verifizierung FACS
PCR_NRE_fwd	CACTATTATCATATAATCCCAGAATTGT	pSJK15	Verifizierung FACS
PCR_NRE_fwd2	TATCACTATTATCATATAATCCCAGAATTG	pSJK15	Verifizierung FACS
pET22b+_rev	GCTCAGCGGTGGCAGCAGC	pET22b+	Kolonie-PCR
pRSF_fwd_BamHI	GATCATGGATCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATA AGGAG	pSJK14, pSJK20	pSJK15, T7- Transkription
pRSF_rev_BamHI	ATGATCGGATCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCTAATGC A	pSJK14	pSJK15
pUC19-T_fwd	TGT GTG GAA TTG TGA GCG GAT A	pUC19-T	Kolonie-PCR
Pum_NdeI_fwd	AGCTCATATGGGCCGCGAGCCGCC	Pum	pSJK2, pSJK21-25
Pum_rev_fuse_GRK	ACCAGAGCCTTTACGCCCCCTAAGTCAACACCGTTCTTCA	Pum	pSJK21
Pum_rev_fuse_GRKk urz	GTGCTCATTTGTTTTTACGCCCCCTAAGTCAACACCGTT CTTCA	Pum	pSJK22
Pum_rev_fuse_GS	CGCTGCCGCCACCACCCCTAAGTCAACACCGTTCTTCA	Pum	pSJK23
Pum_rev_fuse_HL3	CCGCCGCTTCAGCAAGCCCTAAGTCAACACCGTTCTTCA	Pum	pSJK24
Pum_rev_fuse_x	ACCGCCAGACCCAACGTCGGTACC CCCTAAGTCAACACCGTTCTTCA	Pum	pSJK2
Pum_rev_HL3kurz	TTCTTTGGCCGCCGCTTCCCCTAAGTCAACACCGTTCTTCA	Pum	pSJK25
S10_fwd	GACGACCATTACCTGTCGACAC	S10	pSJK9
S10_fwd_fuse_x	GACGTTGGGTCTGGCGGTGGCTCC ATGGATTACCAGACGACCATTACCT	S10	pSJK2
S10_fwd_NdeI	GATATCATATGGATTACCAGACGACCA	S10-WT	pSJK4
S10_rev_fuse_S11	AGGACCATGTGGTCACGCTTTTCGTTGAGATCTTTCGAAA GGATAGTTT	S10	pSJK2
S10_T203Y_fwd	CAGACGACCATTACCTGTCgtatCAAACCTATCCTTTCGAAA GA	S10 (aus S10- x-Pum)	pSJK8, pSJK19
S10_T203Y_rev	TCTTTCGAAAGGATAGTTTGataCGACAGGTAATGGTCGTC TG	S10 (aus S10- x-Pum)	pSJK8, pSJK19

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 6.16: Verwendete Oligonukleotide.

S11_fwd_SK	AAGCGTGACCACATGGTCCT	S11	pSJK2
S11_rev_BamHI	AGCTGGATCCTTAGCTAGCATCTGTAATCCCAGC	S11	pSJK9
S11_rev_NotI	AGCTGCGGCCGCTTAGCTAGCATCTGTAATCCCAG	Var1-S11	pSJK4
S11_rev_XhoI	AGCTCTCGAGTTAGCTAGCATCTGTAATCCCAGC	S11	pSJK2
T7-prom_GGG	TAATACGACTCACTATAGGG		T7- Transkription
tetO_fwd_BamHI	GATCATGGATCCTCCCTATCAGTG	tetO	pSJK15
tetO_rev_BamHI	ATGATCGGATCCTCTCTATCACTG	tetO	pSJK15
tetR_fwd_NdeI	GATCATCATATGTGCGGGACTCTGGGGTTCG	tetR	pSJK15
tetR_rev_XhoI	ATGATCCTCGAGTTAAGACCCACTTTACATTTAAGTTGTT TT	tetR	pSJK15, pSJK32, pSJK33

Tabelle 6.17: Käuflich erworbene RNAs.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
B-boxAB	Biotin-GGGCCAGAAUUGUAUAUAUUAUUUGAUUAUAUUCG
B-boxLB	Biotin-GGGCCAGAAUUGUAUGGUUUAAUUUGAUUAUAUUCG
boxAB	GGGCCAGAAUUGUAUAUAUUAUUUGAUUAUAUUCG
boxLB	GGGCCAGAAUUGUAUGGUUUAAUUUGAUUAUAUUCG

Tabelle 6.18: Verwendete Nukleotide.

Bezeichnung	Hersteller
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 mM)	Solis BioDyne, Tartu, EST
NTPs (ATP, CTP, GTP, UTP)	Jena Bioscience GmbH, Jena, D
dCTP [α - ³² P] [10 mCi/ml]	HARTMANN ANALYTIC GmbH, Braunschweig, D

Tabelle 6.19: Verwendete Kappen-Analoga.

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
m ⁷ GTP	5 mM in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D
m ⁷ GpppA	10 mM in ddH ₂ O	NEB, Frankfurt a/M, D
m ⁷ (3'-O-Methyl)GpppG (ARCA)	10 mM in ddH ₂ O	NEB, Frankfurt a/M, D

7 Methoden

Alle Arbeiten wurden in gentechnischen Laboren der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Des Weiteren wurden sämtliche mikrobiologischen Arbeiten unter semi-sterilen Bedingungen vorgenommen.

7.1 Mikrobiologische Methoden

7.1.1 Kultivierung von *E. coli* Zellen

Die Kultivierung auf festem Nährboden erfolgte auf LB-Agar-Platten bei 37 °C für 14 h, die anschließende Lagerung bei 4 °C. Jeweils eine Kolonie der auf LB-Agar-Platten kultivierten Zellen wurde zum Ansetzen von Vorkulturen in LB-Medium im Maßstab von 1-5 mL verwendet. Vorkulturen (37 °C, 220 rpm, 14 h) wurden zur Inokulation der Hauptkulturen im Verhältnis 1:100 eingesetzt. Sowohl feste als auch flüssige Nährmedien wurden bei Bedarf mit 25 µg/mL Kanamycin, 34 µg/mL Chloramphenicol oder 100 µg/mL Ampicillin versetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurde 2YT-Medium für die Hauptkulturen verwendet.

7.1.2 Dauerhafte Lagerung von *E. coli* Zellen

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

7.1.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen sowie die anschließende Transformation mit DNA erfolgte nach Dower *et al.*^[387] Pro 50 µL elektrokompetenter Zellen wurden jeweils ca. 10 ng Plasmid-DNA (7.2.1) oder bis zu 2 µL eines Ligationsansatzes (7.2.4) eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte für 5-6 ms bei 1.8 kV. Nach Zugabe von 450 µL SOC-Medium und 30-45 minütiger Inkubation der Zellen bei 37 °C und 300 rpm, wurden diese auf LB-Agar-Platten kultiviert (7.1.1).

Für die aufeinanderfolgende Transformation von *E. coli* Zellen mit bis zu drei Plasmiden wurden die Zellen nach der erfolgten Transformation erneut elektrokompetent gemacht und wiederholt transformiert.

Nach der Klonierung von Plasmid-DNA mittels Ligation (7.2.4) wurden alternativ chemisch kompetente Zellen verwendet. Sowohl die Präparation als auch die Transformation erfolgte nach Chung *et al.*,^[388] wobei die Zellen vor der Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Für die Transformation wurden die chemisch kompetente *E. coli* Zellen zunächst mit dem

vollständigen Ligationsansatz (7.2.4) versetzt, 30 Minuten auf Eis und anschließend 30 Sekunden bei einer Temperatur von 42 °C inkubiert. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen anschließend eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm (Schüttelmixer) inkubiert und auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert (7.1.1).

7.2 Molekularbiologische Methoden

Die allgemeinen molekularbiologischen Methoden sind in den folgenden Kapiteln aufgeführt. Aufgrund der Komplexität einiger Plasmid-DNA-Klonierungen werden diese gesondert im Detail in Kapitel 7.2.18 beschrieben.

7.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus Vorkulturen (7.1.1) im Maßstab von 2-3 mL mit Hilfe des *Hi Yield® Plasmid Mini Kit* nach Herstellerangaben. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 30 µL ddH₂O, die Konzentrationsbestimmung photometrisch (7.2.15).

7.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit Hilfe der *Phusion® High-Fidelity* DNA Polymerase nach Herstellerangaben. Hierbei wurde der GC-Puffer bei Reaktionen verwendet, bei denen das Gen der *H. sapiens* Pumilio Homologie-Domäne oder Varianten hiervon vervielfältigt wurden. Die Überprüfung von PCRs erfolgte gelelektrophoretisch (7.2.7).

7.2.2.1 QuikChange®-PCR

Zur Einführung von Punktmutationen in Plasmiden wurde die QuikChange®-PCR unter Verwendung der *Phusion® High-Fidelity* DNA Polymerase angewandt. Es wurden Primerpaare verwendet, deren Sequenzen sich aus dem einzuführenden Bereich von ein bis drei Nukleotiden sowie zwei flankierenden, zur Zielsequenz identischen Bereichen von 15-20 Nukleotiden, ergaben. Als Annealingtemperatur wurde eine allgemeine Temperatur von 63 °C für 45 s verwendet. Die Zyklenzahl betrug 18. Im Anschluss an die PCR erfolgte die Restriktion des Templates mittels DpnI (7.2.3), bevor 1 µL des Ansatzes für die Transformation von elektrokompenten *E. coli* TOP10 Zellen eingesetzt wurden (7.1.3).

7.2.2.2 Megaprimer-PCR

In den Fällen, in denen die QuikChange®-PCR (7.2.2.1) nicht erfolgreich oder aufgrund zweier ähnlicher Gene in einem Plasmid nicht möglich war, wurde als Alternative die Megaprimer-PCR zur Einführung von Punktmutationen verwendet. Hierbei enthielt lediglich einer der Primer die einzuführende Sequenz. Der zweite Primer wurde so gewählt, dass ein Amplifikat mit einer Länge von 500-1200 bp entstand. Dieses wurde gereinigt (7.2.5) und als Primerpaar in einer weiteren PCR, analog zur QuikChange®-PCR (7.2.2.1), eingesetzt. Das Templat wurde mittels DpnI restringiert (7.2.3).

7.2.2.3 Assemblierungs-PCR

Zur Herstellung von Fusionskonstrukten wurden zunächst zwei (oder drei) einzelne PCRs (7.2.2) durchgeführt, bei denen jeweils ein 5'- und ein 3'-Primer überlappende Überhänge trugen, sodass sich die erhaltenen DNA-Fragmente in einer dritten PCR anlagern und das Fusionskonstrukt amplifiziert werden konnte. Die Zugabe der entsprechenden Primer in äquimolarer Konzentration erfolgte nach dem fünften Zyklus der PCR.

7.2.2.4 Kolonie-PCR

Die Überprüfung der Ligation von DNA-Fragmenten (7.2.4) erfolgte mittels Kolonie-PCR. Zunächst wurden hierfür chemisch kompetente oder elektrokompente *E. coli* TOP10 Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert (7.1.3) und auf LB-Agar Platten kultiviert (7.1.1). Einzelne Kolonien wurden in je 10 µL ddH₂O aufgenommen und je 3 µL dieser Zellsuspension als Templat verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass jeweils ein Primer an das eine, und der andere Primer an das andere der zu ligierenden DNA-Fragmente band. Die PCR erfolgte mittels *FIREPol*® DNA Polymerase nach Herstellerangaben.

7.2.2.5 Quantitative Real-Time-PCR

Zwecks relativer Quantifizierung der *in vivo* produzierten Ziel-RNA boxAB wurde die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierzu wurde die aus *E. coli* isolierte Total-RNA (7.2.12) zunächst in cDNA revers transkribiert (7.2.14). Der Reaktionsansatz für die anschließende qRT-PCR ist in Tabelle 7.1 dargestellt.

Tabelle 7.1: Reaktionsansatz einer qRT-PCR.

Komponente	Volumen/Menge	Endkonzentration
Transkriptionsansatz	1 µL	
iTaq™ universal SYBR® Green supermix (2x)	10 µL	1x
hb-N5G_fwd/IdnT_fwd [10 µM]	0.3 µL	0.15 µM
hb-N5G_rev/IdnT_rev [10 µM]	0.3 µL	0.15 µM
ddH ₂ O	ad. 20 µL	

Das Temperatur-Programm der qRT-PCR lautete wie folgt: 95 °C für 5 min, gefolgt von 39 Zyklen von je 95 °C für 5 s und 57 °C für 30 s. Nach jedem Zyklus wurde die SYBR®-Fluoreszenz automatisch detektiert. Im Anschluss wurden die Schmelzkurven der erhaltenen PCR-Produkte bestimmt, indem die Ansätze von 60 °C auf 90 °C mit einer Temperaturzunahme von 0.5 °C/4 s erhitzt wurden. Auch hier erfolgte die Detektion der Fluoreszenz im SYBR-Kanal nach jedem Schritt. Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Software *CFX Manager*™ vorgenommen.

7.2.3 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Restriktionen von PCR-Produkten (7.2.2, 7.2.5) oder Plasmiden für eine anschließende Ligation (7.2.4) wurden mittels FastDigest™ Enzymen nach Herstellerangaben vorgenommen. Bei Restriktionen mit zwei unterschiedlich aktiven Enzymen erfolgte zunächst die Inkubation mit dem weniger aktiven Enzym, bevor das zweite Enzym hinzugegeben wurde. Wenn möglich (unter Berücksichtigung der Star-Aktivität), wurde die vom Hersteller angegebene Inkubationszeit verdoppelt bis versechsfacht. Bei der Restriktion von Plasmiden erfolgte zusätzlich eine Dephosphorylierung mittels FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase nach Herstellerangaben, um die Re-Ligation zu verhindern.

Mittels des Restriktionsenzym DpnI wurde die Templat-DNA einer QuikChange®- (7.2.2.1) oder Megaprimer-PCR (7.2.2.2) restringiert, während das unmethylierte PCR-Produkt erhalten wurde. Pro PCR wurde 1 Unit Enzym hinzugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte anhand einer fünfminütigen Inkubation bei 80 °C, bevor die DNA in kompetente *E. coli* TOP10 Zellen eingebracht wurde (7.1.3).

7.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden (7.2.3) wurde die T4 DNA Ligase nach Herstellerangaben verwendet, wobei 100 ng Vektor und ein fünffacher molarer Überschuss des Inserts eingesetzt wurden. Die Ligation erfolgte bei einer Temperatur von 22 °C für zwei Stunden, gefolgt von einer zehnstündigen Inkubation bei 16 °C. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 65 °C zur Inaktivierung des Enzyms wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert (7.1.3).

7.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung von DNA nach Amplifikation (7.2.2) oder Restriktion (7.2.3) erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* Kit nach Herstellerangaben. Für die Elution wurden 20-25 µL ddH₂O eingesetzt.

Zur Reinigung der Kappen-tragenden RNA (7.2.13) wurde das *RNA Clean & Concentrator™* Kit verwendet und die RNA in 12 µL ddH₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (7.2.15).

7.2.6 Homologe Rekombination

Für die Einführung der *gfp1-9* Genkassette in das Genom von *E. coli* Zellen, wurde sich des Protokolls von Datsenko und Wanner zur Herstellung von Gen-Knockout-Mutanten bedient.^[305] Dieses beruht auf der homologen Rekombination, bei der mittels der λ Red Rekombinase, bestehend aus den Enzymen Red α , Red β und Red γ , ein Zielgen gegen eine Kanamycin-Kassette ausgetauscht wird.^[305] Hierzu wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen zunächst mit dem das λ Red Rekombinase codierenden Plasmid pKD46 transformiert, bei 30 °C kultiviert und erneut elektrokompotent gemacht (7.1.3). Die in Plasmid pSJK1 enthaltene Genkassette wurde mittels PCR mit den homologen Überhängen versehen, die den Ort der Rekombination im Chromosom von *E. coli* definieren (7.2.2). Hierzu wurden die Oligonukleotidpaare HB-A1/HB-A2, HB-B1/HB-B2 und HB-C1/HB-C2 verwendet. BL21(DE3) pKD46 Zellen wurden mit jeweils 50 ng des gereinigten PCR-Produkts (7.2.5) transformiert und auf LB-Kan-Platten kultiviert (7.1.1). Zur Verifizierung, ob das temperaturlabile Plasmid pKD46 in diesem Schritt entfernt wurde, wurden die Zellen zusätzlich auf LB-Amp-Platten ausgestrichen (7.1.1). Die Überprüfung der homologen Rekombination erfolgte mittels Kolonie-PCR (7.2.2.4).

7.2.7 Trennung von Nukleinsäuren mittels Elektrophorese

Die Trennung von Nukleinsäuren erfolgte entsprechend ihrer Größe mittels Agarose- (7.2.7.1) oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7.2.7.2).

7.2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Trennung von PCR-Produkten (7.2.2) oder restringierten Plasmiden (7.2.3) entsprechend ihrer Länge wurde in Abhängigkeit der Fragmentgröße in 1-2 % Agarose (in TAE-Puffer) bei einer Spannung von 110 V in TAE-Puffer vorgenommen. Hierzu wurde der DNA-Ladepuffer verwendet. Anschließend erfolgte die Überprüfung mittels 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid)-Färbung (7.2.8).

7.2.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

RNA wurde nach Zugabe von RNA-Ladepuffer und fünfminütiger Inkubation bei 80 °C in 5-20 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Gelen analysiert und gereinigt. Für chemo-enzymatisch modifizierte RNAs (7.7.3) wurde ein entsprechender Puffer ohne Farbstoff verwendet und die RNA nicht erhitzt. Die Trennung erfolgte bei 10-20 W in TAE-Puffer nach 10-20 minütigem Vorlaufen des Gels bei 12 W. Die Zusammensetzung der denaturierenden Polyacrylamid-Gele war die Folgende: 5-20 % (v/v) Acrylamid/*N,N'*-Methylenbisacrylamid (19:1), 2-8 M Harnstoff, 0.1 % (v/v) TEMED, 0.08-0.17 % APS (v/v) in TAE-Puffer. Nach der präparativen Gelelektrophorese wurde ein UV-Shadowing (7.2.9) mit anschließender Elution (7.2.10) und Präzipitation (7.2.11) vorgenommen, wohingegen zu analysierende RNA lediglich mittels Ethidiumbromid visualisiert wurde (7.2.8). Für die Visualisierung chemo-enzymatisch modifizierter RNA wurde SYBR® Gold eingesetzt.

7.2.8 Visualisierung von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid oder SYBR® Gold

Nach gelelektrophoretischer Trennung von DNA (7.2.7.1) oder RNA (7.2.7.2) wurde diese 5-20 Minuten in Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt und anschließend in den Gelen durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 312$ nm visualisiert. Die Färbung chemo-enzymatisch modifizierter RNA erfolgte für 5 Minuten in SYBR® Gold-Färbelösung, die Visualisierung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 473$ nm (Filter: [LPB] (ch.1)).

7.2.9 UV-Shadowing

Zur Reinigung nicht Kappen-tragender RNA (7.2.13) wurde diese zunächst gelelektrophoretisch getrennt (7.2.7.2). Das entsprechende Polyacrylamid-Gel wurde mit Plastikfolie umwickelt, auf einer

fluoreszierenden Dünnschichtchromatographie-Platte platziert und die RNA anhand von UV-Licht visualisiert. Der entsprechende Bereich des Gels wurde ausgeschnitten und die RNA eluiert (7.2.10).

7.2.10 Elution von RNA aus Polyacrylamid-Gelen

Zur Elution von RNA aus Polyacrylamid-Gelen (7.2.9), wurden die entsprechenden Gelstücke zunächst zerkleinert, mit 500 µL RNA Elutionspuffer versetzt und 30 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C und 900 rpm im Thermomixer inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Elution wiederholt. Im Anschluss erfolgte die Präzipitation der RNA (7.2.11).

7.2.11 RNA-Präzipitation

Nach der Elution von RNA aus Polyacrylamid-Gelen (7.2.10), nach der Isolierung aus *E. coli* Zellen (7.2.12), nach der T7-Transkription (7.2.13), oder der enzymatischen (7.6.1) oder chemischen Modifizierung (7.7.3) wurde die RNA mittels Isopropanol gefällt. Die Proben wurden jeweils mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5.5 und mit 1 Volumen -20 °C kaltem Isopropanol versetzt. Anschließend wurden jeweils 0.5-1 µL Glycogen hinzugegeben und die Proben mindestens zehn Stunden bei -20 °C gelagert. Dann erfolgte die Pelletierung der RNA bei 4 °C und 21000 g für 20 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, die RNA mit 100 µL Ethanol (70 %, -20 °C) versetzt und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet und in 20 µL ddH₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (7.2.15).

7.2.12 Isolierung von Total-RNA aus *E. coli* Zellen

Die Isolierung von Total-RNA aus *E. coli* Zellen wurde mittels heißer Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen. Hierzu wurde ein zuvor gefrorenes Pellet von jeweils 10 mL Kultur (7.1.1) mit 700 µL Lysepuffer (Tabelle 6.5) und mit 1/10 Volumen 10 % SDS (in ddH₂O) versetzt. Nach dreiminütiger Inkubation bei 65 °C wurde 1/30 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5.5 und ein Volumen Phenol, pH 4.5-5.0 hinzugegeben. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C, 900 rpm, bei der alle 40 s zehnmal invertiert wurde. Nach dreiminütiger Inkubation auf Eis wurde eine Phasentrennung bei 10000 g und 4 °C für fünf Minuten vorgenommen. Schließlich wurde die wässrige Phase entnommen und die Extraktion zunächst mit Phenol und abschließend mit Chloroform wiederholt. Die RNA der vereinten wässrigen Phasen wurden mittels Isopropanol präzipitiert (7.2.11).

7.2.13 *In vitro* T7-Transkription

Die Herstellung von RNA erfolgte mittels Transkription *in vitro* unter Verwendung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Hierbei wurden entweder PCR-Amplifikate der zu transkribierenden DNA (7.2.2) oder synthetische Oligonukleotide als Templat verwendet. Letztere wurden so designt, dass sie sowohl die revers-komplementäre Sequenz der herzustellenden RNA als auch die des T7-Promotors aufwiesen. Ein zweites Oligonukleotid enthielt lediglich die T7-Promotorregion. Jeweils 5 µM dieser Oligonukleotide wurden in einem Endvolumen von 100 µL in PCR-Puffer zusammengegeben und der Ansatz fünf Minuten bei 80 °C inkubiert. Nach langsamer Abkühlung auf 20 °C (1 °C/min), wurde dieser Hybridisierungsansatz für die T7-Transkription eingesetzt. Der Reaktionsansatz für eine klassische T7-Transkription ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 7.2: Reaktionsansatz einer T7-Transkription.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA-Templat	5 µL Hybridisierungsansatz	
NTPs [je 25 mM]	10 µL	2.5 µM
Transkriptionspuffer 1 (3x)	33 µL	1x
Mg(Oac) ₂ [500 mM]	3 µL	15 mM
T7 RNA Polymerase [20 U/µL]	1 µL	0.2 U/µL
ddH ₂ O	ad. 100 µL	

Für die Herstellung Kappen-tragender RNA wurde zusätzlich zu dem Nukleosidtriphosphat-Mix das Anti-Reverse Kappen-Analogon (ARCA) eingesetzt. Dessen Methoxygruppe am 3'-Kohlenstoffatom bewirkt den korrekten Einbau der Kappe während der Transkription. Der entsprechende Reaktionsansatz ist in Tabelle 7.3 dargestellt.

Die Reaktionsansätze wurden in Abhängigkeit von der zu erwarteten Länge der RNAs zwei bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei der Herstellung Kappen-tragender RNAs wurde zusätzlich 1 µL Pyrophosphatase (0.1 U/µL) nach 15 min Reaktionszeit hinzugegeben. Im Anschluss an die klassische T7-Transkription erfolgte die Präzipitation der RNA (7.2.11). Kappen-tragende RNAs wurden mittels Kit gereinigt (7.2.5).

Tabelle 7.3: Reaktionsansatz zur Herstellung Kappen-tragender RNA.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA-Templat	12 µL DNA-Amplifikat	
NTPs: ATP/CTP/UTP [5 mM], GTP [1 mM]	2.5 µL	0.5/0.1 mM
ARCA [10 mM]	2.5 µL	1 mM
Transkriptionspuffer 2 (5x)	5 µL	1x
RiboLock™ [40 U/µL]	1 µL	1.6 U/µL
T7 RNA Polymerase [20 U/µL]	2 µL	1.6 U/µL

7.2.14 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription der aus *E. coli* isolierten Total-RNA (7.2.12) in cDNA wurden jeweils 2 µg Total-RNA eingesetzt und zunächst eventuell vorhandene DNA entfernt. Der Reaktionsansatz für den DNase-Abbau ist in Tabelle 7.4 zusammengefasst.

Tabelle 7.4: Reaktionsansatz des DNase-Abbaus vor einer reversen Transkription.

Komponente	Volumen/Menge	Endkonzentration
Total-RNA	2 µg	65 ng/µL
DNase Puffer (10x)	3 µL	0.97x
DNase I, RNase frei [1 U/µL]	8 µL	0.26 U/µL
ddH ₂ O	ad. 31 µL	

Nach 2.5-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden 2 µL EDTA (50 mM) hinzugegeben und die Proben 10 min bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurden jeweils 10 µL der Proben mit 3.75 µL ddH₂O und 0.25 µL des revers-komplementären Oligonukleotids hb-N5G_rev (100 µM) versetzt. Als Referenzgen für die relative Quantifizierung wurde *idnT* verwendet,^[329] und in einem analogen Ansatz der Primer IdnT_rev eingesetzt. Nach erneuter zehnminütiger Inkubation bei 70 °C wurden 5 µL RT Puffer und 0.8 µL dNTP-Mix (je 25 mM) hinzugegeben und die Ansätze 2 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufteilung auf jeweils 2x 12 µL, die entweder mit 0.15 µL Maxima H Minus Reverse Transkriptase oder derselben Menge ddH₂O versetzt wurden. Die Reaktion wurde bei 50 °C für 1 h, und die Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 10 min durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde für eine qRT-PCR eingesetzt (7.2.2.5).

7.2.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe von UV/Vis-Spektroskopie und der Software *i-control*TM wurde die Konzentration von Nukleinsäuren ermittelt. Hierzu wurde 1 µL der Probe auf eine *NanoQuant Platte*TM gegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260/280 nm im Plattenlesegerät *Tecan Infinite® M200 PRO* oder *M1000 PRO* gemessen.

7.2.16 Northern Blot

Jeweils 10 µg isolierte Total-RNA (7.2.12) wurden in einem 10 %igen PAA-Gel getrennt (7.2.7.2), mittels Ethidiumbromid-Färbung visualisiert (7.2.8) und anschließend mit Hilfe einer Blotting Apparatur auf eine positiv geladene Nylon-Membran transferiert. Hierfür wurden sowohl die Membran als auch die Whatman® Papiere zuvor in TAE-Puffer getränkt. Der Transfer wurde bei 80 mA für 1-1.5 Stunden durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran 1.5 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um ein Crosslinking der RNA zu erreichen. Die freien Bindestellen wurden blockiert, indem die Membran eine Stunde bei 65 °C mit 10 mL Roti®-Hybri-Quick und 0.1 mg/mL Lachssperma-DNA im Hybridisierungssofen inkubiert wurde. Die mit dCTP [α -³²P] markierte Sonde (7.2.17) wurde drei Minuten bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert und zur Hybridisierungslösung gegeben. Bei wiederholter Verwendung der Sonde wurde die gesamte Hybridisierungslösung entsprechend erhitzt und direkt zur Membran gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte für 17-19 h bei 42 °C rotierend im Hybridisierungssofen. Nach Abnahme der Hybridisierungslösung wurde die Membran jeweils 10-20 Minuten zunächst mit 2x SSC, 0.1 % (w/v) SDS, dann mit 1x SSC, 0.1 % (w/v) SDS und anschließend mit 0.5x SSC, 0.1 % (w/v) SDS gewaschen um ungebundene Sonde zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt und 20 h in einer *Exposure Cassette* zusammen mit einem *Phosphor Screen* exponiert. Die Dokumentation erfolgte mittels Phosphorimager und die Auswertung anhand der Software *AIDA*.

7.2.17 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde für den Nachweis von RNA mittels Northern Blot (7.2.16) erfolgte mit Hilfe des *Amersham*TM *Megaprime*TM *DNA Labeling System* nach Herstellerangaben. Hierbei wird die Sonde unter Verwendung von randomisierten Hexanukleotiden und dem Einbau von dCTP [α -³²P] durch das Klenow-Fragment der Polymerase I synthetisiert. Das dazu benötigte DNA-Templat wurde zuvor mittels Restriktion von Plasmid pSJK15 mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und XhoI hergestellt (7.2.3) und mittels Agarose-Gelelektrophorese

gereinigt (7.2.7.1). Die markierte Sonde wurde anhand einer Micro Bio-Spin™ Säule nach Herstellerangaben gereinigt.

7.2.18 Klonierungen

Aufgrund der Komplexität einiger im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide werden deren Klonierungen im Folgenden detailliert beschrieben.

Bezüglich der Klonierung der Pumilio-Konstrukte und sämtlicher sie enthaltender Plasmide sollte an dieser Stelle folgendes Zitat von Adamala *et al.* erwähnt werden: *“The cloning of proteins like Pumilio, with highly repetitive structures, is challenging”*.^[292]

7.2.18.1 Klonierung von pSJK1

Plasmid pSJK1 enthält die *gfp1-9* Genkassette (s. Abbildung 3.1C), die anschließend mittels homologer Rekombination (7.2.6) in das Genom von *E. coli* BL21(DE3) integriert wurde. Zur Herstellung der Genkassette wurde zunächst der Bereich des konstitutiven Promotors des Bakteriophagen Lambda (λ P_L) amplifiziert. Als Templat dienten die synthetischen Oligonukleotide LPL1, welches unter Verwendung der Primer LPL1_fwd_fuse_FRT und LPL1_rev amplifiziert wurde, und LPL2, welches mittels der Oligonukleotide LPL2_fwd und LPL2_rev_fuse_GFP amplifiziert wurde (7.2.2). In einer dritten PCR wurden die Amplifikate mittels Assemblierungs-PCR miteinander zu λ P_L kombiniert (7.2.2.3). Das Gen für GFP1-9 wurde unter Verwendung des Plasmids pET28b+ GFP1-9 und den Primern GFP1-9_fwd_fuse_LPL und GFP1-9_rev_EcoRI amplifiziert (7.2.2). Die Amplifikate der λ P_L-Assemblierungs-PCR und der GFP1-9-PCR wurden in einer weiteren Assemblierungs-PCR zu λ P_L-*gfp1-9* kombiniert (7.2.2.3). Das Kanamycin-Resistenzgen (*Kan^R*) sowie die flankierenden Flippase-Erkennungssequenzen (FRT) wurden anhand der Primer FRT-Kan-FRT_fwd_BamHI und FRT-Kan-FRT_rev_fuse_LPL_25 und dem Templat pKD4 amplifiziert. Das Assemblierungs-PCR-Produkt λ P_L-*gfp1-9* und das PCR-Produkt FRT-*Kan^R*-FRT wurden in einer letzten Assemblierungs-PCR kombiniert (7.2.2.3). Das Produkt FRT-*Kan^R*-FRT- λ P_L-*gfp1-9* wurde mittels BamHI und EcoRI restringiert (7.2.3) und unter Verwendung der T4 DNA Ligase in pET22b+ eingebracht (7.2.4, pSJK1).

