

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

**„Funktionelle Charakterisierung von Komponenten des  
humanen und des *Methanocaldococcus jannaschii*  
*RNA-induced silencing* Komplexes“**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Naturwissenschaften-

vorgelegt von  
**Sarah Willkomm**  
aus Lübeck



**UNIVERSITÄT ZU LÜBECK**

Lübeck, Januar 2015





Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Restle  
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Peters  
Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2015  
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 16.12.2015



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1. RNA Interferenz . . . . .	5
2.1.1. Die Entdeckung der RNA Interferenz . . . . .	5
2.1.2. Die siRNA-vermittelte RNAi . . . . .	7
2.1.3. Die miRNA-vermittelte RNAi . . . . .	8
2.1.4. Die durch bakterielle Ago Proteine vermittelte Nukleinsäure-Interferenz . . . . .	10
2.2. Die Kinetik der siRNA-vermittelten RNAi . . . . .	12
2.3. Die Argonaute Proteine . . . . .	15
2.3.1. Das humane Argonaute2 (hAgo2) Protein . . . . .	20
2.3.2. Die N-terminale Domäne . . . . .	21
2.3.3. Die PIWI/Argonaute/Zwille (PAZ) Domäne . . . . .	23
2.3.4. Die <i>middle</i> (Mid) Domäne . . . . .	24
2.3.5. Die <i>P-element-induced wimpy testis</i> (PIWI) Domäne . . . . .	26
2.3.6. Das <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> Argonaute Protein . . . . .	27
2.4. Strukturelle Voraussetzungen für die hAgo2-vermittelte siRNA-abhängige <i>target</i> RNA Spaltung . . . . .	29
2.4.1. Strukturelle Eigenschaften von kleinen regulatorischen RNAs und <i>target</i> RNAs . . . . .	29
2.4.2. Konformationelle Änderungen des Argonaute Proteins bei Bindung von siRNAs bzw. <i>target</i> RNAs . . . . .	30
2.4.3. Der Mechanismus der Argonaute-vermittelten Spaltung . . . . .	33
2.5. Die dsRNA-bindenden Proteine . . . . .	35
2.5.1. Das humane TRBP im Kontext der RNAi . . . . .	36
2.5.2. Das humane PACT im Kontext der RNAi . . . . .	37
2.6. Ziel und Motivation dieser Arbeit . . . . .	38
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1. Material . . . . .	41
3.1.1. Geräte . . . . .	42
3.1.2. Verbrauchsmaterialien . . . . .	43
3.1.3. Säulen und Säulenmaterialien . . . . .	44
3.1.4. Chemikalien . . . . .	44
3.1.5. Radiochemikalien . . . . .	46
3.1.6. Puffer und Lösungen . . . . .	46

3.1.7. Polyacrylamidgele . . . . .	48
3.1.8. Enzyme . . . . .	48
3.1.9. Kits und Größenmarker . . . . .	49
3.1.10. Nukleinsäuren . . . . .	50
3.1.10.1. Oligonukleotide . . . . .	50
3.1.10.2. Primer . . . . .	51
3.1.10.3. Plasmide . . . . .	52
3.1.10.4. <i>In vitro</i> Transkripte . . . . .	54
3.1.11. Bakterienkultur . . . . .	55
3.1.11.1. Kulturmedien . . . . .	55
3.1.11.2. Bakterienstämme . . . . .	55
3.1.12. Computerprogramme . . . . .	55
3.2. Molekularbiologische Methoden . . . . .	57
3.2.1. Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> Lysaten . . . . .	57
3.2.1.1. Mini-Präparation . . . . .	57
3.2.1.2. Maxi-Präparation . . . . .	57
3.2.2. PCR . . . . .	57
3.2.2.1. Standard PCR . . . . .	57
3.2.2.2. <i>Site-directed mutagenesis</i> PCR . . . . .	59
3.2.2.3. <i>Overlap extension</i> PCR . . . . .	60
3.2.3. Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren . . . . .	62
3.2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	62
3.2.3.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	62
3.2.4. Detektion von Nukleinsäuren nach der Gelelektrophorese . . . . .	63
3.2.4.1. Autoradiographie . . . . .	63
3.2.4.2. Färbung mit Stains-All . . . . .	64
3.2.4.3. Färbung mit Ethidiumbromid . . . . .	64
3.2.5. Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen . . . . .	64
3.2.6. Restriktionsverdau von DNA . . . . .	64
3.2.6.1. Analytischer Restriktionsverdau . . . . .	64
3.2.6.2. Präparativer Restriktionsverdau . . . . .	65
3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	65
3.2.8. Herstellung von chemisch kompetenten Zellen . . . . .	66
3.2.9. Transformation von Plasmid DNA in chemisch kompetente Zellen . . . . .	66
3.2.10. Kontrolle von Klonierung und Transformation . . . . .	67
3.2.10.1. Sequenzierung von Nukleinsäuren . . . . .	67
3.2.11. Herstellung von Glycerinkulturen zur Kryokonservierung von Bakterienstämmen . . . . .	67
3.2.12. Expression von rekombinanten Proteinen . . . . .	67
3.2.12.1. Kontrolle der Expression . . . . .	68

3.2.13. Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen . . . . .	68
3.2.13.1. Nukleinsäuren . . . . .	68
3.2.13.2. Proteine . . . . .	69
3.2.14. Hybridisierung von Nukleinsäuren . . . . .	69
3.2.15. <i>In vitro</i> Transkription . . . . .	70
3.2.16. Phenol-Chloroform Extraktion zur Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	70
3.2.17. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren . . . . .	70
3.2.18. Dephosphorylierung von Nukleinsäuren . . . . .	70
3.2.19. 5'-Phosphorylierung von Nukleinsäuren . . . . .	71
3.2.19.1. 5'-Phosphorylierung mit radioaktivem <sup>32</sup> P . . . . .	71
3.2.20. Szintillationsmessung als Erfolgskontrolle der radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden . . . . .	71
3.2.21. T1-Verdau zur Herstellung radioaktiver Größenmarker . . . . .	72
3.3. Biochemische Methoden . . . . .	72
3.3.