7.2.18.2 Klonierung von pSJK2

Zur Herstellung des Konstruktes Pum-S10-S11 wurde zunächst das Gen der WT Pum-HD unter Verwendung der Primer Pum_NdeI_fwd und Pum_rev_fuse_x und dem Templat pET22b+ HsPumHD amplifiziert. Das Genfragment für S10 wurde mit den Oligonukleotiden S10_fwd_fuse_x und S10_rev_fuse_S11 sowie Templat pET22b+ S10-Pum-WT hergestellt. Die Amplifikation des

Genfragments S11 erfolgte anhand der Primer S11_fwd_SK und S11_rev_XhoI und des Plasmids pET16b+ Pum-Var1-S11 als Templat. Die drei PCR-Produkte wurden in einer Assemblierungs-PCR zu Pum-S10-S11 kombiniert (7.2.2.3). Das Produkt wurde mit NdeI und XhoI restringiert und mittels Ligation in pET16b+ eingebracht (7.2.3, 7.2.4, pSJK2).

7.2.18.3 Klonierung von pSJK4 und pSJK7

Zur Klonierung der Fusionskonstrukte S10-WT und Var1-S11 in das Plasmid pACYCDuetTM-1 (Basis für pMB38) war das Beachten der Reihenfolge der einzelnen Insertionen essentiell. Daher wurde zunächst Var1-S11 anhand der Oligonukleotide His6_fwd_Mut_NcoI und S11_rev_NotI unter Verwendung von Templat pET16b+ Pum-Var1-S11 amplifiziert, um die Restriktionsschnittstelle für NdeI zwischen dem His-Tag und der Pum-HD zu entfernen (7.2.2). Das PCR-Produkt wurde mittels NcoI und NotI und anschließender DNA-Ligation anstelle von eGFP in die 1. Multiple Klonierungsstelle von Plasmid pMB38 eingebracht (7.2.3, 7.2.4, pSJK3).

S10-WT wurde unter Verwendung der Oligonukleotide S10_fwd_NdeI und His6_rev_Mut_XhoI und Templat pET22b+ S10-Pum-WT amplifiziert (7.2.2). Dies ermöglichte die Entfernung der ungewollten Restriktionsschnittstelle für XhoI zwischen dem His-Tag und der Pum-HD. Das PCR-Produkt wurde anhand von NdeI und XhoI und anschließender DNA-Ligation in die 2. Multiple Klonierungsstelle von Plasmid pSJK3 eingebracht (7.2.3, 7.2.4, pSJK4).

Für die zusätzliche Klonierung der Sequenz für die Ziel-RNA (im Kontext der *hb* RNA) in pSJK4, wurde die entsprechende Sequenz zunächst mittels N5G_fwd_XhoI_T7_prom, N5G_rev_XhoI und dem Templat pSK17-Hb-boxAB amplifiziert, um eine zusätzliche T7-Promotor-Region anzufügen (7.2.2). Das PCR-Produkt wurde mittels XhoI restringiert und hinter die 2. Multiple Klonierungsstelle von Plasmid pSJK4 eingebracht (7.2.3, 7.2.4, pSJK7). Die korrekte Orientierung des Inserts wurde mittels Kolonie-PCR verifiziert (7.2.2.4).

7.2.18.4 Klonierung von pSJK15, pSJK32 und pSJK33

Für den TetFC-Ansatz mit IPTG-unabhängiger RNA-Produktion (7.4.3.3) wurden sowohl die Sequenz für die Ziel-RNA boxAB als auch *tetR* und die *tetR*-Bindestelle tetO₂ in das Plasmid pRSFDuetTM-1 kloniert. Die Amplifikation von *tetR* erfolgte anhand der Oligonukleotide tetR_fwd_NdeI und tetR_rev_XhoI sowie dem Templat pTet-SpecR. Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels NdeI und XhoI restringiert und mit Hilfe der T4 DNA Ligase in pRSFDuetTM-1 kloniert (pSJK13). Die im Kontext der *hb* RNA vorliegende boxAB wurde unter Verwendung der Primer N5G_fwd_NcoI und

N5G_rev_Term_EcoRI und des Plasmids pSJK7 als Templat amplifiziert (7.2.2). Nach Restriktion des PCR-Produkts mit EcoRI und NcoI wurde es in das Plasmid pSJK13 eingebracht (7.2.3, 7.2.4, pSJK14). Für den letzten Klonierungsschritt wurde das Plasmid pSJK14 anhand der Primer pRSF_fwd_BamHI und pRSF_rev_BamHI linearisiert und dabei an beiden Enden mit jeweils einer BamHI-Restriktionsschnittstelle versehen. Außerdem wurde mit Hilfe der Oligonukleotide tetO_fwd_BamHI und tetO_rev_BamHI und dem Templat 2xtetO₂_revcomp das gewünschte Insert hergestellt. Anhand des Restriktionsenzym BamHI und anschließender DNA-Ligation wurde Plasmid pSJK15 erhalten (7.2.3, 7.2.4).

Die Plasmide pSJK32 und pSJK33 enthalten anstelle der Sequenz für Ziel-RNA boxAB die Sequenz für RNA boxGB beziehungsweise boxCB. Dies wurde erreicht, indem die entsprechende Sequenz mittels Megaprimer-PCR eingeführt wurde (7.2.2.2). Für die Herstellung der Megaprimer wurden die Oligonukleotide G2U_fwd beziehungsweise CCC_fwd und tetR_rev_XhoI und pSJK15 als Templat verwendet (7.2.2). Die PCR-Produkte wurden im Anschluss als Primer für die Herstellung von pSJK32 und pSJK33 verwendet (7.2.2.2).

7.2.18.5 Klonierung von pSJK20 und pSJK20c

Zur Stabilisierung der RNA boxAB wurde diese mit zwei terminalen Haarnadelstrukturen versehen. Hierzu wurde in einem ersten Schritt boxAB in das Plasmid pWH610L3F5F kloniert. Das Insert wurde anhand von PCR mit den Oligonukleotiden N5G_fwd_XbaI und N5G_rev_BglII und dem Templat pSJK14 hergestellt (7.2.2) und mittels XbaI und BglII in den Vektor eingebracht (7.2.3, 7.2.4, pSJK18). Das analoge Plasmid mit boxAC anstelle von boxAB wurde anhand einer QuikChange®-PCR mit dem Oligonukleotidpaar CCC_QS_fwd und CCC_QS_rev erhalten (7.2.2.1, pSJK18c).

Im Anschluss wurden die Konstrukte, bestehend aus boxAB oder boxAC, den Haarnadelstrukturen und dem in Plasmid pWH610L3F5F vorhandenem p_{tac}-Promotor anhand der Restriktion von pSJK18 und pSJK18c mit EcoRI und NcoI in pRSFDuet™-1 kloniert (7.2.3, 7.2.4, pSJK20, pSJK20c).

7.3 Proteinbiochemische Methoden

7.3.1 Rekombinante Produktion von Proteinen

Die Produktion der Proteine im Rahmen dieser Arbeit erfolgte rekombinant in *E. coli* Zellen. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit den entsprechenden Plasmiden transformiert (7.1.3) und kultiviert (7.1.1). Zur Produktion von Fusionsprotein S10(Y)-Var2 wurde die Temperatur der Vorkultur auf

30 °C herabgesetzt und bei der Induktion der Genexpression mit IPTG zusätzlich 1 % Ethanol hinzugegeben.

Es wurden Hauptkulturen im Maßstab von 200-1000 mL verwendet. Die verschiedenen Protokolle sind in Tabelle 7.5 zusammengefasst. Nach der Kultivierung und der Expression wurden die Zellen bei 3220 g und 4 °C pelletiert und bei -20 °C gelagert. Die anschließende Reinigung erfolgte entweder mittels Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, 7.3.2.1) oder bei Proteinen ohne His-Tag mittels Anionenaustauschchromatographie (IEC, 7.3.2.2) und anschließender Größenausschlusschromatographie (SEC, 7.3.2.3). Die Reinigung von GFP1-9 erfolgte dem Protokoll von Cabantous und Waldo entsprechend anhand der Rückfaltung aus Einschlusskörperchen (7.3.2.4).^[297]

Die parallele Produktion mehrerer Proteine im Rahmen der tetramolekularen Fluoreszenzkomplementierung *in vivo* ist in Kapitel 7.4.3 beschrieben.

Tabelle 7.5: Übersicht der Bedingungen zur rekombinanten Produktion von Proteinen.

Protein	Zellen	Medium	Induktion	IPTG	Proteinproduktion	Reinigung
Pum-S10-S11	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.5	0.16 mM	2 h, 37 °C, 220 rpm	IMAC
S10-WT	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM	3 h, 37 °C, 220 rpm ^a	IMAC
Var1-S11	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM	3 h, 37 °C, 220 rpm ^a	IMAC
S10-Var2	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM	3 h, 37 °C, 220 rpm ^b	IMAC
S10(Y)-WT	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM	3 h, 37 °C, 220 rpm	IMAC
S10(Y)-Var2	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM ^c	3 h, 37 °C, 220 rpm	IMAC
GFP1-9	BL21(DE3)	LB-Kan	2.5 h	1.6 mM	5 h, 37 °C, 220 rpm ^d	Rückfaltung
wsGFP	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM	4 h, 37 °C, 200 rpm	IEC + SEC
wsYFP	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM	4 h, 37 °C, 200 rpm	IEC + SEC
GlaTgs2-V34A	Tuner™(DE3)	2YT-Amp, pLacI	4 h	0.32 mM ^e	17 h, 17 °C, 200 rpm ^f	IMAC
		7.3 g/L Glucose				
MTAN	BL21(DE3)	LB-Amp	OD ₆₀₀ = 0.7	1.0 mM	3 h, 37 °C, 200 rpm ^g	IMAC
LuxS	BL21(DE3)	2YT-Kan	OD ₆₀₀ = 1.0	0.8 mM	6 h, 37 °C, 200 rpm ^f	IMAC
Pum-Tgs	BL21(DE3)	2YT-Amp	OD ₆₀₀ = 0.4	0.16 mM	3 h, 37 °C, 220 rpm	IMAC
		pLysS				

^a nach ^[302], ^b nach ^[135], ^c zusätzliche Zugabe von 1 % (v/v) Ethanol, ^d nach ^[297], ^e zusätzliche Zugabe von 2 % (v/v) Ethanol. ^f nach ^[384], ^g nach ^[384, 385].

7.3.2 Reinigung von Proteinen

Die Reinigung der Pumilio-Fusionsproteine sowie von GlaTgs2-V34A, MTAN und LuxS erfolgte basierend auf den His-Tags mittels Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Die GFP-Varianten wsGFP und wsYFP wurden mittels Anionenaustauschchromatographie (IEC, 7.3.2.2) und anschließender Größenausschlusschromatographie (SEC, 7.3.2.3) gereinigt. Sämtliche Chromatographiemethoden wurden mittels *ÄKTA purifier™ system* vorgenommen. Die Reinigung von GFP1-9 erfolgte aus Einschlusskörperchen (7.3.2.4).

Unabhängig von der Reinigungsmethode wurden die *E. coli* Zellpellets (7.3.1) zunächst in 10 mL Lysepuffer (s. Tabelle 6.6 für die proteinspezifischen Puffer) aufgenommen, und mittels Sonifikation aufgeschlossen. Je nach Pelletgröße wurde drei- bis viermal für 3 min auf Eis sonifiziert (30 % Amplitude, Intervall: 0.5 s/0.5 s), die unlöslichen Zelltrümmer bei 3220 g und 4 °C pelletiert und das Lysat filtriert (0.2 µm).

7.3.2.1 Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Für die IMAC wurden HisTrap™ FF 1 Säulen verwendet, welche zuvor in dem entsprechenden Binde-Puffer äquilibriert worden waren. Die Reinigung sämtlicher Pumilio-Fusionsproteine erfolgte anhand eines dreistufigen Programms mit folgenden Schritten: Schritt A: 6 % Elutionspuffer, Schritt B: 50 % Elutionspuffer, Schritt C: 100 % Elutionspuffer (s. Tabelle 6.6). Vor Schritt B, bei dem die Elution des Pumilio-Proteins erfolgte, wurde das System mit 50 % Elutionspuffer gespült um die Bildung eines Gradienten zu verhindern.

Die Proteine GlaTgs2-V34A, MTAN und LuxS wurden analog mit den in Tabelle 6.6 aufgeführten, proteinspezifischen Lyse-, Binde-, Elutions- und Dialysepuffern gereinigt. Es wurde ebenfalls ein dreistufiges Programm verwendet, bei dem bei Schritt A abweichend 10 % und bei Schritt B 30 % Elutionspuffer verwendet wurden.

Die entsprechenden Elutionsfraktionen wurden vereint und das Protein in einer Amicon® Ultra-15 Zentrifugalfiltereinheit mit dem proteinspezifischen Dialysepuffer dialysiert (s. Tabelle 6.6) und auf ein Volumen von ca. 200 µL konzentriert.

Die Überprüfung der Proteinreinigung erfolgte gelelektrophoretisch (7.3.3) mit anschließender Coomassie-Färbung (7.3.3.1) und mittels eines Western Blot (7.3.3.2). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Abhängigkeit von der Reinheit des Proteins (7.3.4).

7.3.2.2 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Die Reinigung der GFP-Variante wsGFP, welche keinen His-Tag trug, erfolgte in einem ersten Schritt anhand von Anionenaustauschchromatographie. Hierzu wurde das Zelllysate auf eine zuvor in GFP Bindepuffer äquilibrierte HiTrap Q HP Säule gegeben und die Proteine anhand eines Gradienten von 0-100 % GFP Elutionspuffer eluiert. Grün fluoreszierende Fraktionen wurden vereint, und mit Hilfe einer Amicon® Ultra-15 Zentrifugalfiltereinheit in TNG-Puffer^[297] dialysiert und konzentriert. Die Reinigung von wsYFP erfolgte analog, wobei hier aufgrund der schwächeren Fluoreszenz keine eindeutige Identifizierung der korrekten Elutionsfraktionen vorgenommen werden konnte. Aus diesem Grund wurden die analogen Fraktionen zur wsGFP-Reinigung verwendet. Im direkten Anschluss erfolgte die Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). Sowohl für die IEC, als auch für die SEC wurden die Proben weitestgehend mit Hilfe von Alufolie vor Licht und möglichem Photobleichen geschützt.

7.3.2.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Das konzentrierte Eluat der IEC (7.3.2.2) wurde auf eine zuvor in TNG-Puffer äquilibrierte Superdex™ 75 10/300 Säule gegeben, die grün/gelb fluoreszierenden Elutionsfraktionen vereint, und mit Hilfe einer Amicon® Ultra-15 Zentrifugalfiltereinheit in TNG-Puffer^[297] dialysiert und konzentriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand von SDS-PAGE (7.3.4.2) unter Verwendung von BSA als Standard.

7.3.2.4 Isolierung aus Einschlusskörperchen

Die Reinigung von GFP1-9 erfolgte nach dem Protokoll von Cabantous und Waldo zur Reinigung von GFP1-10,^[297] wobei auf die Verwendung des Reagenz BugBuster® verzichtet wurde. Stattdessen wurde die Sonifikation und Zentrifugation der Zellen (7.3.2) zweimal in 15 mL und einmal in 5 mL TNG-Puffer durchgeführt. Dieser Vorgang stellt sicher, dass alle löslichen Proteine entfernt werden, und lediglich die unlöslichen Proteine zurück bleiben. Das erhaltene Pellet wurde gewogen und in TNG-Puffer resuspendiert, sodass eine Pelletkonzentration von 75 mg/mL erhalten wurde. Aliquots von je 1 mL wurden 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets bei -20 °C gelagert. Jeweils ein Pellet wurde in 1 mL Denaturierungspuffer bei 37 °C unter Schütteln gelöst und zur Entfernung aggregierter Proteine 2 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Rückfaltung des Proteins in 25 mL TNG-Puffer gegeben, die Lösung vorsichtig invertiert und filtriert (0.2 µm). Aliquots von 1-2 mL wurden bei einer Temperatur

von -20 °C bis zu zwei Jahre gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Bradford-Test (7.3.4.1).

7.3.3 Elektrophoretische Trennung von Proteinen

Die Überprüfung der Proteinreinigung erfolgte gelelektrophoretisch mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), bei der die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt wurden. Hierfür wurden die Proben zunächst mit Protein Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100-130 V in Kathoden-/Anodenpuffer. Die Zusammensetzung der 10 %igen Gele ist in Tabelle 7.6 aufgeführt. Im Anschluss erfolgte die Detektion der Proteine mittels Coomassie-Färbung (7.3.3.1), und/oder Western Blot (7.3.3.2).

Tabelle 7.6: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgel	0.7 M Tris, pH 8.45, 4 % (v/v) Acrylamid/ <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid (37.5/1), 0.07 % (w/v) SDS, 0.06 % (v/v) APS, 0.06 % (v/v) TEMED
Trenngel	1 M Tris, pH 8.45, 10 % (v/v) Acrylamid/ <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid (37.5/1), 10 % (v/v) Glycerol, 0.1 % (w/v) SDS, 0.05 % (v/v) APS, 0.05 % (v/v) TEMED

7.3.3.1 Coomassie-Färbung von Proteinen

Zur Visualisierung der Proteine nach erfolgter SDS-PAGE (7.3.3) wurden diese mittels Coomassie gefärbt. Hierzu wurde das Gel zur Färbung zunächst 20 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend zur Entfärbung in 10 % Essigsäure geschwenkt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels Geldokumentationsanlage und der Software *LabImage 1D* für eine Quantifizierung der Proteinbanden (7.3.4.2), oder mit Hilfe einer Handkamera zur Geldokumentation.

7.3.3.2 Western Blot

Die Detektion His-Tag-tragender Proteine wurde mittels Western Blot realisiert. Hierzu wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE (7.3.3) in Abhängigkeit ihrer Größe getrennt und anschließend mittels *Semi-Dry Blotter* auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Blot erfolgte bei 80 mA für 45 min in Transferpuffer. Zur Blockierung der freien Bindungsstellen wurde die Membran zunächst 1 h in Blockierlösung geschwenkt. Nach Abnahme der Lösung wurde der primäre Antikörper *penta* His-IgG (1:2000 in 2 % (w/v) BSA in PBS) für 1 h hinzugegeben. Nach dreimaligem

Waschen der Membran für je 10 min mit PBST, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper *anti-mouse* IgG-AP (1:30000 in 2 % (w/v) BSA in PBS). Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran mit PBST erfolgte die Detektion der Proteine durch enzymatische Reaktion nach Zugabe von 10 mL Entwicklerlösung und jeweils 100 µL NBT- und BCIP-Lösung. Die Bandenentwicklung erfolgte unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde durch Abnahme der Reaktionslösung und Waschen der Membran mit ddH₂O gestoppt. Nach Lufttrocknung der Membran wurde diese mittels Handkamera dokumentiert.

7.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte basierend auf ihrer Reinheit. Die Konzentration von Proteinen, die erfolgreich gereinigt werden konnten, und die nach der SDS-PAGE keine weiteren Banden aufwiesen, wurde nach Bradford^[389] bestimmt (7.3.4.1). Die Konzentration der Proteine, bei denen dies nicht möglich war, und neben der korrekten Bande noch weitere Proteine vorhanden waren, wurde mittels SDS-PAGE ermittelt (7.3.4.2).

7.3.4.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde eine Dreifachbestimmung einer BSA-Standardreihe bekannter Konzentrationen in dem proteinspezifischen Dialysepuffer in Mikrotiterplatten angefertigt (2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0 mg/mL). Die zu bestimmenden Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung 1:5 und 1:10, oder 1:20 und 1:50 in dem entsprechenden Dialysepuffer verdünnt. Zu jeweils 15 µL der Proteinlösungen wurden 100 µL 1x Roti®-Quant gegeben, die Proben 10 min unter Lichtausschluss inkubiert und schließlich ihre Absorption bei 595 nm mittels *Tecan Infinite® M200 PRO* oder *M1000 PRO* bestimmt.

7.3.4.2 Konzentrationsbestimmung mittels SDS-PAGE

Zur Konzentrationsbestimmung mittels SDS-PAGE wurden jeweils zwei unterschiedliche Konzentrationen der Probe in Doppelbestimmung parallel mit vier Proben eines Standards (BSA, 1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL und 0.02 mg/mL) gelelektrophoretisch getrennt (7.3.3) und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (7.3.3.1). Die Konzentration der entsprechenden Proteinbande wurde mit Hilfe der Software *LabImage 1D* ermittelt. Für die Pumilio-Fusionsproteine wurde ein kombinierter Ansatz gewählt, bei dem die Konzentrationsbestimmung zunächst nach Bradford (7.3.4.1) und anschließend mittels SDS-PAGE erfolgte.

7.4 Bi- und tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC/TetFC)

7.4.1 BiFC

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) zum indirekten Nachweis von löslichem GFP1-9 erfolgte analog zur TetFC *in vitro* in schwarzen 384 Well Platten im *Tecan Infinite® M1000 PRO* (7.4.2). Es wurden jeweils 250 nM Pum-S10-S11 mit Lysat von 825 μ L *E. coli* Zellen ($OD_{600} = 2.5$, resuspendiert in TNG-Puffer) versetzt und die Messung analog zur im folgenden Kapitel beschriebenen TetFC vorgenommen (7.4.2).

7.4.2 TetFC *in vitro*

Für die tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung (TetFC) *in vitro* wurden die Pumilio-Fusionsproteine sowie die entsprechende(n) RNA(s) und in einer schwarzen 384 Well Platte vorgelegt. Die 30 minütige Inkubation erfolgte für Reaktionen, deren Verlauf über einen Zeitraum von bis zu 15 Stunden überprüft wurde, bei 22 °C, oder bei 8 °C für Reaktionen, bei denen die duale Komplementierung mit sowohl grünen als auch gelben Fluoreszenzsignalen detektiert wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe des Proteins GFP1-9. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten betrug, soweit nicht anders angegeben, 250 nM (RNA, Pumilio-Fusionsproteine) und 4.9 μ M (GFP1-9) in HEPES-Bindpuffer in einem Reaktionsvolumen von 50 μ L.

Für Experimente mit einem nicht-Ziel-RNA-Überschuss betrug die Konzentration der nicht-Ziel-RNA 250 nM (1:1) bis 2.5 μ M (10:1). Die weiteren Verhältnisse nicht-Ziel-RNA:Ziel-RNA waren 1:2 und 1:5. Für Experimente, bei denen die Ziel-RNA verdünnt wurde, betrug deren Konzentration 16-250 nM. Die Konzentration der Pumilio-Fusionsproteine betrug 250 nM. Für die Verdünnung von sowohl RNA als auch Pumilio-Fusionsproteinen betrug die Konzentration aller Komponenten 8-250 nM (mit Ausnahme von GFP1-9 (4.9 μ M)). Zur Präparation des HeLa-Zelllysats wurden die Zellen in TNG-Puffer mittels Sonifikation lysiert (30 % Amplitude). Zu jeder Probe wurde Lysat von jeweils $7.0 \cdot 10^4$ HeLa-Zellen gegeben, nachdem dieses mit GFP1-9 zusammengegeben und zusätzlich mit 0.5 U/ μ L RiboLock™ RNase Inhibitor versetzt worden war.

Die Detektion der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels *Tecan Infinite® M1000 PRO* ($\lambda_{ex} = 488$ nm, 9 nm Bandbreite, $\lambda_{em} = 530$ nm, 9 nm Bandbreite, Verstärkung = 129, oder λ_{ex} (GFP) = 488 nm, 5 nm Bandbreite, λ_{em} (GFP) = 512 nm, 5 nm Bandbreite und λ_{ex} (YFP) = 512 nm, 5 nm Bandbreite, λ_{em} (YFP) = 526 nm, 5 nm Bandbreite, Verstärkung = 180 sowie z-Position = 16000 μ m, Anzahl der Blitze = 50, 400 Hz). Bei Verlaufsmessungen wurde eine Stunde lang mit einem Intervall von zehn

Minuten gemessen und für weitere 14 h mit einem Intervall von 1 h. Bei den Endpunktmessungen erfolgte nach der Zugabe von GFP1-9 zunächst die Bestimmung der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = 0$, welche als Hintergrund von dem Wert der Endpunktmessung zum Zeitpunkt $t = 12$ -15 h subtrahiert wurde.

7.4.3 TetFC *in vivo*

7.4.3.1 Ansatz „Zwei Plasmide“

Elektrokompetente BL21(DE3) Zellen wurden zunächst mit dem Plasmid pSJK11 transformiert, erneut elektrokompetent gemacht und anschließend mit dem Plasmid pSJK7 transformiert (7.1.3). Die erhaltenen Zellen BL21(DE3) pSJK11+7 wurden zunächst in einer Vorkultur kultiviert und diese zur Inokulation der Hauptkultur verwendet (7.1.1). Diese wurde bei einer Temperatur von 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0.4 bei 600 nm (OD_{600}) kultiviert. Die rekombinante Proteinproduktion sowie die Produktion der Ziel-RNA wurden durch Zugabe von 0.16 mM IPTG induziert und die Zellen weitere 3 h bei 37 °C, oder 17 h bei 17 °C und 200 rpm kultiviert. Zur Analyse der RNA-Produktion wurde die Total-RNA isoliert und ein Northern Blot durchgeführt (7.2.12, 7.2.16). Die Untersuchung der Proteinproduktion erfolgte mittels Western Blot (7.3.3.2). Die Analyse der Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz erfolgte durchflusszytometrisch (7.5).

7.4.3.2 Ansatz „Stabilisierte RNA“

Analog zu dem auf zwei Plasmiden basierten Ansatz (7.4.3.1), wurden elektrokompetente BL21(DE3) pSJK11 Zellen zunächst mit dem Plasmid pSJK4 und anschließend mit pSJK20 oder 20c als Negativkontrolle transformiert. Die Zellen BL21(DE3) pSJK11+20 oder BL21(DE3) 11+20c wurden bei einer Temperatur von 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0.4-0.5 kultiviert, bevor 0.2-1.6 mM IPTG hinzugegeben wurden. Die Ziel-RNA- und Proteinproduktion erfolgte für 3 h bei 37 °C, oder für 15 h bei 17 °C und 200 rpm. Zur besseren GFP-Komplementierung wurden die Zellen nach der dreistündigen Kultivierung bei 37 °C weitere 12 h bei 8 °C und 90 rpm inkubiert. Zur Verifizierung der RNA wurde ein Northern Blot durchgeführt (7.2.12, 7.2.16). Die Analyse der Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz erfolgte durchflusszytometrisch (7.5).

7.4.3.3 Ansatz „Späte RNA-Produktion“

Für die TetFC mittels IPTG-unabhängiger Produktion der Ziel-RNA wurden elektrokompetente BL21(DE3) pSJK11 Zellen zunächst mit dem Plasmid pSJK4 transformiert, erneut elektrokompetent

gemacht und anschließend mit pSJK15 transformiert (7.1.3). Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und die rekombinante Produktion der Proteine durch Zugabe von 0.16 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0.4 induziert. Nach zwei Stunden erfolgten die Zugabe von 2.5-250 µg/mL ATC und eine weitere Kultivierung für 1.5 h bei 37 °C und 14 h bei 8 °C.

Zusätzlich wurde das von Valencia-Burton beschriebene Protokoll getestet, bei dem die *E. coli* Zellen zunächst bei 37 °C kultiviert werden und die Temperatur nach Zugabe von IPTG auf 17 °C gesenkt wird.^[321] Nach 14 h wurden die entsprechenden TC-Derivate hinzugegeben und die Zellen weitere 2 h kultiviert.

Zur Überprüfung der TetFC wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert (7.5). Bei erfolgreicher TetFC wurden die entsprechenden Zellen zunächst mit einer Negativkontrolle gemischt, anschließend mittels Fluss-Sortierung sortiert (7.5), erneut kultiviert und entweder mittels Antibiotika (Amp+Cam+Kan, Anzahl getesteten Kolonien $n > 120$), oder mittels Kolonie-PCR hinsichtlich der Anwesenheit der korrekten Plasmide analysiert ($n = 20$, 7.2.2.4).

7.5 Durchflusszytometrie und Fluss-Sortierung

Zur Überprüfung der TetFC *in vivo* (7.4.3) wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert und gegebenenfalls sortiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst zweimal bei 4 °C und 4000 *g* für 2.5 min pelletiert und in 500 µL PBS resuspendiert. Je nach Zelldichte wurden die Zellen anschließend im Verhältnis 1:5 bis 1:50 in PBS verdünnt. Die Analyse der Zellen erfolgte am BD FACSAria™ III mit einem 70 µm Strahlenregler und folgenden Einstellungen: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ (30 nm Bandbreite), SSC: 308, FSC: 176, FITC: 610, Schwellenwert: 1200, Flussrate: 1-8, Ereignisrate: 50-200 1/s, mind. 10000 Ereignisse. Die Wahl der verwendeten Gates erfolgte mit Hilfe von Positiv- und Negativkontrollen, die wsGFP produzierten, oder die kein zusätzliches Plasmid für die rekombinante Proteinproduktion trugen. Mithilfe der Parameter SSC/FSC wurde zunächst ein Gate für *E. coli* Zellen allgemein angelegt. Ereignisse, die innerhalb dieses Gates auftraten, wurden anschließend hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal analysiert. Für die Sortierung der Zellen wurden TetFC- mit Negativkontroll-Zellen (ohne Plasmid pSJK15) im Verhältnis 1:1 gemischt und diejenigen Ereignisse mit der höchsten (Anteil $< 0.5 \%$) Fluoreszenzintensität gewählt. Die Sortierung wurde anhand der Einstellung „Ausbeute“ und der Zwei-Wege-Sortierung in 3 mL vorgelegtes LB-Amp-Medium durchgeführt. Im Anschluss wurden die sortierten Zellen zunächst 30 min bei 37 °C und 200 rpm kultiviert, dann 34 µg/mL Chloramphenicol hinzugegeben und die Zellen weitere 12 h kultiviert. Zur Überprüfung der Effizienz

der TetFC wurden die Zellen zunächst auf LB-Agar-Platten ausgestrichen (7.1.1) und schließlich einer Kolonie-PCR unterzogen (7.2.2.4). Auf diese Weise wurde überprüft, ob es sich bei den sortierten (fluoreszenten) Zellen um die TetFC-Zellen oder um die Negativkontrolle handelte.

7.6 Biochemische Methoden

7.6.1 Enzymatische Modifizierung der 5'-Kappe

Die enzymatische Modifizierung der 5'-Kappen-Analoga $m^7\text{GTP}$ **1**, $m^7\text{GpppA}$ **5** und $m^7(3'\text{-O-Methyl})\text{GpppG}$ zu $m^{2,7}\text{GTP}$ **3**, $N^2\text{-Allyl-}m^7\text{GpppA}$ **7** und $N^2\text{-(Pent-2-en-4-ynyl)-}m^7(3'\text{-O-Methyl})\text{GpppG}$ erfolgte unter Verwendung der *G. lamblia* Trimethylguanosinsynthase-Variante V34A (GlaTgs2-V34A), oder den Fusionsproteinen aus GlaTgs2-V34A und WT-Pum (Pum-Tgs).

Zur Biokonversion von $m^7\text{GTP}$ **1** wurde ein für GlaTgs2-Varianten beschriebenes Protokoll verwendet.^[335] Hierzu wurden 2 μM der Pum-Tgs-Varianten (oder GlaTgs2-V34A als Referenz) mit 500 μM $m^7\text{GTP}$ **1** und 750 μM AdoMet **2** in PBS in einem Gesamtvolumen von 5 μL eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Perchlorsäure gestoppt und anschließend mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) überprüft (7.6.2).

Für die Biokonversion von $m^7\text{GpppA}$ **5** zu $N^2\text{-Allyl-}m^7\text{GpppA}$ **7** wurden, analog zur Umsetzung mit GlaTgs2-V34A,^[230, 234, 334, 335] 2-14 μM Pum-Tgs mit 1 mM $m^7\text{GpppA}$ **5** und 900 μM AdoPropen **6** in Anwesenheit von 3 μM MTAN und 3 μM LuxS in PBS in einem Gesamtvolumen von 5 μL 3 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben gestoppt und analysiert.

Die Biokonversion des ARCA $m^7(3'\text{-O-Methyl})\text{GpppG}$ erfolgte mittels 13.8 μM GlaTgs2-V34A in Anwesenheit von 1.14 μM AdoEnYn, 550 μM $m^7(3'\text{-O-Methyl})\text{GpppG}$, 3 μM MTAN und 3 μM LuxS in PBS in einem Gesamtvolumen von 5 μL für 3 h bei 37 °C. Die Reaktion wurde ebenfalls wie oben beschrieben gestoppt und analysiert.

Für die sequenzspezifische Modifizierung wurden zunächst 1.1-1.4 μM 5'-Kappen-tragende RNA mit Pum-Tgs im molaren Verhältnis von 1.2:1 (RNA/Pum-Tgs) und 2.7 U/ μL RiboLock™ 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde AdoEnYn im molaren Verhältnis von 3.2:1 (AdoEnYn/RNA) sowie 3 μM MTAN und 3 μM LuxS hinzugegeben. Das Gesamtvolumen betrug 15 μL . Die Reaktion erfolgte für 3 h bei 37 °C. Im Anschluss wurde die RNA mittels Isopropanol präzipitiert (7.2.11).

7.6.2 Überprüfung der modifizierten Kappen-Analoga mittels RP-HPLC

Nach Stoppen der Biokonversionen (7.6.1) wurden die Proben 1 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 21000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Jeweils 3 µL des Überstandes wurden auf eine NUCLEODUR® C18 Pyramid-Säule der Agilent 1260 *Infinity* HPLC gegeben und entsprechend des Protokolls von Monecke *et al.*^[341] mit einer Flussrate von 1 mL/min und mit einem Gradienten von 0-30 % (v/v) Acetonitril in Kaliumphosphat-Puffer über einen Zeitraum von 13 min nach einem isokratischen Schritt (5 min, 100 % (v/v) Kaliumphosphat-Puffer) eluiert. Die Detektion erfolgte anhand der Absorptionsmessung bei 260 und 300 nm.

7.7 Chemische Methoden

7.7.1 Synthese der Ado-Met Analoga

Die zweistufige Synthese des AdoMet-Analogon AdoPropen wurde nach Dalhoff *et al.*^[232] und die Synthese von AdoEnYn nach Peters *et al.*^[343] durchgeführt. Die anschließende Reinigung erfolgte mittels präparativer RP-HPLC (7.7.2).

7.7.2 Präparative RP-HPLC

Zur Reinigung der AdoMet Analoga AdoPropen und AdoEnYn wurde die präparative RP-HPLC unter Verwendung einer NUCLEODUR® C18 Pyramid-Säule eingesetzt.^[230] Die Elution der Probe erfolgte bei einer Flussrate von 5 mL/min und mit einem Gradienten von 0-7 % (v/v) Acetonitril (+ 0.01 % (v/v) Trifluoressigsäure, Puffer B) in Kaliumphosphat-Puffer (+ 0.01 % (v/v) Trifluoressigsäure, Puffer A). Die Detektion erfolgte anhand der Absorptionsmessung bei 260 nm. Die das gereinigte Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint, lyophilisiert und der getrocknete Feststoff in 60-80 µL ddH₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung wurde anhand der Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{260} = 15400 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ vorgenommen.^[232]

7.7.3 Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-(1,3)-Cycloaddition (CuAAC)

Zur chemischen Markierung penteninylierter RNA mit dem Farbstoff Cy5 anhand von CuAAC wurde die enzymatisch modifizierte und getrocknete RNA (7.6.1) zunächst in 1.2 µL PUS-Puffer und 4 µL Tris (200 mM, pH 8.0) aufgenommen. Jeweils 14.8 µL CuAAC Reaktionslösung wurden zur RNA gegeben und die Reaktion bei 22 °C für 10-30 min durchgeführt. Die Detektion der Cy5-markierten RNA erfolgte mittels Typhoon Scanner und den folgenden Einstellungen: Cy5-Kanal: $\lambda_{\text{ex}} = 635 \text{ nm}$,

Filter: [LPR (ch.2)] (ch.2), SYBR Gold: $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$, Filter: [LPB] (ch.1). Die Überlagerung der erhaltenen Signale erfolgte anhand der Software *ImageQuantTL*.

8 Literaturangaben

1. Jeffery, W.R., C.R. Tomlinson, and R.D. Brodeur, *Localization of actin messenger RNA during early ascidian development*. Dev Biol, 1983. **99**(2): p. 408-17.
2. Melton, D.A., *Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of Xenopus oocytes*. Nature, 1987. **328**(6125): p. 80-2.
3. Long, R.M., et al., *Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA*. Science, 1997. **277**(5324): p. 383-7.
4. Bertrand, E., et al., *Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast*. Mol Cell, 1998. **2**(4): p. 437-45.
5. Lawrence, J.B. and R.H. Singer, *Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins*. Cell, 1986. **45**(3): p. 407-15.
6. Januschke, J., et al., *Polar transport in the Drosophila oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation*. Curr Biol, 2002. **12**(23): p. 1971-81.
7. Lecuyer, E., et al., *Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function*. Cell, 2007. **131**(1): p. 174-87.
8. Bobola, N., et al., *Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells*. Cell, 1996. **84**(5): p. 699-709.
9. Paquin, N. and P. Chartrand, *Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(3): p. 105-11.
10. Condeelis, J. and R.H. Singer, *How and why does beta-actin mRNA target?* Biol Cell, 2005. **97**(1): p. 97-110.
11. Berleth, T., et al., *The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo*. EMBO J, 1988. **7**(6): p. 1749-56.
12. Johnstone, O. and P. Lasko, *Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos*. Annu Rev Genet, 2001. **35**: p. 365-406.
13. Martin, K.C. and A. Ephrussi, *mRNA localization: gene expression in the spatial dimension*. Cell, 2009. **136**(4): p. 719-30.
14. Mingle, L.A., et al., *Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 11): p. 2425-33.
15. Medioni, C., K. Mowry, and F. Besse, *Principles and roles of mRNA localization in animal development*. Development, 2012. **139**(18): p. 3263-76.
16. Crofts, A.J., et al., *The role of mRNA and protein sorting in seed storage protein synthesis, transport, and deposition*. Biochem Cell Biol, 2005. **83**(6): p. 728-37.
17. Keiler, K.C., *RNA localization in bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(2): p. 155-9.
18. Nevo-Dinur, K., et al., *Translation-independent localization of mRNA in E. coli*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1081-4.
19. Broude, N.E., *Analysis of RNA localization and metabolism in single live bacterial cells: achievements and challenges*. Mol Microbiol, 2011. **80**(5): p. 1137-47.
20. Forrest, K.M. and E.R. Gavis, *Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in Drosophila*. Curr Biol, 2003. **13**(14): p. 1159-68.
21. Gavis, E.R. and R. Lehmann, *Translational regulation of nanos by RNA localization*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 315-8.
22. Weil, T.T., et al., *Changes in bicoid mRNA anchoring highlight conserved mechanisms during the oocyte-to-embryo transition*. Curr Biol, 2008. **18**(14): p. 1055-61.

23. Buxbaum, A.R., G. Haimovich, and R.H. Singer, *In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(2): p. 95-109.
24. Lin, A.C. and C.E. Holt, *Local translation and directional steering in axons*. EMBO J, 2007. **26**(16): p. 3729-36.
25. Martin, K.C. and R.S. Zukin, *RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview*. J Neurosci, 2006. **26**(27): p. 7131-4.
26. Garner, C.C., R.P. Tucker, and A. Matus, *Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 674-7.
27. Rook, M.S., M. Lu, and K.S. Kosik, *CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage*. J Neurosci, 2000. **20**(17): p. 6385-93.
28. Dynes, J.L. and O. Steward, *Dynamics of bidirectional transport of Arc mRNA in neuronal dendrites*. J Comp Neurol, 2007. **500**(3): p. 433-47.
29. Shestakova, E.A., R.H. Singer, and J. Condeelis, *The physiological significance of beta -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7045-50.
30. Rossoll, W., et al., *Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons*. J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 801-12.
31. Bassell, G.J. and S.T. Warren, *Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function*. Neuron, 2008. **60**(2): p. 201-14.
32. Aulchenko, Y.S., et al., *Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1402-3.
33. Lyons, D.A., et al., *Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons*. Nat Genet, 2009. **41**(7): p. 854-8.
34. Tolino, M., M. Kohrmann, and M.A. Kiebler, *RNA-binding proteins involved in RNA localization and their implications in neuronal diseases*. Eur J Neurosci, 2012. **35**(12): p. 1818-36.
35. Schweizer Burguete, A., et al., *GGGGCC microsatellite RNA is neuritically localized, induces branching defects, and perturbs transport granule function*. Elife, 2015. **4**.
36. Miller, S., et al., *Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation*. Neuron, 2002. **36**(3): p. 507-19.
37. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas, 3rd, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends Biotechnol, 2013. **31**(7): p. 397-405.
38. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 2014. **346**(6213): p. 1258096.
39. Ozawa, T., et al., *Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells*. Nat Methods, 2007. **4**(5): p. 413-9.
40. Tilsner, J., et al., *Live-cell imaging of viral RNA genomes using a Pumilio-based reporter*. Plant J, 2009. **57**(4): p. 758-70.
41. Yamada, T., et al., *Visualization of nonengineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent probes*. Anal Chem, 2011. **83**(14): p. 5708-14.
42. Campbell, Z.T., C.T. Valley, and M. Wickens, *A protein-RNA specificity code enables targeted activation of an endogenous human transcript*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(8): p. 732-8.
43. Zhang, W., et al., *Treatment of type 1 myotonic dystrophy by engineering site-specific RNA endonucleases that target (CUG)(n) repeats*. Mol Ther, 2014. **22**(2): p. 312-20.
44. Brook, J.D., et al., *Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member*. Cell, 1992. **69**(2): p. 385.

45. Brook, J.D., et al., *Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member*. Cell, 1992. **68**(4): p. 799-808.
46. Mahadevan, M., et al., *Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene*. Science, 1992. **255**(5049): p. 1253-5.
47. Stafforst, T. and M.F. Schneider, *An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(44): p. 11166-9.
48. Daigle, N. and J. Ellenberg, *LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging*. Nat Methods, 2007. **4**(8): p. 633-6.
49. Montiel-Gonzalez, M.F., et al., *Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(45): p. 18285-90.
50. O'Connell, M.R., et al., *Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9*. Nature, 2014. **516**(7530): p. 263-6.
51. Wang, Y., et al., *Engineering splicing factors with designed specificities*. Nat Methods, 2009. **6**(11): p. 825-30.
52. Coquille, S., et al., *An artificial PPR scaffold for programmable RNA recognition*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5729.
53. Murata, Y. and R.P. Wharton, *Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in Drosophila embryos*. Cell, 1995. **80**(5): p. 747-56.
54. Zhang, B., et al., *A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the C. elegans hermaphrodite germ line*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 477-84.
55. Zamore, P.D., J.R. Williamson, and R. Lehmann, *The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins*. RNA, 1997. **3**(12): p. 1421-33.
56. Wickens, M., et al., *A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life*. Trends Genet, 2002. **18**(3): p. 150-7.
57. Lu, G. and T.M. Hall, *Alternate modes of cognate RNA recognition by human PUMILIO proteins*. Structure, 2011. **19**(3): p. 361-7.
58. 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*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 20945-53.
59. Barker, D.D., et al., *Pumilio is essential for function but not for distribution of the Drosophila abdominal determinant Nanos*. Genes Dev, 1992. **6**(12A): p. 2312-26.
60. Souza, G.M., A.M. da Silva, and A. Kuspa, *Starvation promotes Dictyostelium development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway*. Development, 1999. **126**(14): p. 3263-74.
61. Parisi, M. and H. Lin, *The Drosophila pumilio gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis*. Genetics, 1999. **153**(1): p. 235-50.
62. Lehmann, R. and C. Nusslein-Volhard, *Involvement of the pumilio gene in the transport of an abdominal signal in the Drosophila embryo*. Nature, 1987. **329**(6135): p. 167-170.
63. Lin, H. and A.C. Spradling, *A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary*. Development, 1997. **124**(12): p. 2463-76.
64. Asaoka-Taguchi, M., et al., *Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in Drosophila embryos*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(7): p. 431-7.
65. Wreden, C., et al., *Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA*. Development, 1997. **124**(15): p. 3015-23.

66. Sonoda, J. and R.P. Wharton, *Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio*. Genes Dev, 1999. **13**(20): p. 2704-12.
67. Cho, P.F., et al., *Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in Drosophila embryos*. Curr Biol, 2006. **16**(20): p. 2035-41.
68. Forbes, A. and R. Lehmann, *Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells*. Development, 1998. **125**(4): p. 679-90.
69. Tadauchi, T., et al., *Post-transcriptional regulation through the HO 3'-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF*. EMBO J, 2001. **20**(3): p. 552-61.
70. Kraemer, B., et al., *NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 1999. **9**(18): p. 1009-18.
71. Crittenden, S.L., et al., *A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2002. **417**(6889): p. 660-3.
72. Hayashi, Y., M. Hayashi, and S. Kobayashi, *Nanos suppresses somatic cell fate in Drosophila germline*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10338-42.
73. Kadyrova, L.Y., et al., *Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the Drosophila germline*. Development, 2007. **134**(8): p. 1519-27.
74. Subramaniam, K. and G. Seydoux, *nos-1 and nos-2, two genes related to Drosophila nanos, regulate primordial germ cell development and survival in Caenorhabditis elegans*. Development, 1999. **126**(21): p. 4861-71.
75. Wang, Z. and H. Lin, *Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2016-9.
76. Chen, D., et al., *Pumilio 1 suppresses multiple activators of p53 to safeguard spermatogenesis*. Curr Biol, 2012. **22**(5): p. 420-5.
77. Dubnau, J., et al., *The staufen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory*. Curr Biol, 2003. **13**(4): p. 286-96.
78. Mee, C.J., et al., *Regulation of neuronal excitability through pumilio-dependent control of a sodium channel gene*. J Neurosci, 2004. **24**(40): p. 8695-703.
79. Ye, B., et al., *Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in Drosophila peripheral neurons*. Curr Biol, 2004. **14**(4): p. 314-21.
80. Menon, K.P., et al., *The translational repressor Pumilio regulates presynaptic morphology and controls postsynaptic accumulation of translation factor eIF-4E*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 663-76.
81. Schweers, B.A., K.J. Walters, and M. Stern, *The Drosophila melanogaster translational repressor pumilio regulates neuronal excitability*. Genetics, 2002. **161**(3): p. 1177-85.
82. Vessey, J.P., et al., *Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules*. J Neurosci, 2006. **26**(24): p. 6496-508.
83. Saint-Georges, Y., et al., *Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2293.
84. Garcia-Rodriguez, L.J., A.C. Gay, and L.A. Pon, *Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 197-207.
85. Eliyahu, E., et al., *Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(1): p. 284-94.
86. Traven, A., et al., *The yeast PUF protein Puf5 has Pop2-independent roles in response to DNA replication stress*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10651.
87. Goldstrohm, A.C., et al., *PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(6): p. 533-9.
88. Parisi, M. and H. Lin, *Translational repression: a duet of Nanos and Pumilio*. Curr Biol, 2000. **10**(2): p. R81-3.

89. Zamore, P.D., et al., *The PUMILIO-RNA interaction: a single RNA-binding domain monomer recognizes a bipartite target sequence*. *Biochemistry*, 1999. **38**(2): p. 596-604.
90. Wang, X., et al., *Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain*. *Cell*, 2002. **110**(4): p. 501-12.
91. Opperman, L., et al., *A single spacer nucleotide determines the specificities of two mRNA regulatory proteins*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(11): p. 945-51.
92. Stumpf, C.R., J. Kimble, and M. Wickens, *A Caenorhabditis elegans PUF protein family with distinct RNA binding specificity*. *RNA*, 2008. **14**(8): p. 1550-7.
93. Tautz, D., *Regulation of the Drosophila segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres*. *Nature*, 1988. **332**(6161): p. 281-4.
94. Tautz, D. and C. Pfeifle, *A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback*. *Chromosoma*, 1989. **98**(2): p. 81-5.
95. Lehmann, R. and C. Nusslein-Volhard, *The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the Drosophila embryo*. *Development*, 1991. **112**(3): p. 679-91.
96. Nusslein-Volhard, C., H.G. Frohnhofer, and R. Lehmann, *Determination of anteroposterior polarity in Drosophila*. *Science*, 1987. **238**(4834): p. 1675-81.
97. Wang, C. and R. Lehmann, *Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila*. *Cell*, 1991. **66**(4): p. 637-47.
98. Macdonald, P.M., *The Drosophila pumilio gene: an unusually long transcription unit and an unusual protein*. *Development*, 1992. **114**(1): p. 221-32.
99. Weidmann, C.A. and A.C. Goldstrohm, *Drosophila Pumilio protein contains multiple autonomous repression domains that regulate mRNAs independently of Nanos and brain tumor*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(2): p. 527-40.
100. Sonoda, J. and R.P. Wharton, *Drosophila Brain Tumor is a translational repressor*. *Genes Dev*, 2001. **15**(6): p. 762-73.
101. Chagnovich, D. and R. Lehmann, *Poly(A)-independent regulation of maternal hunchback translation in the Drosophila embryo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(20): p. 11359-64.
102. Weidmann, C.A., et al., *The RNA binding domain of Pumilio antagonizes poly-adenosine binding protein and accelerates deadenylation*. *RNA*, 2014. **20**(8): p. 1298-319.
103. Suh, N., et al., *FBF and its dual control of gld-1 expression in the Caenorhabditis elegans germline*. *Genetics*, 2009. **181**(4): p. 1249-60.
104. Van Etten, J., et al., *Human Pumilio proteins recruit multiple deadenylases to efficiently repress messenger RNAs*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(43): p. 36370-83.
105. Hook, B.A., et al., *Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(21): p. 15430-8.
106. Blewett, N.H. and A.C. Goldstrohm, *A eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein promotes mRNA decapping and is required for PUF repression*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(20): p. 4181-94.
107. Olivas, W. and R. Parker, *The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast*. *EMBO J*, 2000. **19**(23): p. 6602-11.
108. Ahringer, J., et al., *The Caenorhabditis elegans sex determining gene fem-3 is regulated post-transcriptionally*. *EMBO J*, 1992. **11**(6): p. 2303-10.
109. Chritton, J.J. and M. Wickens, *A role for the poly(A)-binding protein Pab1p in PUF protein-mediated repression*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(38): p. 33268-78.
110. Deng, Y., R.H. Singer, and W. Gu, *Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation*. *Genes Dev*, 2008. **22**(8): p. 1037-50.

111. Nolde, M.J., et al., *The Caenorhabditis elegans pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1*. Dev Biol, 2007. **305**(2): p. 551-63.
112. Kedde, M., et al., *A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(10): p. 1014-20.
113. Miles, W.O., et al., *Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene*. Genes Dev, 2012. **26**(4): p. 356-68.
114. Galgano, A., et al., *Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3164.
115. Pique, M., et al., *A combinatorial code for CPE-mediated translational control*. Cell, 2008. **132**(3): p. 434-48.
116. Kaye, J.A., et al., *A 3'UTR pumilio-binding element directs translational activation in olfactory sensory neurons*. Neuron, 2009. **61**(1): p. 57-70.
117. Archer, S.K., et al., *Trypanosoma brucei PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000565.
118. Quenault, T., T. Lithgow, and A. Traven, *PUF proteins: repression, activation and mRNA localization*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(2): p. 104-12.
119. Gerber, A.P., D. Herschlag, and P.O. Brown, *Extensive association of functionally and cytotoically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast*. PLoS Biol, 2004. **2**(3): p. E79.
120. Campbell, Z.T., et al., *Cooperativity in RNA-protein interactions: global analysis of RNA binding specificity*. Cell Rep, 2012. **1**(5): p. 570-81.
121. Morris, A.R., N. Mukherjee, and J.D. Keene, *Ribonomic analysis of human Pum1 reveals cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): p. 4093-103.
122. Valley, C.T., et al., *Patterns and plasticity in RNA-protein interactions enable recruitment of multiple proteins through a single site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 6054-9.
123. Hafner, M., et al., *Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP*. Cell, 2010. **141**(1): p. 129-41.
124. Wilinski, D., et al., *RNA regulatory networks diversified through curvature of the PUF protein scaffold*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8213.
125. Hall, T.M., *Expanding the RNA-recognition code of PUF proteins*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(8): p. 653-5.
126. Zhu, D., et al., *A 5' cytosine binding pocket in Puf3p specifies regulation of mitochondrial mRNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20192-7.
127. Edwards, T.A., et al., *Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs*. Cell, 2001. **105**(2): p. 281-9.
128. Wang, X., P.D. Zamore, and T.M. Hall, *Crystal structure of a Pumilio homology domain*. Mol Cell, 2001. **7**(4): p. 855-65.
129. Cheong, C.G. and T.M. Hall, *Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13635-9.
130. Filipovska, A., et al., *A universal code for RNA recognition by PUF proteins*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(7): p. 425-7.
131. Dong, S., et al., *Specific and modular binding code for cytosine recognition in Pumilio/FBF (PUF) RNA-binding domains*. J Biol Chem, 2011. **286**(30): p. 26732-42.
132. Wang, Y., Z. Wang, and T.M. Tanaka Hall, *Engineered proteins with Pumilio/fem-3 mRNA binding factor scaffold to manipulate RNA metabolism*. FEBS J, 2013. **280**(16): p. 3755-67.

133. Choudhury, R., et al., *Engineering RNA endonucleases with customized sequence specificities*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1147.
134. Yoshimura, H., et al., *Fluorescent probes for imaging endogenous beta-actin mRNA in living cells using fluorescent protein-tagged pumilio*. ACS Chem Biol, 2012. **7**(6): p. 999-1005.
135. Rath, A.K., S.J. Kellermann, and A. Rentmeister, *Programmable design of functional ribonucleoprotein complexes*. Chem Asian J, 2014. **9**(8): p. 2045-51.
136. Zhang, C. and D.G. Muench, *A Nucleolar PUF RNA-binding Protein with Specificity for a Unique RNA Sequence*. J Biol Chem, 2015. **290**(50): p. 30108-18.
137. Chen, Y. and G. Varani, *Engineering RNA-binding proteins for biology*. FEBS J, 2013. **280**(16): p. 3734-54.
138. Aubourg, S., et al., *In Arabidopsis thaliana, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants*. Plant Molecular Biology, 2000. **42**(4): p. 603-613.
139. Small, I.D. and N. Peeters, *The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins*. Trends in Biochemical Sciences, 2000. **25**(2): p. 46-47.
140. Barkan, A., et al., *A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins*. PLoS Genet, 2012. **8**(8): p. e1002910.
141. Yagi, Y., et al., *Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57286.
142. Yin, P., et al., *Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins*. Nature, 2013. **504**(7478): p. 168-71.
143. Shen, C., et al., *Specific RNA recognition by designer pentatricopeptide repeat protein*. Mol Plant, 2015. **8**(4): p. 667-70.
144. Lu, G., S.J. Dolgner, and T.M. Hall, *Understanding and engineering RNA sequence specificity of PUF proteins*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(1): p. 110-5.
145. Wang, Y., et al., *Structural basis for specific recognition of multiple mRNA targets by a PUF regulatory protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20186-91.
146. Miller, M.T., J.J. Higgin, and T.M. Hall, *Basis of altered RNA-binding specificity by PUF proteins revealed by crystal structures of yeast Puf4p*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(4): p. 397-402.
147. Qiu, C., et al., *Divergence of Pumilio/fem-3 mRNA binding factor (PUF) protein specificity through variations in an RNA-binding pocket*. J Biol Chem, 2012. **287**(9): p. 6949-57.
148. Ryder, S.P., *Pumilio RNA recognition: the consequence of promiscuity*. Structure, 2011. **19**(3): p. 277-9.
149. Qiu, C., et al., *A divergent Pumilio repeat protein family for pre-rRNA processing and mRNA localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(52): p. 18554-9.
150. Szybalski, W., et al., *Class-II restriction enzymes--a review*. Gene, 1991. **100**: p. 13-26.
151. Engler, C., R. Kandzia, and S. Marillonnet, *A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3647.
152. Cermak, T., et al., *Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(12): p. e82.
153. Abil, Z., C.A. Denard, and H. Zhao, *Modular assembly of designer PUF proteins for specific post-transcriptional regulation of endogenous RNA*. J Biol Eng, 2014. **8**(1): p. 7.
154. Cooke, A., et al., *Targeted translational regulation using the PUF protein family scaffold*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 15870-5.
155. Cao, J., et al., *Bidirectional regulation of mRNA translation in mammalian cells by using PUF domains*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(19): p. 4900-4.
156. Graveley, B.R. and T. Maniatis, *Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing*. Mol Cell, 1998. **1**(5): p. 765-71.

157. Harper, S.J. and D.O. Bates, *VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 880-7.
158. Qiu, Y., et al., *The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease.* Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 6): p. 1207-13.
159. De Gregorio, E., T. Preiss, and M.W. Hentze, *Translational activation of uncapped mRNAs by the central part of human eIF4G is 5' end-dependent.* RNA, 1998. **4**(7): p. 828-36.
160. Cao, J., et al., *Light-inducible activation of target mRNA translation in mammalian cells.* Chem Commun (Camb), 2013. **49**(75): p. 8338-40.
161. Cao, J., et al., *A universal strategy for regulating mRNA translation in prokaryotic and eukaryotic cells.* Nucleic Acids Res, 2015. **43**(8): p. 4353-62.
162. Kennedy, M.J., et al., *Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells.* Nat Methods, 2010. **7**(12): p. 973-5.
163. Russo, A.J., et al., *E2F-1 overexpression in U2OS cells increases cyclin B1 levels and cdc2 kinase activity and sensitizes cells to antimitotic agents.* Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7253-60.
164. Roberts, R.J., *Restriction endonucleases.* CRC Crit Rev Biochem, 1976. **4**(2): p. 123-64.
165. Alwine, J.C., et al., *Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper.* Methods Enzymol, 1979. **68**: p. 220-42.
166. Job, C. and J. Eberwine, *Localization and translation of mRNA in dendrites and axons.* Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(12): p. 889-98.
167. Adams, M.D., et al., *Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.* Science, 1991. **252**(5013): p. 1651-6.
168. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.* Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 57-63.
169. Wilkie, G.S. and I. Davis, *Drosophila wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles.* Cell, 2001. **105**(2): p. 209-19.
170. Weil, T.T., R.M. Parton, and I. Davis, *Making the message clear: visualizing mRNA localization.* Trends Cell Biol, 2010. **20**(7): p. 380-90.
171. Pardue, M.L. and J.G. Gall, *Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **64**(2): p. 600-4.
172. Singer, R.H. and D.C. Ward, *Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinylated nucleotide analog.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(23): p. 7331-5.
173. Puvion-Dutilleul, F. and E. Puvion, *Non-isotopic electron microscope in situ hybridization for studying the functional sub-compartmentalization of the cell nucleus.* Histochem Cell Biol, 1996. **106**(1): p. 59-78.
174. Hougaard, D.M., H. Hansen, and L.I. Larsson, *Non-radioactive in situ hybridization for mRNA with emphasis on the use of oligodeoxynucleotide probes.* Histochem Cell Biol, 1997. **108**(4-5): p. 335-44.
175. Femino, A.M., et al., *Visualization of single RNA transcripts in situ.* Science, 1998. **280**(5363): p. 585-90.
176. Raj, A., et al., *Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells.* PLoS Biol, 2006. **4**(10): p. e309.
177. Raj, A. and S. Tyagi, *Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes.* Methods Enzymol, 2010. **472**: p. 365-86.
178. Zenklusen, D., D.R. Larson, and R.H. Singer, *Single-RNA counting reveals alternative modes of gene expression in yeast.* Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(12): p. 1263-71.
179. Dirks, R.W., et al., *Simultaneous detection of different mRNA sequences coding for neuropeptide hormones by double in situ hybridization using FITC- and biotin-labeled oligonucleotides.* J Histochem Cytochem, 1990. **38**(4): p. 467-73.

180. Kosman, D., et al., *Multiplex detection of RNA expression in Drosophila embryos*. Science, 2004. **305**(5685): p. 846.
181. Schumacher, J.A., et al., *Two-color fluorescent in situ hybridization using chromogenic substrates in zebrafish*. Biotechniques, 2014. **57**(5): p. 254-6.
182. Gandhi, S.J., et al., *Transcription of functionally related constitutive genes is not coordinated*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(1): p. 27-34.
183. Obika, S., et al., *Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar puckering*. Tetrahedron Letters, 1997. **38**(50): p. 8735-8738.
184. Koshkin, A.A., et al., *LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition*. Tetrahedron, 1998. **54**(14): p. 3607-3630.
185. Wiegant, J., et al., *Visualizing nucleic acids in living cells by fluorescence in vivo hybridization*. Methods Mol Biol, 2010. **659**: p. 239-46.
186. Fontenete, S., et al., *Hybridization-based detection of Helicobacter pylori at human body temperature using advanced locked nucleic acid (LNA) probes*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81230.
187. Fontenete, S., et al., *Towards Fluorescence In Vivo Hybridization (FIVH) Detection of H. pylori in Gastric Mucosa Using Advanced LNA Probes*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0125494.
188. Fontenete, S., et al., *Fluorescence In Vivo Hybridization (FIVH) for Detection of Helicobacter pylori Infection in a C57BL/6 Mouse Model*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148353.
189. Santangelo, P.J., et al., *Single molecule-sensitive probes for imaging RNA in live cells*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 347-9.
190. Tyagi, S. and F.R. Kramer, *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(3): p. 303-8.
191. Bratu, D.P., et al., *Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13308-13.
192. Kloc, M., et al., *Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of Xenopus oocytes*. Development, 2005. **132**(15): p. 3445-57.
193. Wang, W., et al., *Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(15): p. 4913-28.
194. Santangelo, P.J., et al., *Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(6): p. e57.
195. Wang, L., et al., *Locked nucleic acid molecular beacons*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(45): p. 15664-5.
196. Kang, W.J., et al., *Molecular beacon-based bioimaging of multiple microRNAs during myogenesis*. Biomaterials, 2011. **32**(7): p. 1915-22.
197. Molenaar, C., et al., *Linear 2' O-Methyl RNA probes for the visualization of RNA in living cells*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(17): p. E89-9.
198. Catrina, I.E., S.A. Marras, and D.P. Bratu, *Tiny molecular beacons: LNA/2'-O-methyl RNA chimeric probes for imaging dynamic mRNA processes in living cells*. ACS Chem Biol, 2012. **7**(9): p. 1586-95.
199. Tyagi, S. and O. Alsmadi, *Imaging native beta-actin mRNA in motile fibroblasts*. Biophys J, 2004. **87**(6): p. 4153-62.
200. Kohler, O., D.V. Jarikote, and O. Seitz, *Forced intercalation probes (FIT Probes): thiazole orange as a fluorescent base in peptide nucleic acids for homogeneous single-nucleotide-polymorphism detection*. Chembiochem, 2005. **6**(1): p. 69-77.
201. Kummer, S., et al., *PNA FIT-probes for the dual color imaging of two viral mRNA targets in influenza H1N1 infected live cells*. Bioconjug Chem, 2012. **23**(10): p. 2051-60.

202. Hovelmann, F., et al., *LNA-enhanced DNA FIT-probes for multicolour RNA imaging*. Chemical Science, 2016. **7**(1): p. 128-135.
203. Ikeda, S. and A. Okamoto, *Hybridization-sensitive on-off DNA probe: application of the exciton coupling effect to effective fluorescence quenching*. Chem Asian J, 2008. **3**(6): p. 958-68.
204. Ikeda, S., et al., *Exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent probes: multicolor detection of nucleic acids*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(35): p. 6480-4.
205. Okamoto, A., *Excitonic interaction: another photophysical process for fluorescence-controlled nucleic acid sensing*. Chem Rec, 2010. **10**(3): p. 188-96.
206. Kohler, O. and O. Seitz, *Thiazole orange as fluorescent universal base in peptide nucleic acids*. Chem Commun (Camb), 2003(23): p. 2938-9.
207. Lee, L.G., C.H. Chen, and L.A. Chiu, *Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis*. Cytometry, 1986. **7**(6): p. 508-17.
208. Ishiguro, T., et al., *Fluorescence detection of specific sequence of nucleic acids by oxazole yellow-linked oligonucleotides. Homogeneous quantitative monitoring of in vitro transcription*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(24): p. 4992-7.
209. Kubota, T., et al., *Sets of RNA repeated tags and hybridization-sensitive fluorescent probes for distinct images of RNA in a living cell*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e13003.
210. Hovelmann, F. and O. Seitz, *DNA Stains as Surrogate Nucleobases in Fluorogenic Hybridization Probes*. Acc Chem Res, 2016.
211. Okamoto, A., *ECHO probes: a concept of fluorescence control for practical nucleic acid sensing*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(12): p. 5815-28.
212. Briley, W.E., et al., *Quantification and real-time tracking of RNA in live cells using Sticky-flares*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(31): p. 9591-5.
213. Seferos, D.S., et al., *Nano-flares: probes for transfection and mRNA detection in living cells*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(50): p. 15477-9.
214. Nelles, D.A., et al., *Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9*. Cell, 2016. **165**(2): p. 488-96.
215. Luebke, K.J., R.P. Balog, and H.R. Garner, *Prioritized selection of oligodeoxyribonucleotide probes for efficient hybridization to RNA transcripts*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 750-8.
216. Monroy-Contreras, R. and L. Vaca, *Molecular beacons: powerful tools for imaging RNA in living cells*. J Nucleic Acids, 2011. **2011**: p. 741723.
217. Wansink, D.G., et al., *Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus*. J Cell Biol, 1993. **122**(2): p. 283-93.
218. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. Angew Chem Int Ed Engl, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
219. Tornøe, C.W., C. Christensen, and M. Meldal, *Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides*. J Org Chem, 2002. **67**(9): p. 3057-64.
220. Sletten, E.M. and C.R. Bertozzi, *Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(38): p. 6974-98.
221. Schulz, D. and A. Rentmeister, *Current approaches for RNA labeling in vitro and in cells based on click reactions*. Chembiochem, 2014. **15**(16): p. 2342-7.
222. Holstein, J.M. and A. Rentmeister, *Current covalent modification methods for detecting RNA in fixed and living cells*. Methods, 2016. **98**: p. 18-25.
223. Constantinesco, F., Y. Motorin, and H. Grosjean, *Characterisation and enzymatic properties of tRNA(guanine 26, N (2), N (2))-dimethyltransferase (Trm1p) from Pyrococcus furiosus*. J Mol Biol, 1999. **291**(2): p. 375-92.

224. Constantinesco, F., et al., *The tRNA(guanine-26,N2-N2) methyltransferase (Trm1) from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus: cloning, sequencing of the gene and its expression in Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(16): p. 3753-61.
225. Motorin, Y., et al., *Expanding the chemical scope of RNA:methyltransferases to site-specific alkynylation of RNA for click labeling*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(5): p. 1943-52.
226. Rostovtsev, V.V., et al., *A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(14): p. 2596-9.
227. Chen, X., et al., *HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower*. Development, 2002. **129**(5): p. 1085-94.
228. Plotnikova, A., et al., *Selective covalent labeling of miRNA and siRNA duplexes using HEN1 methyltransferase*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(39): p. 13550-3.
229. Hausmann, S. and S. Shuman, *Giardia lamblia RNA cap guanine-N2 methyltransferase (Tgs2)*. J Biol Chem, 2005. **280**(37): p. 32101-6.
230. Schulz, D., J.M. Holstein, and A. Rentmeister, *A chemo-enzymatic approach for site-specific modification of the RNA cap*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(30): p. 7874-8.
231. Cook, W.D., et al., *Thermal polymerization of thiol-ene network-forming systems*. Polymer International, 2007. **56**(12): p. 1572-1579.
232. Dalhoff, C., et al., *Synthesis of S-adenosyl-L-methionine analogs and their use for sequence-specific transalkylation of DNA by methyltransferases*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1879-86.
233. Hoyle, C.E. and C.N. Bowman, *Thiol-ene click chemistry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(9): p. 1540-73.
234. Holstein, J.M., D. Stummer, and A. Rentmeister, *Enzymatic modification of 5[prime or minute]-capped RNA with a 4-vinylbenzyl group provides a platform for photoclick and inverse electron-demand Diels-Alder reaction*. Chemical Science, 2015. **6**(2): p. 1362-1369.
235. Song, W., et al., *Selective functionalization of a genetically encoded alkene-containing protein via "photoclick chemistry" in bacterial cells*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(30): p. 9654-5.
236. Holstein, J.M., D. Schulz, and A. Rentmeister, *Bioorthogonal site-specific labeling of the 5'-cap structure in eukaryotic mRNAs*. Chem Commun (Camb), 2014. **50**(34): p. 4478-81.
237. Agard, N.J., J.A. Prescher, and C.R. Bertozzi, *A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(46): p. 15046-7.
238. Tomkuvienė, M., et al., *Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(14): p. 6765-73.
239. Beach, D.L., E.D. Salmon, and K. Bloom, *Localization and anchoring of mRNA in budding yeast*. Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 569-78.
240. Golding, I. and E.C. Cox, *RNA dynamics in live Escherichia coli cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11310-5.
241. Garcia, J.F. and R. Parker, *MS2 coat proteins bound to yeast mRNAs block 5' to 3' degradation and trap mRNA decay products: implications for the localization of mRNAs by MS2-MCP system*. RNA, 2015. **21**(8): p. 1393-5.
242. Bensidoun, P., et al., *Imaging single mRNAs to study dynamics of mRNA export in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Methods, 2016. **98**: p. 104-14.
243. Larson, D.R., et al., *Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene*. Science, 2011. **332**(6028): p. 475-8.
244. Chen, J., et al., *High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13535-40.

- 245. Takizawa, P.A. and R.D. Vale, *The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5273-8.
- 246. Brodsky, A.S. and P.A. Silver, *Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export*. RNA, 2000. **6**(12): p. 1737-49.
- 247. Lange, S., et al., *Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging*. Traffic, 2008. **9**(8): p. 1256-67.
- 248. Hocine, S., et al., *Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast*. Nat Methods, 2013. **10**(2): p. 119-21.
- 249. Yiu, H.-W., et al., *RNA Detection in Live Bacterial Cells Using Fluorescent Protein Complementation Triggered by Interaction of Two RNA Aptamers with Two RNA-Binding Peptides*. Pharmaceuticals, 2011. **4**(3): p. 494.
- 250. Ghoulal, B., et al., *ESCRT-II's involvement in HIV-1 genomic RNA trafficking and assembly*. Biol Cell, 2012. **104**(12): p. 706-21.
- 251. Wu, B., J. Chen, and R.H. Singer, *Background free imaging of single mRNAs in live cells using split fluorescent proteins*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 3615.
- 252. Valencia-Burton, M., et al., *RNA visualization in live bacterial cells using fluorescent protein complementation*. Nat Methods, 2007. **4**(5): p. 421-7.
- 253. Paige, J.S., K.Y. Wu, and S.R. Jaffrey, *RNA mimics of green fluorescent protein*. Science, 2011. **333**(6042): p. 642-6.
- 254. Strack, R.L., M.D. Disney, and S.R. Jaffrey, *A superfolder Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA*. Nat Methods, 2013. **10**(12): p. 1219-24.
- 255. Filonov, G.S., et al., *Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(46): p. 16299-308.
- 256. Lux, J., et al., *Malachite green derivatives for two-photon RNA detection*. Chembiochem, 2012. **13**(8): p. 1206-13.
- 257. Sunbul, M. and A. Jaschke, *Contact-mediated quenching for RNA imaging in bacteria with a fluorophore-binding aptamer*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(50): p. 13401-4.
- 258. Grate, D. and C. Wilson, *Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6131-6.
- 259. Babendure, J.R., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, *Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(48): p. 14716-7.
- 260. Arora, A., M. Sunbul, and A. Jäschke, *Dual-colour imaging of RNAs using quencher- and fluorophore-binding aptamers*. Nucleic Acids Research, 2015.
- 261. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
- 262. Shimomura, O., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. J Microsc, 2005. **217**(Pt 1): p. 1-15.
- 263. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 509-44.
- 264. Heim, R. and R.Y. Tsien, *Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer*. Curr Biol, 1996. **6**(2): p. 178-82.
- 265. Cubitt, A.B., et al., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 448-55.
- 266. Heim, R., D.C. Prasher, and R.Y. Tsien, *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12501-4.

267. Ghosh, I., A.D. Hamilton, and L. Regan, *Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(23): p. 5658-5659.
268. Zuhlke, R.D., et al., *Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels*. Nature, 1999. **399**(6732): p. 159-62.
269. Rizzuto, R., et al., *Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells*. Curr Biol, 1995. **5**(6): p. 635-42.
270. Hampton, R.Y., et al., *In vivo examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 828-33.
271. Feilmeier, B.J., et al., *Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2000. **182**(14): p. 4068-76.
272. Kain, S.R., et al., *Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization*. Biotechniques, 1995. **19**(4): p. 650-5.
273. Ormo, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-5.
274. Cody, C.W., et al., *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry, 1993. **32**(5): p. 1212-8.
275. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(10): p. 1246-51.
276. Ma, Y., et al., *The mechanism of cyclization in chromophore maturation of green fluorescent protein: a theoretical study*. J Phys Chem B, 2010. **114**(29): p. 9698-705.
277. Branchini, B.R., J.O. Lusins, and M. Zimmer, *A molecular mechanics and database analysis of the structural preorganization and activation of the chromophore-containing hexapeptide fragment in green fluorescent protein*. J Biomol Struct Dyn, 1997. **14**(4): p. 441-8.
278. Phillips, G.N., Jr., *Structure and dynamics of green fluorescent protein*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(6): p. 821-7.
279. Wachter, R.M., et al., *Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein*. Structure, 1998. **6**(10): p. 1267-77.
280. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
281. Goedhart, J., et al., *Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 751.
282. Fisher, A.C. and M.P. DeLisa, *Laboratory evolution of fast-folding green fluorescent protein using secretory pathway quality control*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2351.
283. Kneen, M., et al., *Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator*. Biophys J, 1998. **74**(3): p. 1591-9.
284. Bizzarri, R., et al., *Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies*. Biophys J, 2006. **90**(9): p. 3300-14.
285. Brakemann, T., et al., *A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(10): p. 942-7.
286. Mishin, A.S., et al., *The first mutant of the Aequorea victoria green fluorescent protein that forms a red chromophore*. Biochemistry, 2008. **47**(16): p. 4666-73.
287. Matz, M.V., et al., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 969-73.
288. Karasawa, S., et al., *Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 1): p. 307-12.

289. Wiedenmann, J., et al., *A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from Entacmaea quadricolor (Anthozoa, Actinaria)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11646-51.
290. Shcherbo, D., et al., *Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 741-6.
291. Day, R.N. and M.W. Davidson, *The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(10): p. 2887-921.
292. Adamala, K.P., D.A. Martin-Alarcon, and E.S. Boyden, *Programmable RNA-binding protein composed of repeats of a single modular unit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016.
293. Ozalp, C., E. Szczesna-Skorupa, and B. Kemper, *Bimolecular fluorescence complementation analysis of cytochrome p450 2c2, 2e1, and NADPH-cytochrome p450 reductase molecular interactions in living cells*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(9): p. 1382-90.
294. Nakagawa, C., et al., *Improvement of a Venus-based bimolecular fluorescence complementation assay to visualize bFos-bJun interaction in living cells*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011. **75**(7): p. 1399-401.
295. Kodama, Y. and C.D. Hu, *An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio*. Biotechniques, 2010. **49**(5): p. 793-805.
296. Zamyatnin, A.A., Jr., et al., *Assessment of the integral membrane protein topology in living cells*. Plant J, 2006. **46**(1): p. 145-54.
297. Cabantous, S. and G.S. Waldo, *In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP*. Nat Meth, 2006. **3**(10): p. 845-854.
298. Milech, N., et al., *GFP-complementation assay to detect functional CPP and protein delivery into living cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18329.
299. Horstman, A., et al., *A cautionary note on the use of split-YFP/BiFC in plant protein-protein interaction studies*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(6): p. 9628-43.
300. Shyu, Y.J. and C.D. Hu, *Fluorescence complementation: an emerging tool for biological research*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 622-30.
301. Cabantous, S., et al., *A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2854.
302. Kellermann, S.J., A.K. Rath, and A. Rentmeister, *Tetramolecular fluorescence complementation for detection of specific RNAs in vitro*. Chembiochem, 2013. **14**(2): p. 200-4.
303. Pedelacq, J.D., et al., *Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(1): p. 79-88.
304. Kellermann, S.J. and A. Rentmeister, *A FACS-based screening strategy to assess sequence-specific RNA-binding of Pumilio protein variants in E. coli*. Biol Chem, DOI: 10.1515/hsz-2016-0214, 2016.
305. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
306. Gerstle, K., et al., *The small RNA RybA regulates key-genes in the biosynthesis of aromatic amino acids under peroxide stress in E. coli*. RNA Biol, 2012. **9**(4): p. 458-68.
307. Pinheiro, L.B., et al., *Fluorescent reference strains of bacteria by chromosomal integration of a modified green fluorescent protein gene*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **77**(6): p. 1287-95.
308. Miao, H., et al., *Dual fluorescence system for flow cytometric analysis of Escherichia coli transcriptional response in multi-species context*. J Microbiol Methods, 2009. **76**(2): p. 109-19.
309. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
310. Novagen, *User Protocol TB340 Rev. D 0304*. 2004.

311. Rath, A.K., *Sequenzspezifische RNA-Detektion basierend auf dem RNA-bindenden Protein Pumilio*. 2014, Universität Hamburg.
312. Selinger, D.W., et al., *Global RNA half-life analysis in Escherichia coli reveals positional patterns of transcript degradation*. Genome Res, 2003. **13**(2): p. 216-23.
313. Emory, S.A., P. Bouvet, and J.G. Belasco, *A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in Escherichia coli*. Genes Dev, 1992. **6**(1): p. 135-48.
314. Blind, M., W. Kolanus, and M. Famulok, *Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3606-10.
315. Hunsicker, A., et al., *An RNA aptamer that induces transcription*. Chem Biol, 2009. **16**(2): p. 173-80.
316. Hunsicker, A., *Das TetR-induzierende Aptamer 12-1: Eine RNA als Transkriptionsaktivator*. 2009, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
317. Tolia, N.H. and L. Joshua-Tor, *Strategies for protein coexpression in Escherichia coli*. Nat Methods, 2006. **3**(1): p. 55-64.
318. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3406-15.
319. Kanehisa Laboratories. *KEGG PATHWAY Database*. 23.02.2016]; Available from: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?menu_type=pathway_modules&org=ebd.
320. Kellermann, S.J. and A. Rentmeister, *A genetically encodable system for sequence-specific detection of RNAs in two colors*. Chembiochem, 2016.
321. Valencia-Burton, M., et al., *Spatiotemporal patterns and transcription kinetics of induced RNA in single bacterial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16399-404.
322. Degenkolb, J., et al., *Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(8): p. 1591-5.
323. Scholz, O., et al., *Tet repressor induction without Mg²⁺*. Biochemistry, 2000. **39**(35): p. 10914-20.
324. Rasmussen, B., et al., *Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(11): p. 2306-11.
325. Shaikh, S. and L.F. Nicholson, *Optimization of the Tet-On system for inducible expression of RAGE*. J Biomol Tech, 2006. **17**(4): p. 283-92.
326. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
327. Zhou, X., et al., *Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution*. Gene Ther, 2006. **13**(19): p. 1382-90.
328. Pautke, C., et al., *Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling*. J Anat, 2010. **217**(1): p. 76-82.
329. Zhou, K., et al., *Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of Escherichia coli to protein overexpression by quantitative PCR*. BMC Mol Biol, 2011. **12**: p. 18.
330. Royant, A. and M. Noirclerc-Savoye, *Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein*. J Struct Biol, 2011. **174**(2): p. 385-90.
331. Morise, H., et al., *Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea*. Biochemistry, 1974. **13**(12): p. 2656-62.
332. Kellermann, S.J., *Etablierung einer Methode zur Detektion von RNA in vitro basierend auf Split-GFP und Pumilio*. 2012, Universität Hamburg.
333. Muttach, F. and A. Rentmeister, *A Biocatalytic Cascade for Versatile One-Pot Modification of mRNA Starting from Methionine Analogues*. Angew Chem Int Ed Engl, 2016. **55**(5): p. 1917-20.

- 334. Stummer, D., C. Herrmann, and A. Rentmeister, *Quantum Chemical Calculations and Experimental Validation of the Photoclick Reaction for Fluorescent Labeling of the 5' cap of Eukaryotic mRNAs*. ChemistryOpen, 2015. **4**(3): p. 295-301.
- 335. Holstein, J.M., D. Stummer, and A. Rentmeister, *Engineering Giardia lamblia trimethylguanosine synthase (GlaTgs2) to transfer non-natural modifications to the RNA 5'-cap*. Protein Eng Des Sel, 2015. **28**(6): p. 179-86.
- 336. Haase, D., *Sequenzspezifische Modifikation von RNA*. 2014, Universität Hamburg.
- 337. Chen, X., J.L. Zaro, and W.C. Shen, *Fusion protein linkers: property, design and functionality*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(10): p. 1357-69.
- 338. Sulej, A.A., et al., *Sequence-specific cleavage of the RNA strand in DNA-RNA hybrids by the fusion of ribonuclease H with a zinc finger*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(22): p. 11563-70.
- 339. Huston, J.S., et al., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5879-83.
- 340. Arai, R., et al., *Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein*. Protein Eng, 2001. **14**(8): p. 529-32.
- 341. Monecke, T., A. Dickmanns, and R. Ficner, *Structural basis for m7G-cap hypermethylation of small nuclear, small nucleolar and telomerase RNA by the dimethyltransferase TGS1*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(12): p. 3865-77.
- 342. Bacolla, A., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33011-9.
- 343. Peters, W., et al., *Enzymatic site-specific functionalization of protein methyltransferase substrates with alkynes for click labeling*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(30): p. 5170-3.
- 344. Stepinski, J., et al., *Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG*. RNA, 2001. **7**(10): p. 1486-95.
- 345. Laird-Offringa, I.A. and J.G. Belasco, *Analysis of RNA-binding proteins by in vitro genetic selection: identification of an amino acid residue important for locking U1A onto its RNA target*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11859-63.
- 346. Friesen, W.J. and M.K. Darby, *Specific RNA binding proteins constructed from zinc fingers*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(7): p. 543-6.
- 347. SenGupta, D.J., et al., *A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8496-501.
- 348. Fusco, D., et al., *Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells*. Curr Biol, 2003. **13**(2): p. 161-7.
- 349. Lionnet, T., et al., *A transgenic mouse for in vivo detection of endogenous labeled mRNA*. Nat Methods, 2011. **8**(2): p. 165-70.
- 350. Ponchon, L. and F. Dardel, *Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold*. Nat Methods, 2007. **4**(7): p. 571-6.
- 351. Redder, P., *How does sub-cellular localization affect the fate of bacterial mRNA?* Curr Genet, 2016.
- 352. Vogel, J. and B.F. Luisi, *Hfq and its constellation of RNA*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(8): p. 578-89.
- 353. Borogovac, A. and N.E. Broude, *Visualization of induced RNA in single bacterial cells*. Methods Mol Biol, 2011. **714**: p. 189-99.
- 354. Koh, Y.Y., et al., *Stacking interactions in PUF-RNA complexes*. RNA, 2011. **17**(4): p. 718-27.
- 355. Gupta, Y.K., et al., *Structures of human Pumilio with noncognate RNAs reveal molecular mechanisms for binding promiscuity*. Structure, 2008. **16**(4): p. 549-57.

356. Sepp, A. and Y. Choo, *Cell-free selection of zinc finger DNA-binding proteins using in vitro compartmentalization*. J Mol Biol, 2005. **354**(2): p. 212-9.
357. Chen, Y., J. Mandic, and G. Varani, *Cell-free selection of RNA-binding proteins using in vitro compartmentalization*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(19): p. e128.
358. Colcombet, J., et al., *Systematic study of subcellular localization of Arabidopsis PPR proteins confirms a massive targeting to organelles*. Rna Biology, 2013. **10**(9): p. 1557-1575.
359. Lurin, C., et al., *Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis*. Plant Cell, 2004. **16**(8): p. 2089-103.
360. Howard, M.J., et al., *Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(40): p. 16149-54.
361. Hu, C.D. and T.K. Kerppola, *Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(5): p. 539-45.
362. Miyawaki, A., et al., *Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2135-40.
363. Griesbeck, O., et al., *Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29188-94.
364. Kremers, G.J., et al., *Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius*. Biochemistry, 2006. **45**(21): p. 6570-80.
365. Nagai, T., et al., *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(1): p. 87-90.
366. Shyu, Y.J., et al., *Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions*. Biotechniques, 2006. **40**(1): p. 61-6.
367. Rizzo, M.A., et al., *An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(4): p. 445-9.
368. Shyu, Y.J., C.D. Suarez, and C.D. Hu, *Visualization of AP-1 NF-kappaB ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(1): p. 151-6.
369. Koushik, S.V., et al., *Cerulean, Venus, and VenusY67C FRET reference standards*. Biophys J, 2006. **91**(12): p. L99-L101.
370. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
371. Fan, J.Y., et al., *Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(1): p. 47-53.
372. Kamiyama, D., et al., *Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11046.
373. Young, B., et al., *pH-sensitivity of YFP provides an intracellular indicator of programmed cell death*. Plant Methods, 2010. **6**: p. 27.
374. Swaminathan, R., C.P. Hoang, and A.S. Verkman, *Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion*. Biophys J, 1997. **72**(4): p. 1900-7.
375. Willnow, S., et al., *A selenium-based click AdoMet analogue for versatile substrate labeling with wild-type protein methyltransferases*. Chembiochem, 2012. **13**(8): p. 1167-73.
376. Oran, A., *Chromatin profiling, DamID and the emerging landscape of gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(2): p. 157-64.

- 377. Brooks, J.E., R.M. Blumenthal, and T.R. Gingeras, *The isolation and characterization of the Escherichia coli DNA adenine methylase (dam) gene*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(3): p. 837-51.
- 378. Germann, S., et al., *DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling in vivo, and its use to identify putative LHP1 target loci*. Plant J, 2006. **48**(1): p. 153-63.
- 379. Minczuk, M., et al., *Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19689-94.
- 380. Saka, Y., et al., *Nuclear accumulation of Smad complexes occurs only after the midblastula transition in Xenopus*. Development, 2007. **134**(23): p. 4209-18.
- 381. Hiatt, S.M., et al., *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein interactions in Caenorhabditis elegans*. Methods, 2008. **45**(3): p. 185-91.
- 382. Abudayyeh, O.O., et al., *C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector*. Science, 2016.
- 383. Kibbe, W.A., *OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W43-6.
- 384. Schulz, D. and A. Rentmeister, *An enzyme-coupled high-throughput assay for screening RNA methyltransferase activity in E. coli cell lysate*. RNA Biol, 2012. **9**(5): p. 577-86.
- 385. Lee, J.E., et al., *Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of Escherichia coli 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 1): p. 150-2.
- 386. G. S. Waldo, S.C., *Protein-protein interaction detection system using fluorescent protein microdomains*, L. Los Alamos National Security, Editor. 2010: USA.
- 387. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
- 388. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
- 389. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- 390. *United Nations Economic Commission for Europe*. 03.05.2016]; Available from: <http://www.unesco.org/trans/danger/publi/ghs/pictograms.html>.

9 Anhang

9.1 Entsorgung

Gentechnisch veränderte Organismen sowie sämtliche mit ihnen kontaminierten Abfälle und Verbrauchsmaterialien wurden 20 Minuten bei 120 °C und 5 bar Dampfdruck autoklaviert. Die Entsorgung der verwendeten Chemikalien erfolgte nach ^[390].

9.2 Verwendete Gefahrstoffe nach GHS

Die verwendeten Gefahrstoffe, die dem global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) unterliegen, sind in Tabelle 9.1 aufgeführt. Zusätzlich wurden ATP [γ -³²P] und dCTP [α -³²P] verwendet, welche nicht dem GHS unterliegen.

Tabelle 9.1: Verwendete Gefahrstoffe nach GHS.

Bezeichnung	Piktogramme ^[390]	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril	 	225-302+312+332-319	210-240-302+352- 305+351+338-403+233
Acrylamid	 	340-350-301-312+332-315- 317-319-361f-372	201-280-302+352- 305+351+338-308+310
Allylbromid	   	225-301+331-314-400	210-240-273-280- 301+330+331-304+340- 305+351+338-308+310- 403+233
Ameisensäure	  	226-302-314-331-EUH071	210-280-301+330+331- 304+340-305+351+338- 308+310
Ampicillin, Natriumsalz		317-334	261-280-342+311
Anhydrotetracyclin	 	319-361d	264-281-305+351+338- 337+313
APS	  	272-302-315-317-319-334- 335	280-302+352-304+340- 305+351+338-342+311
Chloramphenicol		351	308+313
Chloroform	 	302-315-319-331-351-361d- 372	281-302+352-304+340- 305+P351+338-308+P310:
CuSO ₄	 	302-315-319-410	302+352-305+351+338

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 9.1: Verwendete Gefahrstoffe nach GHS.

Dichlormethan		351	201-202-281-308+313-405-501
Diethylether		224-302-336	210-243-403+233-EUH019+EUH066
DMF		360d-226-312+332-319:	201-210-302+352-305+351+338-308+313
DTT		302-315-319	302+350-305+351+338
EDTA		332-373	260-261-271-304+340-312
Essigsäure		290-226-314	210-280-301+330+331-305+351+338-309-310
Ethanol		225-319	210-240-305+351+338-403+233
Ethidiumbromid		302-330-341	280-260-308+311
Formamid		360d	308+313-281-501
Imidazol		302-314-360d	280-301+310-305+351+338
Isopropanol		225-319-336	210-233-305+351+338
Kanamycinsulfat		360d	281-260-308+313
Kupfer(I)-bromid		315-319-335	261-305+351+338
Methansulfonylchlorid		300+310+330-314-335	260-264-280-284-301+310-302+350
Methylenbisacrylamid		302	-
Minocyclin		315-319-335	261-305+351+338
Natriumhydroxid		290-314	280-301+330+331-305+351+338
2-Penten-4-yn-1-ol		315-319-335	361-280-305+351+228-304-340-405-501
Perchlorsäure		271-290-314	210-280-301+330+331-305+351+338

Tabelle wird fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 9.1: Verwendete Gefahrstoffe nach GHS.

Phenol (Roti® Aqua-Phenol)	  	314-341-373-301+311+331	201-280-304+340- 305+351+338-310
PMSF	 	301-314	280-305+351+338-310
Salzsäure konz.	 	290-314-335	280-301+330+331- 305+351+338
SDS	  	228-302+332-315-318-335- 412	210-280-302+352-304+341- 305+351+338
SYBR® Gold		227	210-280-370+387
TEMED	  	225-302+332-314	210-233-280-301+330+331- 305+351+330
TFA	 	314-332-412	271-273-301+330+331- 305+351+338-309+311
TRIS		315-319	302+352-305+351+338
Xylen Cyanol FF		319	262

9.3 Plasmidsequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide aufgeführt.

pSJK1

Für Plasmid pSJK1 ist der Bereich aufgeführt, der zwischen der BamHI- und der EcoRI-Restriktionsschnittstelle in pET22b+ eingefügt wurde:

```
GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAGATCCCC
TCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACG
GTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAG
CTTGCACTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAATTGCCAGCTGGG
GCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAG
GGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTGCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTC
CGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTT
CGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGA
GGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAA
GGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCC
ATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCG
CATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCG
CGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCC
TGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCG
CTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTG
TTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTC
TGGGGTTTCAAGATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAA
AGGTTGGGCTTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTT
CGCCATCCCGAGCTTCAAAGCGCTCTGAAGTTCTTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGG
AGGATATTTCATATGGGGATCTCTCACCTACCAACAATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTTCATATAAAAAACATAC
AGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATAACCACTGGCGGTGATACTGAGCACATCA
GCAGGACGCACTGACCACCATGAAGGTGACGCTCTTAAAAATTAAGCCCTGAAGAAGGGCAGCATTCAAAGCAGAAG
GCTTTGGGGTGTGTGATACGAAACGAAGCATTGGCGCTAATTTACCAACACTACTACGTTTTAACTGAAACAACTG
GAGACTGCCATGAGGAAAGGAGAAGAAGTTCCTACTGGAGTCGTCCCAATTCTTATTGAATTAGATGGTGATGTTAA
TGGGCACAAATTTTTTGTCCGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACAATCGGAAAACCTCAGCCTTAAATTTATTTGCA
CTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTCTGACCTATGGTGTTCAATGCTTTTCCCGTTAT
CCGGATCACATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATATTT
CAAAGATGACGGGACCTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAA
AGGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGACACAACTCGAGTACAACCTTAACTCACACAAAGTATAC
ATCACGGCAGACAAACAAATAATGGAATCAAAGCTAACTTCACAATTCGCCACAACGTTGAAGATGGTTCGGTTCA
ACTAGCAGACCATTATCAACAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCATAA
```

pSJK2

Für Plasmid pSJK2 ist der Bereich aufgeführt, der zwischen der XhoI- und der NdeI-Restriktionsschnittstelle in pET16b+ eingefügt wurde:

```
TTAGCTAGCATCTGTAATCCAGCAGCAGTTACATACTCAAGAAGGACCATGTGGTCACGCTTTTTCGTTGAGATCTT
TCGAAAGGATAGTTTGTGTCGACAGGTAATGGTCGTCTGGTAAATCCATGGAGCCACCGCCAGACCCAACGTCGGTA
CCCCCTAAGTCAACACCGTTCTTCATGTAGTACTTCTCCAGCTTGGCCAGAATGTGCTTGCCATAGGTGTACTTACG
AAGAGTTGCGATGTGGGGCCGGATCTTATGCATGACGATCTTCCGCTGGCCTGGCTCCGCCACGTCAATCATCTTCT
GGACCACGTAGTTGGCATACTGGTCCTTCATCATGGTGTATAAGGCACTGTGGGGACCGTCGTTTCATGGTGCACACC
TCATCGATGAGCACAGCGCGCTCCGTACGTGAGGCGTGAGTAACACACTTCTCCACAACATTGCTTGCAAATTTGTG
CTGACTCAATACAAGTACATTGCCTCGGATTTCTGCTACAATTTTGCTTTTATCCTCAGGACGACCGTGCTCCAGTA
CATGTTGGATTACATAATTTCCATATTGATCCTGTACAAGCTGCTCTGTGTGCTGGTGAAGCTCCTCTAAATAGGG
AGTGTCTGGTCAGGGAGACAGTGCTCCAGGATTCTCTGAATCACTCGGCAGCCATAAGGATGTGTGGATAAGGCAAA
```

TACCTGTCCCTTAAACGCATCGATGATAAATTGCAAAGACTGGGGCTGTACACATTCAATGCATTTCTGAACCACGT
 GATTGCCATTCTGATCTTTACACACTTCAAGACATGGCCATCTAGTTCCCGAACCATCTCATTCTGCTGGTCTGAA
 GGAATAAACTCAAGAGCTTTCTGGATAACACGGCAGCCATACATCTGTAGTGCCAATGACAGGACGTGGCCTCGAAT
 CCGTTCTGCCAAAGCCAGCTTCTGTTCAAGACTGCCAAATTCAAAGAACTTCTGAATGACGTAATTACCAAACACAT
 CCACCATGAGTTGGTAGGCAGCCTGGAGGATTTTCATTGAAGACAAGCTGGCGCTCAGCTGGTGTGGCAGCTCCAGT
 TTCAGCTGAATGAATCTGGACCCATGCTGGTCTTGGGAAAATTCCATTATATGTCCAGCAATCTCCCGCAGTTGTAA
 ATTGGGGTACCGGTTGTTTCGAAAATCTTCCAAAAGGCGGCTGCGGCC

pSJK4

1	GGGGAATTGT	GAGCGGATAA	CAATTCCCCT	GTAGAAATAA	TTTTGTTTTAA	CTTTAATAAG
61	GAGATATACC	ATGGGCCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCACAGCA	GCGGCCATAT
121	CGAAGGTCGT	CACATGGGCC	GCAGCCGCCT	TTTGGAAGAT	TTTCGAAACA	ACCGGTACCC
181	CAATTTACAA	CTGCGGGAGA	TTGCTGGACA	TATAATGGAA	TTTTCCCAAG	ACCAGCATGG
241	GTCCAGATTC	ATTGAGCTGA	AACTGGAGCG	TGCCACACCA	GCTGAGCGCC	AGCTTGTCTT
301	CAATGAAATC	CTCCAGGCTG	CCTACCAACT	CATGGTGGAT	GTGTTTGGTA	ATTACGTCAT
361	TCAGAAGTTC	TTTGAATTTG	GCAGTCTTGA	ACAGAAGCTG	GCTTTGGCAG	AACGGATTCTG
421	AGGCCACGTC	CTGTCATTGG	CACTACAGAT	GTATGGCTGC	CGTGTTATCC	AGAAAGCTCT
481	TGAGTTTATT	CCTTCAGACC	AGCAGAATGA	GATGGTTCGG	GAAGTAGATG	GCCATGTCTT
541	GAAGTGTGTG	AAAGATCAGA	ATGGCAATCA	CGTGGTTCAG	AAATGCATTG	AATGTGTACA
601	GCCCCAGTCT	TTGCAATTTA	TCATCGATGC	GTTTAAGGGA	CAGGTATTTG	CCTTATCCAC
661	ACATCCTTAT	GGCTGCCGAG	TGATTTCAGAG	AATCCTGGAG	CACTGTCTCC	CTGACCAGAC
721	ACTCCCTATT	TTAGAGGAGC	TTCACCAGCA	CACAGAGCAG	CTGGTACAGG	ATCAATATGG
781	AAGTTATGTA	ATCGAACATG	TACTGGAGCA	CGGTCTCTCT	GAGGATAAAA	GCAAAATTGT
841	AGCAGAAATC	CGAGGCAATG	TACTTGTATT	GAGTCAGCAC	AAATTTGCAA	ACAATGTTGT
901	GCAGAAGTGT	GTTACTCACG	CCTCACGTAC	GGAGCGCGCT	GTGCTCATCG	ATGAGGTGTG
961	CACCATGAAC	GACGGTCCCC	ACAGTGCCTT	ATACACCATG	ATGAAGGACC	AGTATGCCAA
1021	CTACGTGGTC	CAGAAGATGA	TTGACGTGGC	GGAGCCAGGC	CAGCGGAAGA	TCGTCATGCA
1081	TAAGATCCGG	CCCCACATCG	CAACTCTTCG	TAAGTACACC	TATGGCAAGC	ACATTCTGGC
1141	CAAGCTGGAG	AAGTACTACA	TGAAGAACGG	TGTTGACTTA	GGGGGATCCG	GTGGAGGGTC
1201	TGGTGGCGGA	TCAACTAGTG	AAAAGCGTGA	CCACATGGTC	CTTCTTGAGT	ATGTAAGTGC
1261	TGCTGGGATT	ACAGATGCTA	GCTAAGCGGC	CGCATAATGC	TTAAGTCGAA	CAGAAAGTAA
1321	TCGTATTGTA	CACGGCCGCA	TAATCGAAAT	TAATACGACT	CACTATAGGG	GAATTGTGAG
1381	CGGATAACAA	TTCCCCATCT	TAGTATATTA	GTTAAGTATA	AGAAGGAGAT	ATACATATGG
1441	ATTTACCAGA	CGACCATTAC	CTGTCGACAC	AAACTATCCT	TTCGAAAGAT	CTCAACGGTA
1501	CCGACGTTGG	GTCTGGCGGT	GGCTCCATGG	GCCGCAGCCG	CCTTTTGGA	GATTTTCGAA
1561	ACAACCGGTA	CCCCAATTTA	CAACTGCGGG	AGATTGCTGG	ACATATAATG	GAATTTTCCC
1621	AAGACCAGCA	TGGGTCCAGA	TTCATTGAGC	TGAAACTGGA	GCGTGCCACA	CCAGCTGAGC
1681	GCCAGCTTGT	CTTCAATGAA	ATCCTCCAGG	CTGCCTACCA	ACTCATGGTG	GATGTGTTTG
1741	GTAATTACGT	CATTTCAGAAG	TTCTTTGAAT	TTGGCAGTCT	TGAACAGAAG	CTGGCTTTGG
1801	CAGAACGGAT	TCGAGGCCAC	GTCCTGTCAT	TGGCACTACA	GATGTATGGC	TGCCGTGTTA
1861	TCCAGAAAGC	TCTTGAGTTT	ATTCCTTCAG	ACCAGCAGAA	TGAGATGGTT	CGGGAAGTAG
1921	ATGGCCATGT	CTTGAAGTGT	GTGAAAGATC	AGAATGGCAA	TCACGTGGTT	CAGAAATGCA
1981	TTGAATGTGT	ACAGCCCCAG	TCTTTGCAAT	TTATCATCGA	TGCGTTTAA	GGACAGGTAT
2041	TTGCCTTATC	CACACATCCT	TATGGCTGCC	GAGTGATTCA	GAGAATCCTG	GAGCACTGTC
2101	TCCCTGACCA	GACACTCCCT	ATTTTAGAGG	AGCTTCACCA	GCACACAGAG	CAGCTTGTAC
2161	AGGATCAATA	TGGAAATTAT	GTAATCCAAC	ATGTACTGGA	GCACGGTCGT	CCTGAGGATA
2221	AAAGCAAAAT	TGTAGCAGAA	ATCCGAGGCA	ATGTACTTGT	ATTGAGTCAG	CACAAATTTG
2281	CAAGCAATGT	TGTGGAGAAG	TGTGTTACTC	ACGCCTCACG	TACGGAGCGC	GCTGTGCTCA
2341	TCGATGAGGT	GTGCACCATG	AACGACGGTC	CCCACAGTGC	CTTATACACC	ATGATGAAGG
2401	ACCAGTATGC	CAACTACGTG	GTCCAGAAGA	TGATTGACGT	GGCGGAGCCA	GGCCAGCGGA
2461	AGATCGTCAT	GCATAAGATC	CGGCCCCACA	TCGCAACTCT	TCGTAAGTAC	ACCTATGGCA
2521	AGCACATTCT	GGCCAAGCTG	GAGAAGTACT	ACATGAAGAA	CGGTGTTGAC	TTAGGGCTGC
2581	AACACCACCA	CCACCACCAC	TGACTCGAGT	CTGGTAAAGA	AACCGTGGCT	GCGAAATTTG
2641	AACGACGCA	CATGGACTCG	TCTACTAGCG	CAGCTTAATT	AACCTAGGCT	GCTGCCACCG
2701	CTGAGCAATA	ACTAGCATAA	CCCTTGGGG	CCTCTAAACG	GGTCTTGAGG	GGTTTTTTGC
2761	TGAAACCTCA	GGCATTGTAG	AAGCACACGG	TCACACTGCT	TCCGGTAGTC	AATAAACCGG
2821	TAAACCAGCA	ATAGACATAA	GCGGCTATTT	AACGACCCTG	CCCTGAACCG	ACGACCGGGT

2881	CGAATTTGCT	TTCGAATTTT	TGCCATTTCAT	CCGCTTATTA	TCACTTATTC	AGGCGTAGCA
2941	CCAGGCGTTT	AAGGGCACCA	ATAACTGCCT	TAAAAAATT	ACGCCCCGCC	CTGCCACTCA
3001	TCGCAGTACT	GTTGTAATTC	ATTAAGCATT	CTGCCGACAT	GGAAGCCATC	ACAGACGGCA
3061	TGATGAACCT	GAATCGCCAG	CGGCATCAGC	ACCTTGTCGC	CTTGCGTATA	ATATTTGCCC
3121	ATAGTGAAAA	CGGGGGCGAA	GAAGTTGTCC	ATATTGGCCA	CGTTTAAATC	AAAACCTGGT
3181	AAACTCACCC	AGGGATTGGC	TGAGACGAAA	AACATATTCT	CAATAAACCC	TTTAGGGAAA
3241	TAGGCCAGGT	TTTCACCGTA	ACACGCCACA	TCTTGCGAAT	ATATGTGTAG	AAACTGCCGG
3301	AAATCGTCGT	GGTATTCACT	CCAGAGCGAT	GAAAACGTTT	CAGTTTGCTC	ATGGAAAACG
3361	GTGTAACAAG	GGTGAACACT	ATCCCATATC	ACCAGCTCAC	CGTCTTTCAT	TGCCATACGG
3421	AACTCCGGAT	GAGCATTTCAT	CAGGCGGGCA	AGAATGTGAA	TAAAGGCCGG	ATAAACTTGT
3481	TGCTTATTTT	TCTTTACGGT	CTTTAAAAAG	GCCGTAATAT	CCAGCTGAAC	GGTCTGGTTA
3541	TAGGTACATT	GAGCAACTGA	CTGAAATGCC	TCAAAATGTT	CTTTACGATG	CCATTGGGAT
3601	ATATCAACGG	TGGTATATCC	AGTGATTTTT	TTCTCCATTT	TAGCTTCCTT	AGCTCCTGAA
3661	AATCTCGATA	ACTCAAAAAA	TACGCCCCGT	AGTGATCTTA	TTTCATTATG	GTGAAAGTTG
3721	GAACCTCTTA	CGTGCCGATC	AACGTCTCAT	TTTCGCCAAA	AGTTGGCCCA	GGGCTTCCCG
3781	GTATCAACAG	GGACACCAGG	ATTTATTTAT	TCTGCGAAGT	GATCTTCCGT	CACAGGTATT
3841	TATTCGGCGC	AAAGTGCGTC	GGGTGATGCT	GCCAACTTAC	TGATTTAGTG	TATGATGGTG
3901	TTTTTGAGGT	GCTCCAGTGG	CTTCTGTTTC	TATCAGCTGT	CCCTCCTGTT	CAGCTACTAG
3961	CGGGTGGGTG	CGTAACGGCA	AAAGCACCGC	CGGACATCAG	CGCTAGCGGA	CGGTATACTG
4021	CGTTACTATG	TTGGCACTGA	TGAGGGTGTC	AGTGAAGTGC	TTCATGTGGC	AGGAGAAAAA
4081	AGGCTGCACC	GGTGCGTCAG	CAGAATATGT	GATACAGGAT	ATATTCCGCT	TCCTCGCTCA
4141	CTGACTCGCT	ACGCTCGGTC	GTTGCACTGC	GGCGAGCGGA	AATGGCTTAC	GAACGGGGCG
4201	GAGATTTTCT	GGAAGATGCC	AGGAAGATAC	TTAACAGGGA	AGTGAGAGGG	CCGCGGCAAA
4261	GCCGTTTTTC	CATAGGCTCC	GCCCCCTGTA	CAAGCATCAC	GAAATCTGAC	GCTCAAATCA
4321	GTGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACTATAAAG	ATACCAGGCG	TTTCCCCTGG	CGGCTCCCTC
4381	GTGCGCTCTC	CTGTTCTGTC	CTTTCGGTTT	ACCGGTGTCA	TTCCGCTGTT	ATGGCCGCGT
4441	TTGTCTCATT	CCACGCCTGA	CACCTCAGTT	CGGGTAGGCA	GTTGCTCCA	AGCTGGACTG
4501	TATGCACGAA	CCCCCGTTT	AGTCCGACCG	CTGCGCCTTA	TCCGGTAACT	ATCGTCTTGA
4561	GTCCAACCCG	GAAAGACATG	CAAAAGCACC	ACTGGCAGCA	GCCACTGGTA	ATTGATTTAG
4621	AGGAGTTAGT	CTTGAAGTCA	TGCGCCGGTT	AAGGCTAAAC	TGAAAGGACA	AGTTTTGGTG
4681	ACTGCGCTCC	TCCAAGCCAG	TTACCTCGGT	TCAAAGAGTT	GGTAGCTCAG	AGAACCTTCG
4741	AAAAACCGCC	CTGCAAGGCG	GTTTTTTTCGT	TTTCAGAGCA	AGAGATTACG	CGCAGACCAA
4801	AACGATCTCA	AGAAGATCAT	CTTATTAATC	AGATAAAATA	TTTCTAGATT	TCAGTGCAAT
4861	TTATCTCTTC	AAATGTAGCA	CCTGAAGTCA	GCCCCATACG	ATATAAGTTG	TAATTCTCAT
4921	GTTAGTCATG	CCCCGCGCCC	ACCGGAAGGA	GCTGACTGGG	TTGAAGGCTC	TCAAGGGCAT
4981	CGGTCGAGAT	CCCGGTGCCT	AATGAGTGAG	CTAACTTACA	TTAATTGCGT	TGCGCTCACT
5041	GCCCCGTTTT	CAGTCGGGAA	ACCTGTCTGT	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGCGC
5101	GGGGAGAGGC	GGTTTGCGTA	TTGGGCGCCA	GGGTGGTTTT	TCTTTTCACC	AGTGAGACGG
5161	GCAACAGCTG	ATTGCCCTTC	ACCGCTGGC	CCTGAGAGAG	TTGCAGCAAG	CGGTCCACGC
5221	TGGTTTGCCC	CAGCAGGCGA	AAATCCTGTT	TGATGGTGGT	TAACGGCGGG	ATATAACATG
5281	AGCTGTCTTC	GGTATCGTCG	TATCCCACTA	CCGAGATGTC	CGCACCAACG	CGCAGCCCGG
5341	ACTCGGTAAT	GGCGCGCATT	GCGCCCAGCG	CCATCTGATC	GTTGGCAACC	AGCATCGCAG
5401	TGGGAACGAT	GCCCTCATTC	AGCATTTGCA	TGGTTTGTG	AAAACCGGAC	ATGGCACTCC
5461	AGTCGCCTTC	CCGTTCCGCT	ATCGGCTGAA	TTTGATTGCG	AGTGAGATAT	TTATGCCAGC
5521	CAGCCAGACG	CAGACGCGCC	GAGACAGAAC	TTAATGGGCC	CGCTAACAGC	GCGATTTGCT
5581	GGTGACCCAA	TGCGACCAGA	TGCTCCACGC	CCAGTCGCGT	ACCGTCTTCA	TGGGAGAAAA
5641	TAATACTGTT	GATGGGTGTC	TGGTCAGAGA	CATCAAGAAA	TAACGCCGGA	ACATTAGTGC
5701	AGGCAGCTTC	CACAGCAATG	GCATCCTGGT	CATCCAGCGG	ATAGTTAATG	ATCAGCCAC
5761	TGACGCGTTG	CGCGAGAAGA	TTGTGCACCG	CCGCTTTACA	GGCTTCGACG	CCGCTTCGTT
5821	CTACCATCGA	CACCACCACG	CTGGCACCCA	GTTGATCGGC	GCGAGATTTA	ATCGCCGCGA
5881	CAATTTGCGA	CGGCGCGTGC	AGGGCCAGAC	TGGAGGTGGC	AACGCCAATC	AGCAACGACT
5941	GTTTGCCCCG	CAGTTGTTGT	GCCACGCGGT	TGGGAATGTA	ATTGAGCTCC	GCCATCGCCG
6001	CTTCCACTTT	TTCCCGCGTT	TTGCGAGAAA	CGTGGCTGGC	CTGGTTCACC	ACGCGGGAAA
6061	CGGTCTGATA	AGAGACACCG	GCATACTCTG	CGACATCGTA	TAACGTTACT	GGTTTCACAT
6121	TCACCACCTT	GAATTGACTC	TCTTCCGGGC	GCTATCATGC	CATACCGCGA	AAGGTTTTGC
6181	CCATTTCGAT	GGTGTCCGGG	ATCTCGACGC	TCTCCCTTAT	GCGACTCCTG	CATTAGGAAA
6241	TTAATACGAC	TCACTATA				

pSJK7

```

1  GGGGAATTGT  GAGCGGATAA  CAATTCCCCT  GTAGAAATAA  TTTTGTTTTAA  CTTTAATAAG
61  GAGATATACC  ATGGGCCATC  ATCATCATCA  TCATCATCAT  CATCACAGCA  GCGGCCATAT
121  CGAAGGTCGT  CACATGGGCC  GCAGCCGCCT  TTTGGAAGAT  TTTTCGAAACA  ACCGGTACCC
181  CAATTTACAA  CTGCGGGAGA  TTGCTGGACA  TATAATGGAA  TTTTCCCAAG  ACCAGCATGG
241  GTCCAGATTC  ATTCAGCTGA  AACTGGAGCG  TGCCACACCA  GCTGAGCGCC  AGCTTGTCTT
301  CAATGAAATC  CTCCAGGCTG  CCTACCAACT  CATGGTGGAT  GTGTTTGGTA  ATTACGTCAT
361  TCAGAAGTTC  TTTGAATTTG  GCAGTCTTGA  ACAGAAGCTG  GCTTTGGCAG  AACGGATTCTG
421  AGGCCACGTC  CTGTCATTGG  CACTACAGAT  GTATGGCTGC  CGTGTTATCC  AGAAAGCTCT
481  TGAGTTTATT  CCTTCAGACC  AGCAGAATGA  GATGGTTCGG  GAACTAGATG  GCCATGTCTT
541  GAAGTGTGTG  AAAGATCAGA  ATGGCAATCA  CGTGGTTCAG  AAATGCATTG  AATGTGTACA
601  GCCCCAGTCT  TTGCAATTTA  TCATCGATGC  GTTTAAGGGA  CAGGTATTTG  CTTTATCCAC
661  ACATCCTTAT  GGCTGCCGAG  TGATTAGAG  AATCCTGGAG  CACTGTCTCC  CTGACCAGAC
721  ACTCCCTATT  TTAGAGGAGC  TTCACCAGCA  CACAGAGCAG  CTGGTACAGG  ATCAATATGG
781  AAGTTATGTA  ATCGAACATG  TACTGGAGCA  CGGTCGTCCT  GAGGATAAAA  GCAAAATTGT
841  AGCAGAAATC  CGAGGCAATG  TACTTGTATT  GAGTCAGCAC  AAATTTGCAA  ACAATGTTGT
901  GCAGAAGTGT  GTTACTCACG  CCTCACGTAC  GGAGCGCGCT  GTGCTCATCG  ATGAGGTGTG
961  CACCATGAAC  GACGGTCCCC  ACAGTGCCTT  ATACACCATG  ATGAAGGACC  AGTATGCCAA
1021  CTACGTGGTC  CAGAAGATGA  TTGACGTGGC  GGAGCCAGGC  CAGCGGAAGA  TCGTCATGCA
1081  TAAGATCCGG  CCCCACATCG  CAACTCTTCG  TAAGTACACC  TATGGCAAGC  ACATTCTGGC
1141  CAAGCTGGAG  AAGTACTACA  TGAAGAACGG  TGTTGACTTA  GGGGGATCCG  GTGGAGGGTC
1201  TGGTGGCGGA  TCAACTAGTG  AAAAGCGTGA  CCACATGGTC  CTTCTTGAGT  ATGTAAGTGC
1261  TGCTGGGATT  ACAGATGCTA  GCTAAGCGGC  CGCATAATGC  TTAAGTCGAA  CAGAAAGTAA
1321  TCGTATTGTA  CACGGCCGCA  TAATCGAAAT  TAATACGACT  CACTATAGGG  GAATTGTGAG
1381  CGGATAACAA  TTCCCCATCT  TAGTATATTA  GTTAAGTATA  AGAAGGAGAT  ATACATATGG
1441  ATTTACCAGA  CGACCATTAC  CTGTCGACAC  AAACATATCCT  TTCGAAAGAT  CTCAACGGTA
1501  CCGGCTTTGG  GTCTGGCGGT  GGCTCCATGG  CCCGAGCCG  CCTTTTGGAA  GATTTTCGAA
1561  ACAACCGGTA  CCCC AATTTA  CAACTGCGGG  AGATTGCTGG  ACATATAATG  GAATTTTCCC
1621  AAGACCAGCA  TGGGTCCAGA  TTCATTCAGC  TGAAACTGGA  GCGTGCCACA  CCAGCTGAGC
1681  GCCAGCTTGT  CTTCAATGAA  ATCCTCCAGG  CTGCCTACCA  ACTCATGGTG  GATGTGTTTG
1741  GTAATTACGT  CATTGAGAAG  TTCTTTGAAT  TTGGCAGTCT  TGAACAGAAG  CTGGCTTTGG
1801  CAGAACGGAT  TCGAGGCCAC  GTCCTGTCAT  TGGCACTACA  GATGTATGGC  TGCCGTGTTA
1861  TCCAGAAAGC  TCTTGAGTTT  ATTCCTTCAG  ACCAGCAGAA  TGAGATGGTT  CGGGAAGTAG
1921  ATGGCCATGT  CTTGAAGTGT  GTGAAAGATC  AGAATGGCAA  TCACGTGGTT  CAGAAATGCA
1981  TTGAATGTGT  ACAGCCCCAG  TCTTTGCAAT  TTATCATCGA  TGCGTTTAAG  GGACAGGTAT
2041  TTGCCTTATC  CACACATCCT  TATGGCTGCC  GAGTGATTCA  GAGAATCCTG  GAGCACTGTC
2101  TCCCTGACCA  GACACTCCCT  ATTTTAGAGG  AGCTTCACCA  GCACACAGAG  CAGCTTGTAC
2161  AGGATCAATA  TGGAAATTAT  GTAATCCAAC  ATGTACTGGA  GCACGGTCTG  CCTGAGGATA
2221  AAAGCAAAAT  TGTAGCAGAA  ATCCGAGGCA  ATGTACTTGT  ATTGAGTCAG  CACAAATTTG
2281  CAAGCAATGT  TGTGGAGAAG  TGTGTTACTC  ACGCCTCACG  TACGGAGCGC  GCTGTGCTCA
2341  TCGATGAGGT  GTGCACCATG  AACGACGGTC  CCCACAGTGC  CTTATACACC  ATGATGAAGG
2401  ACCAGTATGC  CAACTACGTG  GTCCAGAAGA  TGATTGACGT  GGCGGAGCCA  GGCCAGCGGA
2461  AGATCGTCAT  GCATAAGATC  CGGCCCCACA  TCGCAACTCT  TCGTAAGTAC  ACCTATGGCA
2521  AGCACATTCT  GGCCAAGCTG  GAGAAGTACT  ACATGAAGAA  CGGTGTTGAC  TTAGGGCTGC
2581  AACACCACCA  CCACCACCAC  TGACTCGAGT  CTGGTAAGAA  TTCTAATACG  ACTCACTATA
2641  GAGCTCCCCA  TCACCATCAC  CTTGTTATTA  TTATTTATCA  CTATTATCAT  ATAATCCAG
2701  AATTGTATAT  ATTAATTTGA  TATATTCGTA  GCATAAGTTT  TCCAAACATT  ATTTTGTGTG
2761  CAAGCTTCAA  TAACTAGCAT  AACCCTTGG  GGCCTCTAAA  CGGGTCTTGA  GGGGTTTTTT
2821  GCTGAAACCT  CAGGCATTTG  AGAAGCACAC  GGTCACACTG  CTTCCGGTAG  TCAATAAACC
2881  GGTAAACCAG  CAATAGACAT  AAGCGGCTAT  TTAACGACCC  TGCCCTGAAC  CGACGACCGG
2941  GTCGAATTTG  CTTTCGAATT  TCTGCCATTC  ATCCGCTTAT  TATCACTTAT  TCAGGCGTAG
3001  CACCAGGCGT  TTAAGGGCAC  CAATAACTGC  CTTAAAAAAA  TTACGCCCCG  CCCTGCCACT
3061  CATCGCAGTA  CTGTTGTAAT  TCATTAAGCA  TTCTGCCGAC  ATGGAAGCCA  TCACAGACGG
3121  CATGATGAAC  CTGAATCGCC  AGCGGCATCA  GCACCTTGTC  GCCTTGCGTA  TAATATTTGC
3181  CCATAGTGAA  AACGGGGGCG  AAGAAGTTGT  CCATATTGGC  CACGTTTAAA  TCAAACTGG
3241  TGAAACTCAC  CCAGGGATTG  GCTGAGACGA  AAAACATATT  CTCAATAAAC  CCTTTAGGGA
3301  AATAGGCCAG  GTTTTCACCG  TAACACGCCA  CATCTTGCGA  ATATATGTGT  AGAAACTGCC

```

3361	GGAAATCGTC	GTGGTATTCA	CTCCAGAGCG	ATGAAAACGT	TTCAGTTTGC	TCATGGAAAA
3421	CGGTGTAACA	AGGGTGAACA	CTATCCCAT	TCACCAGCTC	ACCGTCTTTC	ATTGCCATAC
3481	GGAACCTCCG	ATGAGCATT	ATCAGGCGGG	CAAGAATGTG	AATAAAGGCC	GGATAAACT
3541	TGTGCTTATT	TTTCTTTACG	GTCTTTAAAA	AGGCCGTAAT	ATCCAGCTGA	ACGGTCTGGT
3601	TATAGGTACA	TTGAGCAACT	GACTGAAATG	CCTCAAAATG	TTCTTTACGA	TGCCATTGGG
3661	ATATATCAAC	GGTGGTATAT	CCAGTGATTT	TTTTCTCCAT	TTTAGCTTCC	TTAGCTCCTG
3721	AAAATCTCGA	TAACTCAAAA	AATACGCCCG	GTAGTGATCT	TATTTTCATTA	TGGTGAAAGT
3781	TGGAACCTCT	TACGTGCCGA	TCAACGTCTC	ATTTTCGCCA	AAAGTTGGCC	CAGGGCTTCC
3841	CGGTATCAAC	AGGGACACCA	GGATTTATTT	ATTCTGCGAA	GTGATCTTCC	GTCACAGGTA
3901	TTTATTCCGG	GCAAAGTGCG	TCGGGTGATG	CTGCCAACTT	ACTGATTTAG	TGTATGATGG
3961	TGTTTTTGGAG	GTGCTCCAGT	GGCTTCTGTT	TCTATCAGCT	GTCCCTCCTG	TTCAGCTACT
4021	GACGGGGTGG	TGCGTAACGG	CAAAAGCACC	GCCGGACATC	AGCGCTAGCG	GAGTGTATAC
4081	TGGCTTACTA	TGTTGGCACT	GATGAGGGTG	TCAGTGAAGT	GCTTCATGTG	GCAGGAGAAA
4141	AAAGGCTGCA	CCGGTGCGTC	AGCAGAATAT	GTGATACAGG	ATATATTCCG	CTTCTCGCT
4201	CACTGACTCG	CTACGCTCGG	TCGTTGCACT	GCGGCGAGCG	GAAATGGCTT	ACGAACGGGG
4261	CGGAGATTTT	CTGGAAGATG	CCAGGAAGAT	ACTTAACAGG	GAAGTGAGAG	GGCCGCGGCA
4321	AAGCCGTTTT	TCCATAGGCT	CCGCCCCCT	GACAAGCATC	ACGAAATCTG	ACGCTCAAAT
4381	CAGTGGTGGC	GAAACCCGAC	AGGACTATAA	AGATAACCAGG	CGTTTCCCCT	GGCGGCTCCC
4441	TCGTGCGCTC	TCCTGTTCTC	GCCTTTCGGT	TTACCGGTGT	CATTCCGCTG	TTATGGCCGC
4501	TTTTGTCTCA	TTCCACGCCT	GACACTCAGT	TCCGGGTAGG	CAGTTCGCTC	CAAGCTGGAC
4561	TGTATGCACG	AACCCCCGT	TCAGTCCGAC	CGCTGCGCCT	TATCCGGTAA	CTATCGTCTT
4621	GAGTCCAACC	CGGAAAGACA	TGCAAAAGCA	CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAATTGATTT
4681	AGAGGAGTTA	GTCTTGAAAGT	CATGCGCCGG	TTAAGGCTAA	ACTGAAAGGA	CAAGTTTTGG
4741	TGACTGCGCT	CCTCCAAGCC	AGTTACCTCG	GTTCAAAGAG	TTGGTAGCTC	AGAGAACCTT
4801	CGAAAAACCG	CCCTGCAAGG	CGGTTTTTTC	GTTTTTCAGAG	CAAGAGATTA	CGCGCAGACC
4861	AAAACGATCT	CAAGAAGATC	ATCTTATTAA	TCAGATAAAA	TATTTCTAGA	TTTCAGTGCA
4921	ATTTATCTCT	TCAAATGTAG	CACCTGAAGT	CAGCCCCATA	CGATATAAGT	TGTAATTCTC
4981	ATGTTAGTCA	TGCCCCGCGC	CCACCGGAAG	GAGCTGACTG	GGTTGAAGGC	TCTCAAGGGC
5041	ATCGGTCGAG	ATCCCGGTGC	CTAATGAGTG	AGCTAACTTA	CATTAATTGC	GTTGCGCTCA
5101	CTGCCCGCTT	TCCAGTCGGG	AAACCTGTCT	TGCCAGCTGC	ATTAATGAAT	CGGCCAACGC
5161	GCGGGGAGAG	GCGGTTTGCG	TATTGGGCGC	CAGGGTGGTT	TTTCTTTTCA	CCAGTGAGAC
5221	GGGCAACAGC	TGATTGCCCT	TCACCGCCTG	GCCCTGAGAG	AGTTGCAGCA	AGCGGTCCAC
5281	GCTGGTTTGC	CCCAGCAGGC	GAAAATCCTG	TTTGATGGTG	GTTAACGGCG	GGATATAACA
5341	TGAGCTGTCT	TCGGTATCGT	CGTATCCCAC	TACCGAGATG	TCCGCACCAA	CGCGCAGCCC
5401	GGACTCGGTA	ATGGCGCGCA	TTGCGCCCAG	CGCCATCTGA	TCGTTGGCAA	CCAGCATCGC
5461	AGTGGGAACG	ATGCCCTCAT	TCAGCATTTG	CATGGTTTGT	TGAAAACCGG	ACATGGCACT
5521	CCAGTCGCCT	TCCCGTTCCG	CTATCGGCTG	AATTTGATTG	CGAGTGAGAT	ATTTATGCCA
5581	GCCAGCCAGA	CGCAGACGCG	CCGAGACAGA	ACTTAATGGG	CCCGCTAACA	GCGCGATTTG
5641	CTGGTGACCC	AATGCGACCA	GATGCTCCAC	GCCCAGTCGC	GTACCGTCTT	CATGGGAGAA
5701	AATAATACTG	TTGATGGGTG	TCTGGTCAGA	GACATCAAGA	AATAACGCCG	GAACATTAGT
5761	GCAGGCAGCT	TCCACAGCAA	TGGCATCCTG	GTCATCCAGC	GGATAGTTAA	TGATCAGCCC
5821	ACTGACGCGT	TGCGCGAGAA	GATTGTGCAC	CGCCGCTTTA	CAGGCTTCGA	CGCCGCTTCG
5881	TTCTACCATC	GACACCACCA	CGCTGGCACC	CAGTTGATCG	GCGCGAGATT	TAATCGCCGC
5941	GACAATTTGC	GACGGCGCGT	GCAGGGCCAG	ACTGGAGGTG	GCAACGCCAA	TCAGCAACGA
6001	CTGTTTGCCC	GCCAGTTGTT	GTGCCACGCG	GTTGGGAATG	TAATTCAGCT	CCGCCATCGC
6061	CGCTTCCACT	TTTTCCC GCG	TTTTTCGCAGA	AACGTGGCTG	GCCTGGTTCA	CCACGCGGGA
6121	AACGGTCTGA	TAAGAGACAC	CGGCATACTC	TGCGACATCG	TATAACGTTA	CTGGTTTCAC
6181	ATTACCAACC	CTGAATTGAC	TCTCTTCCGG	GCGCTATCAT	GCCATACCGC	GAAAGGTTTT
6241	GCGCCATTCT	ATGGTGTCCG	GGATCTCGAC	GCTCTCCCTT	ATGCGACTCC	TGCATTAGGA
6301	AATTAATACG	ACTCACTATA				

pSJk8

```

1 TCGAGCACCA CCACCACCAC CACTGAGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCCGA AAGGAAGCTG
61 AGTTGGCTGC TGCCACCGCT GAGCAATAAC TAGCATAACC CCTTGGGGGCC TCTAAACGGG
121 TCTTGAGGGG TTTTTTGCTG AAAGGAGGAA CTATATCCGG ATTCTTTTCT TTGGCGAATG
181 GGACGCGCCC TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC GGCGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAC
241 CGCTACACTT GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTTCTCGC
301 CACGTTCGCC GGCTTTCCCC GTCAAGCTCT AAATCGGGGG CTCCCTTTAG GGTTCGGATT
361 TAGTGCTTTA CGGCACCTCG ACCCCAAAAA ACTTGATTAG GGTGATGGTT CACGTAGTGG
421 GCCATCGCCC TGATAGACGG TTTTTCGCCC TTTGACGTTG GAGTCCACGT TCTTTAATAG
481 TGGACTCTTG TTCCAAACTG GAACAACACT CAACCCTATC TCGGTCTATT CTTTTGATTT
541 ATAAGGGATT TTGCCGATTT CGGCCTATTG GTTAAAAAAT GAGCTGATTT AACAAAAATT
601 TAACGCGAAT TTTAACAAAA TATTAACGTT TACAATTTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA
661 TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT
721 GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA
781 ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TCGGGCATT TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA
841 CCCAGAAACG CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA
901 CATCGAACTG GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT
961 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC
1021 CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC
1081 ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC
1141 CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA
1201 GGAGCTAACC GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
1261 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGCAGCAAT
1321 GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAAGTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA
1381 ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC
1441 GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT
1501 TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG
1561 TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA
1621 GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACCTCA
1681 TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAATCCC
1741 TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC
1801 TTGAGATCCT TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC
1861 AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT
1921 CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT
1981 CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC
2041 TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA
2101 GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC
2161 CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG
2221 GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA
2281 GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT
2341 TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA
2401 CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTCTCTGC
2461 GTTATCCCTT GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG
2521 CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCTGAT
2581 GCGGTATTTT CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTACAC ACATATATG GTGCATCTC
2641 AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA CACTCCGCTA TCGCTACGTG
2701 ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT
2761 GTCTGCTCCC GGCATCCGCT TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC
2821 AGAGGTTTTT ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCT GCGGTAAAGC TCATCAGCGT
2881 GGTCGTGAAG CGATTACAG ATGTCTGCCT GTTCATCCGC GTCCAGCTCG TTGAGTTTCT
2941 CCAGAAGCGT TAATGTCTGG CTTCTGATAA AGCGGGCCAT GTTAAGGGCG GTTTTTTCTT
3001 GTTTGGTCAC TGATGCCTCC GTGTAAGGGG GATTTCTGTT CATGGGGGTA ATGATACCGA
3061 TGAAACGAGA GAGGATGCTC ACGATACGGG TTAAGTATGA TGAACATGCC CGGTTACTGG
3121 AACGTTGTGA GGGTAAACAA CTGGCGGTAT GGATGCGGCG GGACCAGAGA AAAATCACTC
3181 AGGGTCAATG CCAGCGCTTC GTTAATACAG ATGTAGGTGT TCCACAGGGT AGCCAGCAGC
3241 ATCCTGCGAT GCAGATCCGG AACATAATGG TGCAGGGCGC TGAATTCGCG GTTTCCAGAC
3301 TTTACGAAAC ACGGAAACCG AAGACCATTG ATGTTGTTGC TCAGGTCGCA GACGTTTTGC

```

3361	AGCAGCAGTC	GCTTCACGTT	CGCTCGCGTA	TCGGTGATTG	ATTCTGCTAA	CCAGTAAGGC
3421	AACCCCGCCA	GCCTAGCCGG	GTCCTCAACG	ACAGGAGCAC	GATCATGCGC	ACCCGTGGGG
3481	CCGCCATGCC	GGCGATAATG	GCCTGCTTCT	CGCCGAAACG	TTTGGTGGCG	GGACCAGTGA
3541	CGAAGGCTTG	AGCGAGGGCG	TGCAAGATTG	CGAATACCGC	AAGCGACAGG	CCGATCATCG
3601	TCGCGCTCCA	GCGAAAGCGG	TCCTCGCCGA	AAATGACCCA	GAGCGCTGCC	GGCACCTGTC
3661	CTACGAGTTG	CATGATAAAG	AAGACAGTCA	TAAGTGCGGC	GACGATAGTC	ATGCCCCGCG
3721	CCCACCGGAA	GGAGCTGACT	GGGTTGAAGG	CTCTCAAGGG	CATCGGTCTGA	GATCCCGGTG
3781	CCTAATGAGT	GAGCTAACTT	ACATTAATTG	CGTTGCGCTC	ACTGCCCCGT	TTCCAGTCGG
3841	GAAACCTGTC	GTGCCAGCTG	CATTAATGAA	TCGGCCAACG	CGCGGGGAGA	GGCGGTTTGC
3901	GTATTGGGCG	CCAGGGTGGT	TTTTCTTTTC	ACCAGTGAGA	CGGGCAACAG	CTGATTGCCC
3961	TTCACCGCCT	GGCCCTGAGA	GAGTTGCAGC	AAGCGGTCCA	CGCTGGTTTG	CCCCAGCAGG
4021	CGAAAATCCT	GTTTGATGGT	GGTTAACGGC	GGGATATAAC	ATGAGCTGTC	TTCCGTATCG
4081	TCGTATCCCA	CTACCGAGAT	ATCCGCACCA	ACGCGCAGCC	CGGACTCGGT	AATGGCGCGC
4141	ATTGCGCCCA	GCGCCATCTG	ATCGTTGGCA	ACCAGCATCG	CAGTGGGAAC	GATGCCCTCA
4201	TTCAGCATTT	GCATGGTTTG	TTGAAAACCG	GACATGGCAC	TCCAGTCGCC	TTCCCCTTCC
4261	GCTATCGGCT	GAATTTGATT	GCGAGTGAGA	TATTTATGCC	AGCCAGCCAG	ACGCAGACGC
4321	GCCGAGACAG	AACTTAATGG	GCCCCGTAAC	AGCGCGATTT	GCTGGTGACC	CAATGCGACC
4381	AGATGCTCCA	CGCCCAGTCG	CGTACCGTCT	TCATGGGAGA	AAATAATACT	GTTGATGGGT
4441	GTCTGGTCAG	AGACATCAAG	AAATAACGCC	GGAACATTAG	TGCAGGCAGC	TTCCACAGCA
4501	ATGGCATCCT	GGTCATCCAG	CGGATAGTTA	ATGATCAGCC	CACTGACGCG	TTGCGCGAGA
4561	AGATTGTGCA	CCGCCGCTTT	ACAGGCTTCG	ACGCCGCTTC	GTTCTACCAT	CGACACCACC
4621	ACGCTGGCAC	CCAGTTGATC	GGCGCGAGAT	TTAATCGCCG	CGACAATTTG	CGACGGCGCG
4681	TGCAGGGCCA	GA CTGGAGGT	GGCAACGCCA	ATCAGCAACG	ACTGTTTGCC	CGCCAGTTGT
4741	TGTGCCACGC	GGTTGGGAAT	GTAATTCAGC	TCCGCCATCG	CCGCTTCCAC	TTTTTCCCGC
4801	GTTTTTCGAG	AAACGTGGCT	GGCCTGGTTC	ACCACGCGGG	AAACGGTCTG	ATAAGAGACA
4861	CCGGCATACT	CTGCGACATC	GTATAACGTT	ACTGGTTTCA	CATTACCAC	CCTGAATTGA
4921	CTCTCTTCCG	GGCGCTATCA	TGCCATACCG	CGAAAGGTTT	TGCGCCATTC	GATGGTGTCC
4981	GGGATCTCGA	CGCTCTCCCT	TATGCGACTC	CTGCATTAGG	AAGCAGCCCA	G TAGTAGGTT
5041	GAGGCCGTTG	AGCACCGCCG	CCGCAAGGAA	TGGTGCATGC	AAGGAGATGG	CGCCCAACAG
5101	TCCCCCGGCC	ACGGGGCCTG	CCACCATACC	CACGCCGAAA	CAAGCGCTCA	TGAGCCCCGAA
5161	GTGGCGAGCC	CGATCTTCCC	CATCGGTGAT	GTCGGCGATA	TAGGCGCCAG	CAACCGCACC
5221	TGTGGCGCCG	GTGATGCCGG	CCACGATGCG	TCCGGCGTAG	AGGATCGAGA	TCTCGATCCC
5281	GCGAAATTAA	TACGACTCAC	TATAGGGGAA	TTGTGAGCGG	ATAACAATTC	CCCTCTAGAA
5341	ATAATTTTGT	TTAACTTTAA	GAAGGAGATA	TACATATGGA	TTTACCAGAC	GACCATTACC
5401	TGTCGTATCA	AACTATCCTT	TCGAAAGATC	TCAACGGTAC	CGACGTTGGG	TCTGGCGGTG
5461	GCTCCATGGG	CCGCAGCCGC	CTTTTGGAAG	ATTTTCGAAA	CAACCGGTAC	CCCAATTTAC
5521	AACTCGGGGA	GATTGCTGGA	CATATAATTG	AAATTTCCCA	AGACCAGCAT	GGGTCCAGAT
5581	TCATTCAGCT	GAAACTGGAG	CGTGCCACAC	CAGCTGAGCG	CCAGCTTGTC	TTCAATGAAA
5641	TCCTCCAGGC	TGCCTACCAA	CTCATGGTGG	ATGTGTTTGG	TAATTACGTC	ATTCAGAAGT
5701	TCTTTGAATT	TGGCAGTCTT	GAACAGAAGC	TGGCTTTGGC	AGAACGGATT	CGAGGCCACG
5761	TCCTGTCAAT	GGCACTACAG	ATGTATGGCT	GCCGTGTTAT	CCAGAAAGCT	CTTGAGTTTA
5821	TTCCTTCAGA	CCAGCAGAAT	GAGATGGTTC	GGGAACTAGA	TGGCCATGTC	TTGAAGTGTG
5881	TGAAAGATCA	GAATGGCAAT	CACGTGGTTC	AGAAATGCAT	TGAATGTGTA	CAGCCCCAGT
5941	CTTTGCAATT	TATCATCGAT	GCGTTTAAAG	GACAGGTATT	TGCCTTATCC	ACACATCCTT
6001	ATGGCTGCCG	AGTGATTCAG	AGAATCCTGG	AGCACTGTCT	CCCTGACCAG	ACACTCCCTA
6061	TTTTAGAGGA	GCTTCACCAG	CACACAGAGC	AGCTTGTACA	GGATCAATAT	GGAAATTATG
6121	TAATCCAACA	TGTACTGGAG	CACGGTCGTC	CTGAGGATAA	AAGCAAAATT	G TAGCAGAAA
6181	TCCGAGGCAA	TGTACTTGTA	TTGAGTCAGC	ACAAATTTGC	AAGCAATGTT	GTGGAGAAGT
6241	GTGTTACTCA	CGCCTCACGT	ACGGAGCGCG	CTGTGCTCAT	CGATGAGGTG	TGCACCATGA
6301	ACGACGGTCC	CCACAGTGCC	TTATACACCA	TGATGAAGGA	CCAGTATGCC	AACTACGTGG
6361	TCCAGAAGAT	GATTGACGTG	GCGGAGCCAG	GCCAGCGGAA	GATCGTCATG	CATAAGATCC
6421	GGCCCCACAT	CGCAACTCTT	CGTAAGTACA	CCTATGGCAA	GCACATTCTG	GCCAAGCTGG
6481	AGAAGTACTA	CATGAAGAAC	GGTGTGACT	TAGGGC		

pSJK9

```

1 TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCATCGATAA GCTTTAATGC GGTAGTTTAT CACAGTTAAA
61 TTGCTAACGC AGTCAGGCAC CGTGTATGAA ATCTAACAAAT GCGCTCATCG TCATCCTCGG
121 CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTTGGTTATG CCGGTACTGC CGGGCCTCTT
181 GCGGGATATC CGGATATAGT TCCTCCTTTC AGCAAAAAAC CCCTCAAGAC CCGTTTAGAG
241 GCCCAAGGG GTTATGCTAG TTATTGCTCA GCGGTGGCAG CAGCCAACTC AGCTTCCTTT
301 CGGGCTTTGT TAGCAGCCGG ATCCTTAGCT AGCATCTGTA ATCCCAGCAG CAGTTACATA
361 CTCAGAAGG ACCATGTGGT CACGCTTTTC GTTGAGATCT TTCGAAAGGA TAGTTTGTGT
421 CGACAGGTAA TGGTCGTCTG GTAAAAGGAC AGGGCCATCG CCAATTGGAG TATTTTGTGT
481 ATAATGGTCT GCTAGTTGAA CGGAACCATC TTCAACGTTG TGGCGAATTG TGAAGTTAGC
541 TTTGATTCCA TTATTTTGTG TGTCTGCCGT GATGTATACT TTGTGTGAGT TAAAGTTGTA
601 CTCGAGTTTG TGTCCAAGAA TGTTTCCATC TTCTTTAAAA TCAATACCCT TTAAGTCGAT
661 ACGATTAACA AGGGTATCAC CTTCAAACCTT GACTTCAGCA CGCGTCTTGT AGGTCCCCTC
721 ATCTTTGAAA TATATAGTGC GTTCCTGTAC ATAACCTTCG GGCATGGCAC TCTTGAAAAA
781 GTCATGCCGT TTCATGTGAT CCGGATAACG GGAAAAGCAT TGAACACCAT AGGTCAGAGT
841 AGTGACAAGT GTTGGCCATG GAACAGGTAG TTTTCCAGTA GTGCAAATAA ATTTAAGGCT
901 GAGTTTTCCG ATTGTAGCAT CACCTTCACC CTCTCCACGG ACAAAAAATT TGTGCCCAT
961 AACATCACCA TCTAATTCAA TAAGAATTGG GACGACTCCA GTGAAAAGTT CTTCTCCTTT
1021 CCTCATGGAT CCTCGAGCAT ATGACGACCT TCGATATGGC CGCTGCTGTG ATGATGATGA
1081 TGATGATGAT GATGATGGCC CATGGTATAT CTCTTCTTTA AAGTTAAACA AAATTATTTT
1141 TAGAGGGGAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CCCTATAGTG AGTCGTATTA ATTTGCGGGG
1201 ATCGAGATCT CGATCCTCTA CGCCGGACGC ATCGTGGCCG GCATCACCGG CGCCACAGGT
1261 GCGGTTGCTG GCGCCTATAT CGCCGACATC ACCGATGGGG AAGATCGGGC TCGCCACTTC
1321 GGGCTCATGA GCGCTTGTTT CGGCGTGGGT ATGGTGGCAG GCCCGTGGC CGGGGGACTG
1381 TTGGGCGCCA TCTCCTTGCA TGCACCATTC CTTGCGGCGG CGGTGCTCAAG CGGCCTCAAC
1441 CTACTACTGG GCTGCTTCCT AATGACGAG TCGCATAAGG GAGAGCGTCG AGATCCCGGA
1501 CACCATCGAA TGGCGCAAAA CCTTTCGCGG TATGGCATGA TAGCGCCCGG AAGAGAGCTCA
1561 ATTCAGGGTG GTGAATGTGA AACCAGTAAC GTTATACGAT GTCGCAGAGT ATGCCGGTGT
1621 CTCTTATCAG ACCGTTTCCC GCGTGGTGAA CCAGGCCAGC CACGTTTCTG CGAAAACGCG
1681 GGAAAAAGTG GAAGCGGCGA TGGCGGAGCT GAATTACATT CCCAACCAGC TGGCACAACA
1741 ACTGGCGGGC AAACAGTCGT TGCTGATTGG CGTTGCCACC TCCAGTCTGG CCCTGCACGC
1801 GCCGTCGCAA ATTGTCGCGG CGATTAAATC TCGCGCCGAT CAACTGGGTG CCAGCGTGGT
1861 GGTGTCGATG GTAGAACGAA GCGGCGTCGA AGCCTGTAAA GCGGCGGTGC ACAATCTTCT
1921 CGCGCAACGC GTCAGTGGGC TGATCATTAA CTATCCGCTG GATGACCAGG ATGCCATTGC
1981 TGTGGAAGCT GCCTGCACTA ATGTTCCGGC GTTATTTCTT GATGTCTCTG ACCAGACACC
2041 CATCAACAGT ATTATTTTCT CCCATGAAGA CGGTACGCGA CTGGGCGTGG AGCATCTGGT
2101 CGCATTGGGT CACCAGCAAA TCGCGCTGTT AGCGGGCCCA TTAAGTTCTG TCTCGGCGCG
2161 TCTGCGTCTG GCTGGCTGGC ATAAATATCT CACTCGCAAT CAAATTCAGC CGATAGCGGA
2221 ACGGGAAGGC GACTGGAGTG CCATGTCCGG TTTTCAACAA ACCATGCAAA TGCTGAATGA
2281 GGGCATCGTT CCCACTGCGA TGCTGGTTGC CAACGATCAG ATGGCGCTGG GCGCAATGCG
2341 CGCCATTACC GAGTCCGGGC TGCGCGTTGG TGCGGATATC TCGGTAGTGG GATACGACGA
2401 TACCGAAGAC AGCTCATGTT ATATCCCGCC GTTAACCACC ATCAAACAGG ATTTTCGCCT
2461 GCTGGGGCAA ACCAGCGTGG ACCGCTTGCT GCAACTCTCT CAGGGCCAGG CCGTGAAGGG
2521 CAATCAGCTG TTGCCCCTCT CACTGGTGAA AAGAAAAACC ACCCTGGCGC CCAATACGCA
2581 AACCGCCTCT CCCC GCGCGT TGGCCGATTC ATTAATGCAG CTGGCACGAC AGGTTTCCCG
2641 ACTGGAAGC GGGCAGTGAG CGCAACGCAA TTAATGTAAG TTAGCTCACT CATTAGGCAC
2701 CGGGATCTCG ACCGATGCCC TTGAGAGCCT TCAACCCAGT CAGCTCCTTC CCGTGGGCGC
2761 GGGGCATGAC TATCGTCGCC GCACTTATGA CTGTCTTCTT TATCATGCAA CTCGTAGGAC
2821 AGGTGCCGGC AGCGCTCTGG GTCATTTTCG GCGAGGACCG CTTTCGCTGG AGCGCGACGA
2881 TGATCGGCCT GTCGCTTGCG GTATTGCGAA TCTTGACGC CCTCGCTCAA GCCTTCGTCA
2941 CTGGTCCCGC CACCAAACGT TTCGGCGAGA AGCAGGCCAT TATCGCCGGC ATGGCGGCCG
3001 ACGCGCTGGG CTACGTCTTG CTGGCGTTTC CGACGCGAGG CTGGATGGCC TTCCCCATTA
3061 TGATTCTTCT CGCTTCCGGC GGCATCGGGA TGCCCGCGTT GCAGGCCATG CTGTCCAGGC
3121 AGGTAGATGA CGACCATCAG GGACAGCTTC AAGGATCGCT CGCGGCTCTT ACCAGCCTAA
3181 CTTGATCAC TGGACCGCTG ATCGTCACGG CGATTTATGC CGCCTCGGCG AGCACATGGA
3241 ACGGGTTGGC ATGGATTGTA GGCGCCGCCC TATACCTTGT CTGCCTCCCC GCGTTGCGTC
3301 GCGGTGCATG GAGCCGGGCC ACCTCGACCT GAATGGAAGC CGGCGGCACC TCGTAACGG

```

3361	ATTACCACT	CCAAGAATTG	GAGCCAATCA	ATTCTTGCGG	AGAACTGTGA	ATGCGCAAAC
3421	CAACCCTTGG	CAGAACATAT	CCATCGCGTC	CGCCATCTCC	AGCAGCCGCA	CGCGGCGCAT
3481	CTCGGGCAGC	GTTGGGTCTT	GGCCACGGGT	GCGCATGATC	GTGCTCCTGT	CGTTGAGGAC
3541	CCGGCTAGGC	TGGCGGGGTT	GCCTTACTGG	TTAGCAGAAT	GAATCACCGA	TACGCGAGCG
3601	AACGTGAAGC	GA CTGCTGCT	GCAAAACGTC	TGCGACCTGA	GCAACAACAT	GAATGGTCTT
3661	CGGTTTCCGT	GTTTTCGTAAA	GTCTGGAAC	GCGGAAGTCA	GCGCCCTGCA	CCATTATGTT
3721	CCGGATCTGC	ATCGCAGGAT	GCTGCTGGCT	ACCCTGTGGA	ACACCTACAT	CTGTATTAAC
3781	GAAGCGCTGG	CATTGACCCT	GAGTGATTTT	TCTCTGGTCC	CGCCGCATCC	ATACCGCCAG
3841	TTGTTTACCC	TCACAACGTT	CCAGTAACCG	GGCATGTTCA	TCATCAGTAA	CCCGTATCGT
3901	GAGCATCCTC	TCTCGTTTCA	TCGGTATCAT	TACCCCATG	AACAGAAATC	CCCCTTACAC
3961	GGAGGCATCA	GTGACCAAAC	AGGAAAAAAC	CGCCCTTAAC	ATGGCCCGCT	TTATCAGAAG
4021	CCAGACATTA	ACGCTTCTGG	AGAAACTCAA	CGAGCTGGAC	GCGGATGAAC	AGGCAGACAT
4081	CTGTGAATCG	CTTCACGACC	ACGCTGATGA	GCTTTACCGC	AGCTGCCTCG	CGCGTTTTCGG
4141	TGATGACGGT	GAAAACCTCT	GACACATGCA	GCTCCCGGAG	ACGGTCACAG	CTTGTCTGTA
4201	AGCGGATGCC	GGGAGCAGAC	AAGCCCGTCA	GGGCGCGTCA	GCGGGTGTTG	GCGGGTGTCTG
4261	GGGCGCAGCC	ATGACCCAGT	CACGTAGCGA	TAGCGGAGTG	TATACTGGCT	TA ACTATGCG
4321	GCATCAGAGC	AGATTGTACT	GAGAGTGCAC	CATATATGCG	GTGTGAAATA	CCGCACAGAT
4381	GCGTAAGGAG	AAAATAACCGC	ATCAGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	GA CTGCTGC
4441	GCTCGGTCGT	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT
4501	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	GCAGGAAGA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCCA
4561	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC
4621	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC
4681	AGGCGTTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	CCGCTTACCG
4741	GATACCTGTC	CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA	GCGTGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA
4801	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	GTCGTTGCT	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG
4861	TTCAGCCCGA	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAGAC
4921	ACGACTTATC	GCCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG
4981	GCGGTGCTAC	AGAGTTCTTG	AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT
5041	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	AGCTCTTGAT
5101	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC
5161	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT
5221	GGAACGAAAA	CTCACGTTAA	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	ATCTTCACCT
5281	AGATCCTTTT	AAATTAATAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA	AAGTATATAT	GAGTAAACTT
5341	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGTCTATTTT
5401	GTTTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCT	TGTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC
5461	CATCTGGCCC	CAGTGCTGCA	ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACC GGCT	CCAGATTTAT
5521	CAGCAATAAA	CCAGCCAGCC	GGAAGGGCCG	AGCGCAGAAG	TGGTCCTGCA	ACTTTATCCG
5581	CCTCCATCCA	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTCTG	CCAGTTAATA
5641	GTTTGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTGCAG	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	TCGTTTGGTA
5701	TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT	CAAGGCGAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT
5761	GCAAAAAAGC	GGTTAGCTCC	TTCGGTCTCT	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	TTGGCCGCAG
5821	TGTTATCACT	CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTCTATG	CCATCCGTAA
5881	GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG	TGTATGCGGC
5941	GACCGAGTTG	CTCTTGCCCG	GCGTCAACAC	GGGATAATAC	CGCGCCACAT	AGCAGAACTT
6001	TAAAAGTGCT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT	CGGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	ATCTTACCGC
6061	TGTTGAGATC	CAGTTCGATG	TAACCCACTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	GCATCTTTTA
6121	CTTTCACCAG	CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	AAAAAGGGAA
6181	TAAGGGCGAC	ACGGAAATGT	TGAATACTCA	TACTCTTCCT	TTTTCAATAT	TATTGAAGCA
6241	TTTATCAGGG	TTATTGTCTC	ATGAGCGGAT	ACATATTTGA	ATGTATTTAG	AAAAATAAAC
6301	AAATAGGGGT	TCCGCGCACA	TTTCCCCGAA	AAGTGCCACC	TGACGTCTAA	GAAACCATTA
6361	TTATCATGAC	ATTAACCTAT	AAAAATAGGC	GTATCACGAG	GCCCTTTCGT	CTTCAAGAA

pSJK10

Entspricht Plasmid pSJK9, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK10 wie folgt lautet: ATA

pSJK11

```

1  GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA
61  CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT
121 CACTCATTAG GCACCCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT
181 TGTGAGCGGA TAACAATTTT ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG CCAAGCTTGT
241 TTAAACCCAG TCTTGACCTG GAGCGTCCAG TCTAGACCTG GTTAATTAAG GATCCATGAG
301 GAAAGGAGAA GAACTTTTCA CTGGAGTCGT CCCAATTCTT ATTGAATTAG ATGGTGATGT
361 TAATGGGCAC AAATTTTTTG TCCGTGGAGA GGGTGAAGGT GATGCTACAA TCGGAAAAC
421 CAGCCTTAAA TTTATTTGCA CTACTGGAAA ACTACCTGTT CCATGGCCAA CACTTGTAC
481 TACTCTGACC TATGGTGTTT AATGCTTTTC CCGTTATCCG GATCACATGA AACGGCATGA
541 CTTTTTCAAG AGTGCCATGC CCGAAGGTTA TGTACAGGAA CGCACTATAT ATTTCAAAGA
601 TGACGGGACC TACAAGACGC GTGCTGAAGT CAAGTTTGAA GGTGATACCC TTGTTAATCG
661 TATCGAGTTA AAGGGTATTG ATTTTAAAGA AGATGGAAAC ATTCTTGGAC ACAAACCTCGA
721 GTACAACCTT AACTCACACA AAGTATACAT CACGGCAGAC AAACAAAATA ATGGAATCAA
781 AGCTAACTTC ACAATTCGCC ACAACGTTGA AGATGGTTCC GTTCAACTAG CAGACCATTA
841 TCAACAAAAT ACTCCAATTG GCGATGGCCC TGTCCTTTTA CCATAAGAAT TCACTGGCCG
901 TCGTTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG
961 CACATCCCCC TTTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT CGCCCTTCCC
1021 AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GCGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC
1081 TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATATGGTGCA CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCCGCAT
1141 AGTTAAGCCA GCCCCGACAC CCGCCAACAC CCGCTGACGC GCCCTGACGG GCTTGTCTGC
1201 TCCCGGCATC CGCTTACAGA CAAGCTGTGA CCGTCTCCGG GAGCTGCATG TGTCAGAGGT
1261 TTTCACCGTC ATCACCGAAA CGCGCGAGAC GAAAGGGCCT CGTGATACGC CTATTTTTAT
1321 AGGTTAATGT CATGATAATA ATGGTTTCTT AGACGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG
1381 TGCGCGGAAC CCCTATTTGT TTATTTTCTT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA
1441 GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC
1501 ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC
1561 CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT GGGTGCACGA GTGGGTTACA
1621 TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTT
1681 CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG
1741 GGCAAGAGCA ACTCGGTCGC CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC
1801 CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA
1861 TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG
1921 AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC
1981 CGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG
2041 CAACAACGTT GCGCAAATA TTAAGTGGC AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT
2101 TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG
2161 CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG
2221 CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC
2281 AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC
2341 ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTTA GATTGATTTA AAACCTCATT
2401 TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTGTATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT
2461 AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTAAG AAAGATCAAA GGATCTTCTT
2521 GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAAACCA CCGCTACCAG
2581 CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA
2641 GCAGAGCGCA GATACCAAT ACTGTTCTTC TAGTGATAGC GTAGTTAGCC CACCACTTCA
2701 AGAACTCTGT AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG
2761 CCAAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAGG
2821 CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCTG GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT
2881 ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC TATGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA

```

2941	GAAAGGCGGA	CAGGTATCCG	GTAAGCGGCA	GGGTCGGAAC	AGGAGAGCGC	ACGAGGGAGC
3001	TTCCAGGGGG	AAACGCCTGG	TATCTTTATA	GTCCTGTCGG	GTTTCGCCAC	CTCTGACTTG
3061	AGCGTCGATT	TTTGTGATGC	TCGTCAGGGG	GGCGGAGCCT	ATGGAAAAAC	GCCAGCAACG
3121	CGGCCTTTTT	ACGGTTCCTG	GCCTTTTGCT	GGCCTTTTGC	TCACATGTTC	TTTCCTGCGT
3181	TATCCCCTGA	TTCTGTGGAT	AACCGTATTA	CCGCCTTTGA	GTGAGCTGAT	ACCGCTCGCC
3241	GCAGCCGAAC	GACCGAGCGC	AGCGAGTCAG	TGAGCGAGGA	AGCGGAAGA	

pSJ15

1	GGATCCTCCC	TATCAGTGGT	AGAGATTGAC	ATCCCTATCA	GTGATAGAGA	GGATCCTGTA
61	GAAATAATTT	TGTTTTAACTT	TAATAAGGAG	ATATAACCATG	GGAGCTCCCC	ATCACCATCA
121	CCTTGTTATT	ATTATTTATC	ACTATTATCA	TATAATCCCA	GAATTGTATA	TATTAATTTG
181	ATATATTCGT	AGCATAAGTT	TTCCAAACAT	TATTTTGTTC	TCCTCGAGTC	TGGTAAAGAA
241	ACCGCTGCTG	CGAAATTTGA	ACGCCAGCAC	ATGGACTCGT	CTACTAGCGC	AGCTTAATTA
301	ACCTAGGCTG	CTGCCACCGC	TGAGCAATAA	CTAGCATAAC	CCCTTGGGGC	CTCTAAACGG
361	GTCTTGAGGG	GTTTTTTTGA	ATTCGAGCTC	GGCGCGCCTG	CAGGTCGACA	AGCTTGCGGC
421	CGCATAATGC	TTAAGTCGAA	CAGAAAGTAA	TCGTATTGTA	CACGGCCGCA	TAATCGAAAT
481	TAATACGACT	CACTATAGGG	GAATTGTGAG	CGGATAACAA	TTCCCCATCT	TAGTATATTA
541	GTTAAGTATA	AGAAGGAGAT	ATACATATGT	GCGGGACTCT	GGGGTTCGAG	AGCTCAATAA
601	ACATTAATGA	TGTCCAGATT	AGATAAAAGT	AAAGTGATTA	ACAGCGCATT	AGAGCTGCTT
661	AATGAGGTCG	GAATCGAAGG	TTTAACAACC	CGTAAACTCG	CCCAGAAGCT	AGGTGTAGAG
721	CAGCCTACAT	TGTATTGGCA	TGTAAAAAAT	AAGCGGGCTT	TGCTCGACGC	CTTAGCCATT
781	GAGATGTTAG	ATAGGCACCA	TACTCACTTT	TGCCCTTTAG	AAGGGGAAAG	CTGGCAAGAT
841	TTTTTACGTA	ATAACGCTAA	AAGTTTTAGA	TGTGCTTTAC	TAAGTCATCG	CGATGGAGCA
901	AAAGTACATT	TAGGTACACG	GCCTACAGAA	AAACAGTATG	AAACTCTCGA	AAATCAATTA
961	GCCTTTTTTAT	GCCAACAAGG	TTTTTCACTA	GAGAATGCAT	TATATGCACT	CAGCGCTGTG
1021	GGGCATTTTA	CTTTAGGTTG	CGTATTGGAA	GATCAAGAGC	ATCAAGTCGC	TAAAGAAGAA
1081	AGGGAAACAC	CTACTACTGA	TAGTATGCCG	CCATTATTAC	GACAAGCTAT	CGAATTATTT
1141	GATCACCAAG	GTGCAGAGCC	AGCCTTCTTA	TTCGGCCTTG	AATTGATCAT	ATACGGATTA
1201	GAAAAACAAC	TTAAATGTGA	AAGTGGGTCT	TAACTCGAGT	CTGGTAAAGA	AACCGCTGCT
1261	GCGAAATTTG	AACGCCAGCA	CATGGACTCG	TCTACTAGCG	CAGCTTAATT	AACCTAGGCT
1321	GCTGCCACCG	CTGAGCAATA	ACTAGCATAA	CCCCTTGGGG	CCTCTAAACG	GGTCTTGAGG
1381	GGTTTTTTTGC	TGAAACCTCA	GGCATTTGAG	AAGCACACGG	TCACACTGCT	TCCGGTAGTC
1441	AATAAACCGG	TAAACCAGCA	ATAGACATAA	GCGGCTATTT	AACGACCCTG	CCCTGAACCG
1501	ACGACAAGCT	GACGACCGGG	TCTCCGCAAG	TGGCACTTTT	CGGGGAAATG	TGCGCGGAAC
1561	CCCTATTTGT	TTATTTTTTCT	AAATACATTC	AAATATGTAT	CCGCTCATGA	ATTAATTCTT
1621	AGAAAACTC	ATCGAGCATC	AAATGAAACT	GCAATTTATT	CATATCAGGA	TTATCAATAC
1681	CATATTTTTTG	AAAAAGCCGT	TTCTGTAATG	AAGGAGAAAA	CTCACCGAGG	CAGTTCCATA
1741	GGATGGCAAG	ATCCTGGTAT	CGGTCTGCGA	TTCCGACTCG	TCCAACATCA	ATACAACCTA
1801	TTAATTTCCC	CTCGTCAAAA	ATAAGGTTAT	CAAGTGAGAA	ATCACCATGA	GTGACGACTG
1861	AATCCGGTGA	GAATGGCAAA	AGTTTATGCA	TTTCTTTCCA	GACTTGTTCA	ACAGGCCAGC
1921	CATTACGCTC	GTCATCAAAA	TCACTCGCAT	CAACCAAACC	GTTATTTCATT	CGTGATTGCG
1981	CCTGAGCGAG	ACGAAATACG	CGGTCGCTGT	TAAAAGGACA	ATTACAAACA	GGAATCGAAT
2041	GCAACCGGCG	CAGGAACACT	GCCAGCGCAT	CAACAATATT	TTCACCTGAA	TCAGGATATT
2101	CTTCTAATAC	CTGGAATGCT	GTTTTCCC GG	GGATCGCAGT	GGTGAGTAAC	CATGCATCAT
2161	CAGGAGTACG	GATAAAATGC	TTGATGGTCG	GAAGAGGCAT	AAATTCCGTC	AGCCAGTTTA
2221	GTCTGACCAT	CTCATCTGTA	ACATCATTGG	CAACGCTACC	TTTGCCATGT	TTCAGAAACA
2281	ACTCTGGCGC	ATCGGGCTTC	CCATACAATC	GATAGATTGT	CGCACCTGAT	TGCCCCACAT
2341	TATCGCGAGC	CCATTTATAC	CCATATAAAT	CAGCATCCAT	GTTGGAATTT	AATCGCGGCC
2401	TAGAGCAAGA	CGTTTCCCGT	TGAATATGGC	TCATACTCTT	CCTTTTTTCAA	TATTATTGAA
2461	GCATTTATCA	GGGTTATTGT	CTCATGAGCG	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA

2521 AACAAATAGG CATGCAGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTA CGCTCGGTG
 2581 TTCGACTGCG GCGAGCGGTG TCAGCTCACT CAAAAGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT
 2641 CAGGGGATAA AGCCGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGCAA AGCACGGAA GAAGCCAACG
 2701 CCGCAGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
 2761 AGCCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
 2821 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
 2881 CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTT GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
 2941 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
 3001 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
 3061 GCAGCCATTG GTAAGTATT TAGAGGACTT TGTCTTGAAG TTATGCACCT GTTAAGGCTA
 3121 AACTGAAAGA ACAGATTTTG GTGAGTGC GG TCCTCCAACC CACTTACCTT GGTTCAAAGA
 3181 GTTGGTAGCT CAGCGAACCT TGAGAAAACC ACCGTTGGTA GCGGTGGTTT TTCTTTATTT
 3241 ATGAGATGAT GAATCAATCG GTCTATCAAG TCAACGAACA GCTATTCCGT TACTCTAGAT
 3301 TTCAGTGCAA TTTATCTCTT CAAATGTAGC ACCTGAAGTC AGCCCCATAC GATATAAGTT
 3361 GTAATTCTCA TGTTAGTCAT GCGCGCGCC CACCGGAAGG AGCTGACTGG GTTGAAGGCT
 3421 CTCAAGGGCA TCGGTCGAGA TCCCGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTTAC ATTAATTGCG
 3481 TTGCGCTCAC TGCCCCGCTT CCAGTCGGGA AACCTGTCTG GCCAGCTGCA TTAATGAATC
 3541 GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGC GT ATTGGGCGCC AGGGTGGTTT TTCTTTTCAC
 3601 CAGTGAGACG GGCAACAGCT GATTGCCCTT CACCGCCTGG CCCTGAGAGA GTTGCAGCAA
 3661 GCGGTCCACG CTGGTTTGGC CCAGCAGGCG AAAATCCTGT TTGATGGTGG TTAACGGCGG
 3721 GATATAACAT GAGCTGTCTT CGGTATCGTC GTATCCCACT ACCGAGATGT CCGCACCAAC
 3781 GCGCAGCCCG GACTCGGTAA TGGCGCGCAT TGCGCCAGC GCCATCTGAT CGTTGGCAAC
 3841 CAGCATCGCA GTGGGAACGA TGCCCTCATT CAGCATTTGC ATGGTTTGT TGA AACCGGA
 3901 CATGGCACTC CAGTCGCCTT CCCGTTCCGC TATCGGCTGA ATTTGATTGC GAGTGAGATA
 3961 TTTATGCCAG CCAGCCAGAC GCAGACGCGC CGAGACAGAA CTTAATGGGC CCGCTAACAG
 4021 CGCGATTTGC TGGTGACCCA ATGCGACCAG ATGCTCCACG CCCAGTCGCG TACCGTCTTC
 4081 ATGGGAGAAA ATAATACTGT TGATGGGTGT CTGGTCAGAG ACATCAAGAA ATAACGCCGG
 4141 AACATTAGTG CAGGCAGCTT CCACAGCAAT GGCATCCTGG TCATCCAGCG GATAGTTAAT
 4201 GATCAGCCCA CTGACGCGTT GCGCGAGAAG ATTGTGCACC GCCGCTTTAC AGGCTTCGAC
 4261 GCCGCTTCGT TCTACCATCG ACACCACCAC GCTGGCACCC AGTTGATCGG CGCGAGATTT
 4321 AATCGCCGCG ACAATTTGCG ACGGCGCGTG CAGGGCCAGA CTGGAGGTGG CAACGCCAAT
 4381 CAGCAACGAC TGTTTGCCCG CCAGTTGTTG TGCCACGCGG TTGGGAATGT AATTCAGCTC
 4441 CGCCATCGCC GCTTCCACTT TTTCCGCGT TTTGCGAGAA ACGTGGCTGG CCTGGTTCAC
 4501 CACGCGGGAA ACGGTCTGAT AAGAGACACC GGCATACTCT GCGACATCGT ATAACGTTAC
 4561 TGGTTTACACA TTCACCACCC TGAATTGACT CTCTTCCGGG CGCTATCATG CCATACCGCG
 4621 AAAGGTTTTG CGCCATTCGA TGGTGTCCGG GATCTCGACG CTCTCCCTTA TCGACTCCT
 4681 GCATTAGGAA ATTAATACGA CTCACTATA

pSJK18

1 GAATTCTCAT GTTTGACAGC TTATCGACTG CACGGTGCAC CAATGCTTCT GGCCTCAGGC
 61 AGCCATCGGA AGCTGTGGTA TGGCTGTGCA GGTCGTAAAT CACTGCATAA TTCGTGTCGC
 121 TCAAGGCGCA CTCCCGTTCT GGATAATGTT TTTTGCGCCG ACATCATAAC GGTTCTGGCA
 181 AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGGCTC GTATAATGTG TGGAATTGTG
 241 AGCGGATAAC AATTTACAC AGCTCTAGCT CGAGGGAGAC CACAACGGTT TCCCTCTAGA
 301 CCCATCACCA TCACCTTGTT ATTATTATTT ATCACTATTA TCATATAATC CCAGAATTGT
 361 ATATATTAAT TTGATATATT CGTAGCATAA GTTTTCCAAA CATTATTTTG TTGTCAGATC
 421 TTAGCATAAC CCCTTGGGGC CTCTAAACGG GTCTTGAGGG GTTTTTTGCT CCATGGTGGT
 481 AACTTCACGG TAACCAAGAT GTCGAGTTAA CGTCGCCGCC CAATTGGCAA AATGACCTGC
 541 AGGCATGCAC CATTCTTGC GCGGCGGTG CTCAACGGCC TCAACCTACT ACTGGGCTGC
 601 TTCCTAATGC AGGAGTCGCA TAAGGGAGAG CGTCGACCGA TGCCCTTGAG AGCCTTCAAC
 661 CCAGTCAGCT CTTCCGGTG GCGCGGGG ATGACTATCG TCGCCGCACT TATGACTGTC

721	TTCTTTTATCA	TGCAACTCGT	AGGACAGGTG	CCGGCAGCGC	TCTGGGTCAT	TTTCGGCGAG
781	GACCGCTTTC	GCTGGAGCGC	GACGATGATC	GGCCTGTTCG	TTGCGGTATT	CGGAATCTTG
841	CACGCCCTCG	CTCAAGCCTT	CGTCACTGGT	CCCGCCACCA	AACGTTTTCG	CGAGAAGCAG
901	GCCATTATCG	CCGGCATGGC	GGCCGACGCG	CTGGGCTACG	TCTTGCTGGC	GTTCGCGACG
961	CGAGGCTGGA	TGGCCTTCCC	CATTATGATT	CTTCTCGCTT	CCGGCGGCAT	CGGGATGCCC
1021	GCGTTGCAGG	CCATGCTGTC	CAGGCAGGTA	GATGACGACC	ATCAGGGACA	GCTTCAAGGA
1081	TCGCTCGCGG	CTCTTACCAG	CCTAACTTCG	ATCACTGGAC	CGCTGATCGT	CACGGCGATT
1141	TATGCCGCCT	CGGCGAGCAC	ATGGAACGGG	TTGGCATGGA	TTGTAGGCGC	CGCCCTATAC
1201	CTTGTCTGCC	TCCCCGCGTT	GCGTCGCGGT	GCATGGAGCC	GGGCCACCTC	GACCTGAATG
1261	GAAGCCGGCG	GCACCTCGCT	AACGGATTCA	CCACTCCAAG	AATTGGAGCC	AATCAATTCT
1321	TGCGGAGAAC	TGTGAATGCG	CAAACCAACC	CTTGGCAGAA	CATATCCATC	GCGTCCGCCA
1381	TCTCCAGCAG	CCGCACGCGG	CGCATCTCGG	GCAGCGTTGG	GTCCTGGCCA	CGGGTGCGCA
1441	TGATCGTGCT	CCTGTCTGTT	AGGACCCGGC	TAGGCTGGCG	GGGTTGCCTT	ACTGGTTAGC
1501	AGAATGAATC	ACCGATACGC	GAGCGAACGT	GAAGCGACTG	CTGCTGCAAA	ACGTCTGCGA
1561	CCTGAGCAAC	AACATGAATG	GTCTTTCGGT	TCCGTGTTTC	GTAAAGTCTG	GAAACGCGGA
1621	AGTCAGCGCC	CTGCACCATT	ATGTTCCGGA	TCTGCATCGC	AGGATGCTGC	TGGCTACCCT
1681	GTGGAACACC	TACATCTGTA	TTAACGAAGC	GCTGGCATTG	ACCCTGAGTG	ATTTTTCTCT
1741	GGTCCC GCCG	CATCCATACC	GCCAGTTGTT	TACCCTCACA	ACGTTCCAGT	AACCGGGCAT
1801	GTTTCATCAT	AGTAACCCGT	ATCGTGAGCA	TCCTCTCTCG	TTTCATCGGT	ATCATATCCC
1861	CCATGAACAG	AAATTCCCCC	TTACACGGAG	GCATCAAGTG	ACCAAACAGG	AAAAAACCGC
1921	CCTTAACATG	GCCCGCTTTA	TCAGAAGCCA	GACATTAACG	CTTCTGGAGA	AACTCAACGA
1981	GCTGGACGCG	GATGAACAGG	CAGACATCTG	TGAATCGCTT	CACGACCACG	CTGATGAGCT
2041	TTACCGCAGC	TGCCTCGCGC	GTTTTCGGTGA	TGACGGTGAA	AACCTCTGAC	ACATGCAGCT
2101	CCCGGAGACG	GTCACAGCTT	GTCTGTAAGC	GGATGCCGGG	AGCAGACAAG	CCCGTCAGGG
2161	CGCGTCAGCG	GGTGTTGGCG	GGTGTGCGGG	CGCAGCCATG	ACCCAGTCAC	GTAGCGATAG
2221	CGGAGTGTAT	ACTGGCTTAA	CTATGCGGCA	TCAGAGCAGA	TTGTACTGAG	AGTGCACCAT
2281	ATGCGGTGTG	AAATACCGCA	CAGATGCGTA	AGGAGAAAAT	ACCGCATCAG	GCGCTCTTCC
2341	GCTTCCTCGC	TCACTGACTC	GCTGCGCTCG	GTCGTTTCGG	TGCGGCGAGC	GGTATCAGCT
2401	CACTCAAAGG	CGGTAATACG	GTTATCCACA	GAATCAGGGG	ATAACGCAGG	AAAGAACATG
2461	TGAGCAAAAAG	GCCAGCAAAA	GGCCAGGAAC	CGTAAAAAAG	CCGCGTTGCT	GGCGTTTTTTC
2521	CATAGGCTCC	GCCCCCCTGA	CGAGCATCAC	AAAAATCGAC	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA
2581	AACCCGACAG	GA CTATAAAG	ATACCAGGCG	TTTCCCCCTG	GAAGCTCCCT	CGTGCGCTCT
2641	CCTGTTCCGA	CCCTGCCGCT	TACCGGATAC	CTGTCCGCCT	TTCTCCCTTC	GGGAAGCGTG
2701	GCGCTTTCTC	AATGCTCACG	CTGTAGGTAT	CTCAGTTCGG	TGTAGGTCGT	TCGCTCCAAG
2761	CTGGGCTGTG	TGCACGAACC	CCCCGTTTCA	CCCGACCGCT	GCGCCTTATC	CGGTAACAT
2821	CGTCTTGAGT	CCAACCCGGT	AAGACACGAC	TTATCGCCAC	TGGCAGCAGC	CAGTGGTAAC
2881	AGGATAGTCA	GAGCGAGGTA	TGTAGGCGGT	GCTACAGAGT	TCTTGAAGTG	TGGGCCTAAC
2941	TACGGCTACA	CTAGAAGGAC	AGTATTTGGT	ATCTGCGCTC	TGCTGAAGCC	AGTTACCTTC
3001	GGAAAAAGAG	TTGGTAGCTC	TTGATCCGGC	AAACAAACCA	CCGCTGGTAG	CGGTGGTTTTT
3061	TTTGTGTTGCA	AGCAGCAGAT	TACGCGCAGA	AAAAAAGGAT	CTCAAGAAGA	TCCTTTGATC
3121	TTTTCTACGG	GGTCTGACGC	TCAGTGGAAC	GAAAACTCAC	GTTAAGGGAT	TTTGGTCATG
3181	AGATTATCAA	AAAGGATCTT	CACCTAGATC	CTTTTAAATT	AAAAATGAAG	TTTTTAAATCA
3241	ATCTAAAGTA	TATATGAGTA	AAC TTGGTCT	GACAGTTACC	AATGCTTAAT	CAGTGAGGCA
3301	CCTATCTCAG	CGATCTGTCT	ATTTTCGTTCA	TCCATAGTTG	CCTGACTCCC	CGTCGTGTAG
3361	ATAACTACGA	TACGGGAGGG	CTTACCATCT	GGCCCCAGTG	CTGCAATGAT	ACCGCGAGAC
3421	CCACGCTCAC	CGGCTCCAGA	TTTATCAGCA	ATAAACCAGC	CAGCCGGAAG	GGCCGAGCGC
3481	AGAAGTGGTC	CTGCAACTTT	ATCCGCCTCC	ATCCAGTCTA	TTAATTGTTG	CCGGGAAGCT
3541	AGAGTAAGTA	GTTCGCCAGT	TAATAGTTTG	CGCAACGTTG	TTGCCATTGC	TGCAGGCATC
3601	GTGGTGTAC	GCTCGTCGTT	TGGTATGGCT	TCATTTCAGCT	CCGGTTCCCA	ACGATCAAGG
3661	CGAGTTACAT	GATCCCCCAT	GTTGTGCAAA	AAAGCGGTTA	GCTCCTTCGG	TCCTCCGATC
3721	GTTGTACAGAA	GTAAGTTGGC	CGCAGTGTTA	TCACTCATGG	TTATGGCAGC	ACTGCATAAT
3781	TCTCTTACTG	TCATGCCATC	CGTAAGATGC	TTTTCTGTGA	CTGGTGAGTA	CTCAACCAAG
3841	TCATTCTGAG	AATAGTGTAT	GCGGCGACCG	AGTTGCTCTT	GCCCCGCGTC	AACACGGGAT
3901	AATACCGCGC	CACATAGCAG	AACTTTAAAA	GTGCTCATCA	TTGGA AAAACG	TTCTTCGGGG
3961	CGAAAAC TCT	CAAGGATCTT	ACCGCTGTTG	AGATCCAGTT	CGATGTAACC	CACCTCGTGA
4021	CCCAACTGAT	CTTCAGCATC	TTTTACTTTT	ACCAGCGTTT	CTGGGTGAGC	AAAAACAGGA
4081	AGGCAAAATG	CCGCAAAAAA	GGGAATAAGG	GCGACACGGA	AATGTTGAAT	ACTCATACTC

```

4141 TTCCTTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA
4201 TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG
4261 CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
4321 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA A

```

pSJK18c

Entspricht Plasmid pSJK18, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK18c wie folgt lautet: CCC

pSJK19

Entspricht Plasmid pSJK8, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK19 wie folgt lautet:

```

GATTTACCAGACGACCATTACCTGTCGTATCAAACCTATCCTTTTCGAAAGATCTCAACGGTACCGACGTTGGGTCTGG
CGGTGGCTCCATGGGCCGAGCCGCTTTTGGGAAGATTTTCGAAACAACCGGTACCCCAATTTACAACGCGGGAGA
TTGCTGGACATATAATGGAATTTTCCCAAGACCAGCATGGGAATAGATTTCATTTCAGCTGAAACTGGAGCGTGCCACA
CCAGCTGAGCGCCAGCTTGTCTTCAATGAAATCCTCCAGGCTGCCTACCAACTCATGGTGGATGTGTTTGGTAGTTA
CGTCATTGAGAAGTTCTTTGAATTTGGCAGTCTTGAACAGAAGCTGGCTTTGGCAGAACGGATTTCGAGGCCACGTCC
TGTCATTGGCACTACAGATGTATGGCAGCCGTGTTATCGAGAAAGCTCTTGAGTTTATTCCTTCAGACCAGCAGAAT
GAGATGGTTTCGGGAAC TAGATGGCCATGTCTTGAAGTGTGTGAAAGATCAGAATGGCAATCACGTGGTTTCAGAAATG
CATTGAATGTGTACAGCCCCAGTCTTTGCAATTTATCATCGATGCGTTTAAGGGACAGGTATTTGCCTTATCCACAC
ATCCTTATGGCTGCCGAGTGATTTCAGAGAATCCTGGAGCACTGTCTCCCTGACCAGACACTCCCTATTTTAGAGGAG
CTTCACCAGCACACAGAGCAGCTTGTACAGGATCAATATGGAAATTATGTAATCCAACATGTACTGGAGCACGGTCG
TCCTGAGGATAAAAGCAAAATTGTAGCAGAAATCCGAGGCAATGTACTTGTATTGAGTCAGCACAAATTTGCAAGCA
ATGTTGTGGAGAAGTGTGTTACTCACGCCTCACGTACGGAGCGCGCTGTGCTCATCGATGAGGTGTGCACCATGAAC
GACGGTCCCCACAGTGCCTTATACACCATGATGAAGGACCAGTATGCCAACTACGTGGTCCAGAAGATGATTGACGT
GGCGGAGCCAGGCCAGCGGAAGATCGTCATGCATAAGATCCGGCCCCACATCGCAACTCTTCGTAAGTACACCTATG
GCAAGCACATTCTGGCCAAGCTGGAGAAGTACTACATGAAGAACGGTGTGACTTAGGG

```

pSJK20

```

1  GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCCT GTAGAAATAA TTTTGTTTTAA CTTTAATAAG
61  GAGATATACC ATGGAGCAAA AAACCCCTCA AGACCCGTTT AGAGGCCCCA AGGGGTTATG
121 CTAAGATCTG ACAACAAAAT AATGTTTGA AAACCTTATGC TACGAATATA TCAAATTAAT
181 ATATACAATT CTGGGATTAT ATGATAATAG TGATAAATAA TAATAACAAG GTGATGGTGA
241 TGGGTCTAGA GGGAAACCGT TGTGGTCTCC CTCGAGCTAG AGCTGTGTGA AATTGTTATC
301 CGCTCACAAT TCCACACATT ATACGAGCCG ATGATTAATT GTCAACAGCT CATTTCAGAA
361 TATTTGCCAG AACCGTTATG ATGTCGGCGC AAAAAACATT ATCCAGAACG GGAGTGCGCC
421 TTGAGCGACA CGAATTATGC AGTGATTTAC GACCTGCACA GCCATACCAC AGCTTCCGAT
481 GGCTGCCTGA CGCCAGAAGC ATTGGTGCAC CGTGCAGTCG ATAAGCTGTC AAACATGAGA
541 ATTCGAGCTC GCGCGCCTG CAGGTCGACA AGCTTGCGGC CGCATAATGC TTAAGTCGAA
601 CAGAAAGTAA TCGTATTGTA CACGGCCGCA TAATCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG
661 GAATTGTGAG CGGATAACAA TTCCCCTATCT TAGTATATTA GTTAAGTATA AGAAGGAGAT
721 ATACATATGG CAGATCTCAA TTGGATATCG GCCGGCCACG CGATCGCTGA CGTCGGTACC
781 CTCGAGTCTG GTAAAGAAAC CGCTGCTGCG AAATTTGAAC GCCAGCACAT GGACTCGTCT
841 ACTAGCGCAG CTTAATTAAC CTAGGCTGCT GCCACCGCTG AGCAATAACT AGCATAACCC
901 CTTGGGGCCT CTAAACGGGT CTTGAGGGGT TTTTGTCTGA AACCTCAGGC ATTTGAGAAG
961 CACACGGTCA CACTGCTTCC GGTAGTCAAT AAACCGGTAA ACCAGAATA GACATAAGCG
1021 GCTATTTAAC GACCCTGCCC TGAACCGACG ACAAGCTGAC GACCGGGTCT CCGCAAGTGG
1081 CACTTTTCGG GGAAATGTGC GCGGAACCCC TATTTGTTTA TTTTCTAAA TACATTCAAA
1141 TATGTATCCG CTCATGAATT AATTCTTAGA AAAACTCATC GAGCATCAAA TGAACTGCA
1201 ATTTATTCAT ATCAGGATTA TCAATACCAT ATTTTGTGAA AAGCCGTTTC TGTAATGAAG

```

```

1261 GAGAAAACCTC ACCGAGGCAG TTCCATAGGA TGGCAAGATC CTGGTATCGG TCTGCGATTG
1321 CGACTCGTCC AACATCAATA CAACCTATTA ATTTCCCCTC GTCAAAAATA AGGTTATCAA
1381 GTGAGAAATC ACCATGAGTG ACGACTGAAT CCGGTGAGAA TGGCAAAAGT TTATGCATTT
1441 CTTTCCAGAC TTGTTCAACA GGCCAGCCAT TACGCTCGTC ATCAAAATCA CTCGCATCAA
1501 CCAAACCGTT ATTCATTCGT GATTGCGCCT GAGCGAGACG AAATACGCGG TCGCTGTTAA
1561 AAGGACAATT ACAAACAGGA ATCGAATGCA ACCGGCGCAG GAACACTGCC AGCGCATCAA
1621 CAATATTTTC ACCTGAATCA GGATATTCTT CTAATACCTG GAATGCTGTT TTCCCGGGGA
1681 TCGCAGTGGT GAGTAACCAT GCATCATCAG GAGTACGGAT AAAATGCTTG ATGGTCGGAA
1741 GAGGCATAAA TTCCGTCAGC CAGTTTAGTC TGACCATCTC ATCTGTAACA TCATTGGCAA
1801 CGCTACCTTT GCCATGTTTC AGAAACAAC CTGGCGCATC GGGCTTCCCA TACAATCGAT
1861 AGATTGTCGC ACCTGATTGC CCGACATTAT CGCGAGCCCA TTTATACCCA TATAAATCAG
1921 CATCCATGTT GGAATTTAAT CGCGGCCTAG AGCAAGACGT TTCCCGTTGA ATATGGCTCA
1981 TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT
2041 ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGCAT GCAGCGCTCT TCCGCTTCCT
2101 CGCTCACTGA CTCGCTACGC TCGGTGCTTC GACTGCGGCG AGCGGTGTCA GCTCACTCAA
2161 AAGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAAAGC CGGAAAGAAC ATGTGAGCAA
2221 AAAGCAAAGC ACCGGAAGAA GCCAACGCCG CAGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCTT
2281 GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGC CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA
2341 AGATAACAGG CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG
2401 CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA
2461 CGCTGTTGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA
2521 CCCCCGTTTC AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG
2581 GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCATTGGTA ACTGATTTAG AGGACTTTGT
2641 CTTGAAGTTA TGCACCTGTT AAGGCTAAAC TGAAAGAACA GATTTTGGTG AGTGCGGTCC
2701 TCCAACCCAC TTACCTTGGT TCAAAGAGTT GGTAGCTCAG CGAACCTTGA GAAAACCACC
2761 GTTGGTAGCG GTGGTTTTTC TTTATTTATG AGATGATGAA TCAATCGGTC TATCAAGTCA
2821 ACGAACAGCT ATTCCGTTAC TCTAGATTTT AGTGCAATTT ATCTCTTCAA ATGTAGCACC
2881 TGAAGTCAGC CCCATACGAT ATAAGTTGTA ATTCTCATGT TAGTCATGCC CCGCGCCAC
2941 CGGAAGGAGC TGACTGGGTT GAAGGCTCTC AAGGGCATCG GTCGAGATCC CCGTGCCTAA
3001 TGAGTGAGCT AACTTACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC
3061 CTGTCGTGCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT
3121 GGGCGCCAGG GTGGTTTTTC TTTTCACCAG TGAGACGGGC AACAGCTGAT TGCCCTTCAC
3181 CGCCTGGCCC TGAGAGAGTT GCAGCAAGCG GTCCACGCTG GTTTGCCCCA GCAGGCGAAA
3241 ATCCTGTTTG ATGGTGGTTA ACGGCGGGAT ATAACATGAG CTGTCTTCGG TATCGTCGTA
3301 TCCCCTACC GAGATGTCCG CACCAACGCG CAGCCCGGAC TCGGTAATGG CGCGCATTGC
3361 GCCCAGCGCC ATCTGATCGT TGGCAACCAG CATCGCAGTG GGAACGATGC CCTCATTACG
3421 CATTGTCATG GTTTGTTGAA AACCAGACAT GGCATCCAG TCGCCTTCCC GTTCCGCTAT
3481 CGGCTGAATT TGATTGCGAG TGAGATATTT ATGCCAGCCA GCCAGCGCGA GCGCGCCGA
3541 GACAGAATT AATGGGCCCC CTAACAGCGC GATTTGCTGG TGACCAATG CGACCAGATG
3601 CTCCACGCCC AGTCGCGTAC CGTCTTCATG GGAGAAAATA ATACTGTTGA TGGGTGTCTG
3661 GTCAGAGACA TCAAGAAATA ACGCCGGAAC ATTAGTGCAG GCAGCTTCCA CAGCAATGGC
3721 ATCCTGGTCA TCCAGCGGAT AGTTAATGAT CAGCCCACTG ACGCGTTGCG CGAGAAGATT
3781 GTGCACCGCC GCTTTACAGG CTTGACGCGC GCTTCGTTCT ACCATCGACA CCACCACGCT
3841 GGCACCCAGT TGATCGGCGC GAGATTTAAT CGCCGCGACA ATTTGCGACG GCGCGTGCAG
3901 GGCCAGACTG GAGGTGGCAA CGCCAATCAG CAACGACTGT TTGCCCGCCA GTTGTGTGTC
3961 CACGCGGTTG GGAATGTAAT TCAGTCCGC CATCGCCGCT TCCACTTTTT CCCGCGTTTT
4021 CGCAGAAACG TGGCTGGCCT GGTTCACCAC GCGGGAAACG GTCTGATAAG AGACACCGGC
4081 ATACTCTGCG ACATCGTATA ACGTTACTGG TTTACATTC ACCACCCTGA ATTGACTCTC
4141 TTCCGGGCGC TATCATGCCA TACCGCGAAA GGTTTTGCGC CATTCGATGG TGTCCGGGAT
4201 CTCGACGCTC TCCCTTATGC GACTCCTGCA TTAGGAAATT AATACGACTC ACTATA

```

pSJK20c

Entspricht Plasmid pSJK20, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK20c wie folgt lautet: GGG

pSJK21

```

1 TATGGGCCGC AGCCGCCTTT TGGAAGATTT TCGAAACAAC CGGTACCCCA ATTTACAAC
61 GCGGGAGATT GCTGGACATA TAATGGAATT TTCCCAAGAC CAGCATGGGT CCAGATTCAT
121 TCAGCTGAAA CTGGAGCGTG CCACACCAGC TGAGCGCCAG CTTGTCTTCA ATGAAATCCT
181 CCAGGCTGCC TACCAACTCA TGGTGGATGT GTTTGGTAAT TACGTCATTG AGAAGTTCTT
241 TGAATTTGGC AGTCTTGAAC AGAAGCTGGC TTTGGCAGAA CGGATTCGAG GCCACGTCCT
301 GTCATTGGCA CTACAGATGT ATGGCTGCCG TGTTATCCAG AAAGCTCTTG AGTTTATTCC
361 TTCAGACCAG CAGAATGAGA TGGTTCGGGA ACTAGATGGC CATGTCTTGA AGTGTGTGAA
421 AGATCAGAAT GGCAATCACG TGGTTCAGAA ATGCATTGAA TGTGTACAGC CCCAGTCTTT
481 GCAATTTATC ATCGATGCGT TTAAGGGACA GGTATTTGCC TTATCCACAC ATCCTTATGG
541 CTGCCGAGTG ATTCAGAGAA TCCTGGAGCA CTGTCTCCCT GACCAGACAC TCCCTATTTT
601 AGAGGAGCTT CACCAGCACA CAGAGCAGCT TGTACAGGAT CAATATGGAA ATTATGTAAT
661 CCAACATGTA CTGGAGCACG GTCGTCCTGA GGATAAAAGC AAAATTGTAG CAGAAATCCG
721 AGGCAATGTA CTTGTATTGA GTCAGCACAA ATTTGCAAGC AATGTTGTGG AGAAGTGTGT
781 TACTCACGCC TCACGTACGG AGCGCGCTGT GCTCATCGAT GAGGTGTGCA CCATGAACGA
841 CGGTCCCCAC AGTGCCTTAT ACACCATGAT GAAGGACCAG TATGCCAACT ACGTGGTCCA
901 GAAGATGATT GACGTGGCGG AGCCAGGCCA GCGGAAGATC GTCATGCATA AGATCCGGCC
961 CCACATCGCA ACTCTTCGTA AGTACACCTA TGGCAAGCAC ATTCTGGCCA AGCTGGAGAA
1021 GTACTACATG AAGAACGGTG TTGACTTAGG GGGGCGTAAA GGCTCTGGTG ATCCGGGAAA
1081 AAAAAACAG ATGAGCACCT GGCTGCTGGA TAGCAAATGT GTTGAACGTA TGAAATGGCT
1141 GTTTAGCGAT CTGCCGGAAG AAAAACGTGT GATGATCAAA ATGAATGAAG CGGCCTTTTT
1201 TAGCGTTACA CCGGCAGTTT ATGCAGATGA AGTTGCACGT ATGATGCGTA CCGTTCCTGGC
1261 ACTGCTGGGT AAACCGCCTT ATGCAGTTAT TGATGGCACC GCATGTGTTG GTGGTGATAC
1321 CCGTCTGCTG GCAAAACATT TTGATATGAC CGTTGCCATT GAACGTGATC CGGAAACCTA
1381 TGCATCTGCT CAGGATAATC TGACCACCTG GGTGTTGAT GCAAAAACCA TTAGCGGTGA
1441 TACCGCAGCA CTGATTCCGC AGTTTGGAC CCTGATTGGT GCAGTTGCAA CTTTTCAGCT
1501 GTATCTGGAC CCTCCTTGGG GTGGTGTGTA TTATCGTAGC CAGACCGATA TTCAGCTGAC
1561 CCTGGGTAGC CTGGCAGTTG AAGATGTTGT TAATCGTGCA TTTGAAGCAC ATCTGAGCAT
1621 GAAACTGGCA GTTCTGAAAC TGCCTCGCAA CTATAATTGC GGTTACCTGT TTCGCAAACT
1681 GGGTAAACAT GAAGTGTTTC GTATTACCCA GGGCAATTTT TTTGTGTTTT TTGTTGCACG
1741 TCGTGGTAGC CGTGTTAAAG AACATGGTCG TACCGCAATG CTGCAGCTGC GTAAAGCACG
1801 TGAAGAAGCA AAAGCACGTA GCGAAGAAAC CAAAGAAGAT GGCGAAACAC GCGGTAGCGG
1861 TGAATAAGGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG
1921 CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG GGTCTTGAGG GGTTTTTTGC
1981 TGAAAGGAGG AACTATATCC GGATATCCCG CAAGAGGCCG GGCAGTACCG GCATAACCAA
2041 GCCTATGCCT ACAGCATCCA GGGTGACGGT GCCGAGGATG ACGATGAGCG CATTGTTAGA
2101 TTTCATACAC GGTGCCTGAC TGCGTTAGCA ATTTAACTGT GATAAACTAC CGCATTAAAG
2161 CTTATCGATG ATAAGCTGTC AAACATGAGA ATTCTTGAAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC
2221 GCCTATTTTT ATAGGTAAAT GTCATGATAA TAATGGTTTT TTAGACGTCA GGTGGCACTT
2281 TTCGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT
2341 ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA
2401 TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TGCGGCATTT TGCCTTCCTG
2461 TTTTTGCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC
2521 GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTGCCCCCG
2581 AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC
2641 GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG
2701 TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT
2761 GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG
2821 GAGGACCGAA GGAGCTAACC GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG
2881 ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC
2941 CTGCAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAACCTG CGAACTACTT ACTCTAGCTT
3001 CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT
3061 CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC
3121 GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA
3181 CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT
3241 CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT
3301 TAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA

```

3361	CCAAAATCCC	TTAACGTGAG	TTTTTCGTTCC	ACTGAGCGTC	AGACCCCGTA	GAAAAGATCA
3421	AAGGATCTTC	TTGAGATCCT	TTTTTTCTGTC	GCGTAATCTG	CTGCTTGCAA	ACAAAAAAGC
3481	CACCGCTACC	AGCGGTGGTT	TGTTTGCCGG	ATCAAGAGCT	ACCAACTCTT	TTTCCGAAGG
3541	TAAGTGGCTT	CAGCAGAGCG	CAGATACCAA	ATACTGTCCT	TCTAGTGTAG	CCGTAGTTAG
3601	GCCACCACTT	CAAGAACTCT	GTAGCACCGC	CTACATACCT	CGCTCTGCTA	ATCCTGTTAC
3661	CAGTGGCTGC	TGCCAGTGGC	GATAAGTCGT	GTCTTACCGG	GTTGGACTCA	AGACGATAGT
3721	TACCGGATAA	GGCGCAGCGG	TCGGGCTGAA	CGGGGGGTTC	GTGCACACAG	CCCAGCTTGG
3781	AGCGAACGAC	CTACACCGAA	CTGAGATACC	TACAGCGTGA	GCTATGAGAA	AGCGCCACGC
3841	TTCCCGAAGG	GAGAAAGGCG	GACAGGTATC	CGGTAAGCGG	CAGGGTCGGA	ACAGGAGAGC
3901	GCACGAGGGA	GCTTCCAGGG	GGAACGCCT	GGTATCTTTA	TAGTCCTGTC	GGGTTTCGCC
3961	ACCTCTGACT	TGAGCGTCGA	TTTTTGTGAT	GCTCGTCAGG	GGGGCGGAGC	CTATGGAAAA
4021	ACGCCAGCAA	CGCGGCCTTT	TTACGGTTCC	TGGCCTTTTG	CTGGCCTTTT	GCTCACATGT
4081	TCTTTCCTGC	GTTATCCCTT	GATTCTGTGG	ATAACCGTAT	TACCGCCTTT	GAGTGAGCTG
4141	ATACCGCTCG	CCGCAGCCGA	ACGACCGAGC	GCAGCGAGTC	AGTGAGCGAG	GAAGCGGAAG
4201	AGCGCCTGAT	GCGGTATTTT	CTCCTTACGC	ATCTGTGCGG	TATTTACACAC	CGCATATATG
4261	GTGCACTCTC	AGTACAATCT	GCTCTGATGC	CGCATAGTTA	AGCCAGTATA	CACTCCGCTA
4321	TCGCTACGTG	ACTGGGTCAT	GGCTGCGCCC	CGACACCCGC	CAACACCCGC	TGACGCGCCC
4381	TGACGGGCTT	GTCTGCTCCC	GGCATCCGCT	TACAGACAAG	CTGTGACCGT	CTCCGGGAGC
4441	TGCACTGTGC	AGAGGTTTTT	ACCGTCATCA	CCGAAACGCG	CGAGGCAGCT	GCGGTAAAGC
4501	TCATCAGCGT	GGTCGTGAAG	CGATTACAG	ATGTCTGCCT	GTTTCATCCGC	GTCAGACTCG
4561	TTGAGTTTTCT	CCAGAAGCGT	TAATGTCTGG	CTTCTGATAA	AGCGGGCCAT	GTTAAGGGCG
4621	GTTTTTTCCT	GTTTGGTCAC	TGATGCCTCC	GTGTAAGGGG	GATTTCTGTT	CATGGGGGTA
4681	ATGATACCGA	TGAAACGAGA	GAGGATGCTC	ACGATACGGG	TTACTGATGA	TGAACATGCC
4741	CGGTTACTGG	AACGTTGTGA	GGGTAAACAA	CTGGCGGTAT	GGATGCGGCG	GGACCAGAGA
4801	AAAATCACTC	AGGGTCAATG	CCAGCGCTTC	GTTAATACAG	ATGTAGGTGT	TCCACAGGGT
4861	AGCCAGCAGC	ATCCTGCGAT	GCAGATCCGG	AACATAATGG	TGCAGGGCGC	TGACTTCCGC
4921	GTTTCCAGAC	TTTACGAAAC	ACGGAACCG	AAGACCATT	ATGTTGTTGC	TCAGGTCGCA
4981	GACGTTTTGC	AGCAGCAGTC	GCTTCACGTT	CGCTCGCGTA	TCGGTGATT	ATTCTGCTAA
5041	CCAGTAAGGC	AACCCCGCCA	GCCTAGCCGG	GTCCTCAACG	ACAGGAGCAC	GATCATGCGC
5101	ACCCGTGGCC	AGGACCCAAC	GCTGCCCGAG	ATGCGCCGCG	TGCGGCTGCT	GGAGATGGCG
5161	GACGCGATGG	ATATGTTCTG	CCAAGGGTTG	GTTTGCGCAT	TCACAGTTCT	CCGCAAGAAT
5221	TGATTGGCTC	CAATTCTTGG	AGTGGTGAAT	CCGTTAGCGA	GGTGCCGCCG	GCTTCCATTC
5281	AGGTCGAGGT	GGCCCGGCTC	CATGCACCGC	GACGCAACGC	GGGGAGGCAG	ACAAGGTATA
5341	GGGCGGCGCC	TACAATCCAT	GCCAACCCGT	TCCATGTGCT	CGCCGAGGCG	GCATAAATCG
5401	CCGTGACGAT	CAGCGGTCCA	GTGATCGAAG	TTAGGCTGGT	AAGAGCCGCG	AGCGATCCTT
5461	GAAGCTGTCT	CTGATGGTCG	TCATCTACCT	GCCTGGACAG	CATGGCCTGC	AACGCGGGCA
5521	TCCCGATGCC	GCCGGAAGCG	AGAAGAATCA	TAATGGGGAA	GGCCATCCAG	CCTCGCGTCG
5581	CGAACGCCAG	CAAGACGTAG	CCCAGCGCGT	CGGCCGCCAT	GCCGGCGATA	ATGGCCTGCT
5641	TCTCGCCGAA	ACGTTTGGTG	GCGGGACCAG	TGACGAAGGC	TTGAGCGAGG	CGGTGCAAGA
5701	TTCCGAATAC	CGCAAGCGAC	AGGCCGATCA	TCGTGCGGCT	CCAGCGAAAG	CGGTCTCTCG
5761	CGAAAATGAC	CCAGAGCGCT	GCCGGCACCT	GTCCTACGAG	TTGCATGATA	AAGAAGACAG
5821	TCATAAGTGC	GGCGACGATA	GTCATGCCCC	GCGCCACCG	GAAGGAGCTG	ACTGGGTTGA
5881	AGGCTCTCAA	GGGCATCGGT	CGAGATCCCG	GTGCCTAATG	AGTGAGCTAA	CTTACATTAA
5941	TTGCGTTGCG	CTCACTGCCC	GCTTTCCAGT	CGGGAAACCT	GTCGTGCCAG	CTGCATTAA
6001	GAATCGGCCA	ACGCGCGGGG	AGAGGCGGTT	TGCGTATTGG	GCGCCAGGGT	GGTTTTTCTT
6061	TTCACCACTG	AGACGGGCAA	CAGCTGATTG	CCCTTCACCG	CCTGGCCCTG	AGAGAGTTGC
6121	AGCAAGCGGT	CCACGCTGGT	TTGCCCCAGC	AGGCGAAAAT	CCTGTTTGAT	GGTGGTTAAC
6181	GGCGGGATAT	AACATGAGCT	GTCTTCGGTA	TCGTGCTATC	CCACTACCGA	GATATCCGCA
6241	CCAACGCGCA	GCCCGGACTC	GGTAATGGCG	CGCATTGCGC	CCAGCGCCAT	CTGATCGTTG
6301	GCAACCAGCA	TCGCAGTGGG	AACGATGCCC	TCATTGAGCA	TTTGATGGT	TTGTTGAAAA
6361	CCGGACATGG	CACTCCAGTC	GCCTTCCCGT	TCCGCTATCG	GCTGAATTTG	ATTGCGAGTG
6421	AGATATTTAT	GCCAGCCAGC	CAGACGCAGA	CGCGCCGAGA	CAGAACTTAA	TGGGCCCGCT
6481	AACAGCGCGA	TTTGCTGGTG	ACCCAATGAG	ACCAGATGCT	CCACGCCAG	TCGCGTACCG
6541	TCTTCATGGG	AGAAAATAAT	ACTGTTGATG	GGTGTCTGGT	CAGAGACATC	AAGAAAATAAC
6601	GCCGGAACAT	TAGTGCAGGC	AGCTTCCACA	GCAATGGCAT	CCTGGTCATC	CAGCGGATAG
6661	TTAATGATCA	GCCCACTGAC	GCGTTGCGCG	AGAAGATTGT	GCACCGCCGC	TTTACAGGCT
6721	TCGACGCCGC	TTCGTTCTAC	CATCGACACC	ACCACGCTGG	CACCCAGTTG	ATCGGCGCGA

```

6781 GATTTAATCG CCGCGACAAT TTGCGACGGC GCGTGCAGGG CCAGACTGGA GGTGGCAACG
6841 CCAATCAGCA ACGACTGTTT GCGCGCCAGT TGTTGTGCCA CGCGGTTGGG AATGTAATTC
6901 AGCTCCGCCA TCGCCGCTTC CACTTTTTTC CGCGTTTTTC CAGAAACGTG GCTGGCCTGG
6961 TTCACCACGC GGGAAACGGT CTGATAAGAG ACACCGGCAT ACTCTGCGAC ATCGTATAAC
7021 GTTACTGGTT TCACATTCAC CACCCTGAAT TGACTCTCTT CCGGGCGCTA TCATGCCATA
7081 CCGCGAAAGG TTTTGCGCCA TTCGATGGTG TCCGGGATCT CGACGCTCTC CCTTATGCGA
7141 CTCCTGCATT AGGAAGCAGC CCAGTAGTAG GTTGAGGCCG TTGAGCACCG CCGCCGCAAG
7201 GAATGGTGCA TGCAAGGAGA TGGCGCCCAA CAGTCCCCCG GCCACGGGGC CTGCCACCAT
7261 ACCCACGCCG AAACAAGCGC TCATGAGCCC GAAGTGGCGA GCCCGATCTT CCCCATCGGT
7321 GATGTCGGCG ATATAGGCGC CAGCAACCGC ACCTGTGGCG CCGGTGATGC CGGCCACGAT
7381 GCGTCCGGCG TAGAGGATCG AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG
7441 GAATTGTGAG CGGATAACAA TTCCCCTCTA GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG
7501 ATATACCATG GGCCATCATC ATCATCATCA TCATCATCAT CACAGCAGCG GCCATATCGA
7561 AGGTCGTCA

```

pSJK22

Entspricht Plasmid pSJK21, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK22 wie folgt lautet: GGCGGTAAAAAACA

pSJK23

Entspricht Plasmid pSJK21, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK23 wie folgt lautet: GGTGGTGGCGGCAGCGGTGGGGGTGGCTCG

pSJK24

Entspricht Plasmid pSJK21, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK24 wie folgt lautet: CTTGCTGAAGCGGCGGCCAAAGAAGCCGCAGCAAAGGAGGCTGCCGCAAAGCCGCAGCG

pSJK25

Entspricht Plasmid pSJK21, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK25 wie folgt lautet: GAAGCGGCGGCCAAAGAAGCCGCAGCAAAG

pSJK32

Entspricht Plasmid pSJK15, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK32 wie folgt lautet: TTTATATA

pSJK33

Entspricht Plasmid pSJK15, mit Ausnahme des unterstrichenen Bereichs, welcher bei pSJK33 wie folgt lautet: CCCATATA

phb-mRNA

Das bei der Firma Biomatik Corporation (Cambridge, CA) erworbene Gen für die 3'-UTR der hb mRNA wurde als Insert (inkl. NdeI und BamHI Schnittstellen) in dem Vektor „pBSK(+) Simple-Amp geliefert. Die Sequenz des Inserts lautet wie folgt:

```
catatgGTTCCCCATCACCATCACCTTGTTATTATTATTTATCACTATTATCATATAATCGTTGTCCAGAATTGTAT
ATATTCGTAGCATAAGTTTTCCAAACATTATTTTGTGTCGAAAATTGTACATAAGCCAATTAAGCCGCTAATTCTA
GACCTAAGTTTATCTAACTATCCTAACTGTATTGAACTGTAGCCACCTTTCAATCTGTCTCCTATACACTCTTGTAT
TTTCGAAATCGACTAAAAACCCTGAAAACGGTTTTAAAACTATCATAAATGCATGGAGAAACATAAGCCTAAGTTAA
ATCTAATTTGTAAGTTGAGTCAAGCGAAACAACCAACAATACCAACAGTCCAAAGTCAAATTAATAAAATATAGTT
TATAACATATACATAATGAGTATGTTTTCTAAAATAATTAATTAGTCTTATTTAACCTAACATATTCGTATATGCGC
ATAACACTCAGTTCTTTCTCTGATATTATTCTCTCAGTATTTTGTAGTTGAAAGCGAATTCGAATCGAACGAAATC
AAATCAAATAAATCCAATTATTCAATATAATTTACAAAGTTTTTCGCTTTTTTTTTTTTGTGTTAACCTTTTGGCAA
TAATGACAATATTTTCGATGCAACTGAACTGACGAAAGAAGAAGTACAAATTTAGAGATTTTTTAAAGAGTAGCTAA
GATGCGCGAAATCTGAGCAACGGATCAAAATTAGTATTTACCCCATAAATCTAAGTCGAGGTCATGAAACGAATTT
CGAGACTTAAGATGTGAGCCAGTGTAAATCCTTGATAAATCCCATTTTAAAGTAAATTAACTAGTCTAAGATATTTG
CCCACGAAATGTTTTTATGCAATAACATAATAAAGATGAAGATATTATTATTATTATggatcc
```

9.4 Aminosäure-Sequenzen

Die Aminosäure-Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit rekombinant produzierten Proteine (Tabelle 6.13) unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide (Tabelle 6.15, Kapitel 9.3) sind im Folgenden aufgeführt.

Pum-S10-S11

```
MGHHHHHHHHHSSGHIEGRHMGRSRLLDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQ
KCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEI
RGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTM MKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIA
TLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGGTDVGS GGGSM DLPDDHYLSTQTILSKDLNEKRDH MVLEYVTAAGITDAS
```

S10(Y)-Var2

```
MDLPDDHYLSYQTILSKDLNGTDVGS GGGSMGRSRLLDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVF
NEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQN
GNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVYVIQHVLEHGRPED
KSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTM MKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMH
KIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGL EHHHHHH
```

S10(Y)-WT

MDLPDDHYLSYQTILSKDLNGTDVGSGGGSMGRSRLLDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVF
 NEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAEIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKQDQ
 NGNHVVQKCIQECVQPQSLQFIIDAFKQVVFALSTHPYGCVRVIRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPE
 DKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVM
 HKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGLHHHHHH

wsGFP

MRKGEELFTGVVPILIELDGDVNGHKFFVRGEGEGDATIGKLSLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSA
 MPEGYVQERTIYFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHSHKVYITADKQNNGIKANFTIRHNVEDGS
 VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDDHYLSTQTILSKDLNEKRDHMLLEYVTAAGITDAS

wsYFP

MRKGEELFTGVVPILIELDGDVNGHKFFVRGEGEGDATIGKLSLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSA
 MPEGYVQERTIYFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHSHKVYITADKQNNGIKANFTIRHNVEDGS
 VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDDHYLSYQTILSKDLNEKRDHMLLEYVTAAGITDAS

9.5 RNA-Sequenzen

Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten RNAs sind im Folgenden aufgeführt.

5F-boxAB-3F

GGGAGACCACAACGGUUUCCUCUAGACCCAUACCAUACACCUUGUUAUUUUUUUAUCACUAUUUAUCAUAAUAAUC
 CCAGAAUUGUAUUAUUUUUUGAUUAUUCGUAGCAUAAGUUUUCCAAACAUUAUUUUUGUUGUCAGAUUUAGCAU
 AACCCCUUGGGGCCUCUAAACGGGUCUUGAGGGGUUUUUUGCUCCAUGGUUAUUCUCCUUAUUAAAGUUAACAAAA
 UUAUUUCUACAGGAUCCAUGAUC

NREx20_500

GGGUAAUCGUUGUCCAGAAUUGUAUUAUUCGUAGCAUAAGUUUUCCAAACAUUAUUUUUGUUGUCGAAAAUUGUACA
 UAAGCCAAUUAAGCCGCUAAUUCUAGACCUAAGUUUAUCUAACUAUCCUAACUGUAUUGAACUGUAGCCACCUUUA
 AUCUGUCUCCUAUACACUCUUGUAUUUUUGAAAUCGACUAAAAACCCUGAAAACGGUUUUAAAACUAUCAUAAAUGC
 AUGGAGAAACAUAGCCUAAGUUAAAUCUAAUUUGUAAGUUGAGUCAAGCGAAACAACCAAACAAUACCAACAGUCC
 AAAGUCAAAUUAUAAAAUUAAGUUUAUACAUUAUACAUAUAGAGUAUGUUUUUCUAAAAUAAUUAUUAGUCUUAUU
 UAACCUAACAUUUCGUUAUUGCGCAUAACACUCAGUUCUUUCUCUGAUUAUUUUCUCAGUAUUUUUGUUAUUGA
 AAGCGAAUUCGAAUCGAACGAAAUCAAUCAAUAAAUCCAUAUUUAUUAUUAUU

NKx20_300

GGGUAAUCGUUGUCCAGAAUCCCAUAUAUUCGUAGCAUAAGUUUUCCAAACAUAUAUUUUGUUGUCGAAAAUUGUACA
UAAGCCAAUUAAGCCGCUAAUUCUAGACCUAAGUUUAUCUAACUAUCCUAACUGUAUUGAACUGUAGCCACCUUUA
AUCUGUCUCCUAUACACUCUUGUAUUUUCGAAUCGACUAAAAACCCUGAAAACGGUUUAAAAACUAUCAUAAAUGC
AUGGAGAAACAUAAGCCUAAGUUAAAUCUAAUUUGUAAGUUGAGUCAAGCGAAACAACCAAACAUAACCAACAGUCC
AAAGUCAAAUUA

Danksagung

Mein großer Dank richtet sich an Prof. Dr. Andrea Rentmeister. Ich danke ihr für das mir entgegengebrachte Vertrauen in diese Arbeit und dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, neben der direkten Arbeit an meinen Projekten auch weitere, forschungsrelevante Dinge zu erlernen, Verantwortung zu übernehmen und mich weiterzuentwickeln. Ich danke ihr außerdem, dass sie stets für Rückfragen und Diskussionen zur Verfügung stand.

Ich werde Deine weitere Karriere mit Spannung verfolgen und wünsche Dir für die Zukunft viel Erfolg!

Ein großes Dankeschön richtet sich auch an Prof. Dr. Ulrich Hahn für das Zur-Verfügung-Stellen des FACS Aria™ III und die Möglichkeit wiederholt wochenlang in seinem Labor arbeiten zu dürfen. Außerdem danke ich ihm für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Florian Mittelberger und Thorsten Mix möchte ich ganz herzlich für die Einarbeitung und die Betreuung am FACS danken. Dem gesamten Arbeitskreis Hahn danke ich zudem für die freundliche Aufnahme während der „FACS-Wochen“.

Bei Prof. Dr. Natalie E. Broude, Dr. Geoffrey S. Waldo und Prof. Dr. Beatrix Süß möchte ich mich für die Bereitstellung der Plasmide pMB38, pET28b+ GFP1-9 und pTet-SpecR sowie pWH610L3F5F bedanken. Sie haben mir einige der Klonierungen deutlich erleichtert.

Den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Rentmeister sowie dem gesamten Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg und dem Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Dem Institut für Biochemie der WWU Münster danke ich außerdem dafür, dass es uns nach dem Umzug so freundlich aufgenommen und den Anfang erleichtert hat.

Bei Dr. Fredrick Höhn möchte ich mich für das engagierte Basteln und für so manche technische Unterstützung zu später Stunde bedanken.

Vielen Dank auch an meine Bachelor- und Projektstudenten Maximilian Wienema, Florian Lenz, Felix Bourier, und insbesondere Lukas Rößner und Kathrin Kirchhoff für ihre Mitarbeit. Es hat mir wirklich Spaß gemacht, euch zu betreuen und ich wünsche euch für eure eigenen Arbeiten alles Gute!

Außerdem möchte ich mich bei Sabine Hüwel, Julia Sandberg-Meinhardt und Ann-Marie Lawrence-Dörner für die tolle Unterstützung und Organisation von so manchem Drumherum bedanken.

Ein großer Dank geht an dieser Stelle auch an Dr. Anna Rath und Herrn K. aus H. für ihr Durchhaltevermögen und das gründliche Lesen und Kommentieren der gesamten Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt den „Hamburgern“: Josephin Holstein, Dr. Stephanie Besztejan, Dr. Anna Rath, Dr. Daniela Stummer, Dénes Haase und Julia-Sandberg-Meinhardt. Ihr seid einfach super und ich bin sehr dankbar dafür, Teil dieser Glücksbärchi-Bande zu sein! *Thank you for caring!*

~ ~ ~

Und dann sind da noch die Menschen, die (überwiegend) keine Ahnung von dem hatten, was ich ihnen während der letzten Jahre über diese Arbeit erzählt habe, aber mich trotzdem immer bedingungslos unterstützt haben: meine Familie, meine Freunde und mein Freund. Ich danke euch von Herzen dafür, dass ihr immer für mich da seid und an mich glaubt und dafür, dass ihr diesen Weg gemeinsam mit mir gegangen seid! ☺

Publikationen

Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *A FACS-based screening strategy to assess sequence-specific RNA-binding of Pumilio protein variants in E. coli*, Biological Chemistry, **2016**, DOI: 10.1515/hsz-2016-0214.

Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *A genetically encodable system for sequence-specific detection of RNAs in two colors*, ChemBioChem, **2016**, 17, 895-899.

Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *Manipulation von RNA mit Designerproteinen*, Nachrichten aus der Chemie, **2016**, 64, 297-301.

Hansen, H., Purohit, A. A., Leiros, H.-K. S., Johansen, J. A., Kellermann, S. J., Bjelland, A. M., Willassen, N. P., *The autoinducer synthases LuxI and AinS are responsible for temperature-dependent AHL production in the fish pathogen Aliivibrio salmonicida*, BMC Microbiology, **2015**, 15, 69.

Rath, A. K., Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *Programmable design of functional ribonucleoprotein complexes*, Chemistry – An Asian Journal, **2014**, 9, 2045-2051.

Kellermann, S. J., Rentmeister, A., *Current Developments in Cellulase Engineering*, ChemBioEng Reviews, **2014**, 1, 6-13.

Kellermann, S. J.*, Rath, A. K.*, Rentmeister, A., *Tetramolecular fluorescence complementation for detection of specific RNAs in vitro*, ChemBioChem, **2013**, 14, 200-204. *geteilte Erstautorenschaft

Vorträge

Strategien zur Etablierung von TetFC *in vivo*, 32. Rabensteiner Kolleg, Pottenstein, 2014.

Tetramolekulare Fluoreszenzkomplementierung zur Detektion von spezifischen RNAs *in vitro*, 31. Rabensteiner Kolleg, Pottenstein, 2013 sowie Medical Life Sciences – 10. Studententagung, Hamburg, 2013.

Poster

Sequence-Specific Detection of RNA in Two Colors Using a Genetically Encodable System, Stefanie J. Kellermann, Andrea Rentmeister, 7th MSCEC, Münster, 2016.

Programmable Design of Functional Ribonucleoprotein Complexes, Stefanie J. Kellermann, Anna K. Rath, and Andrea Rentmeister, 8th Meeting of the GBM Study Section RNA-Biochemistry, Bonn, 2014.

Towards Novel Methods for RNA Imaging in Living Cells, Stefanie J. Kellermann, Josephin M. Holstein, Daniela Stummer, and Andrea Rentmeister, CiM-IMPRS, Münster, 2014.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 31.07.2016

.....

Stefanie Julia Kellermann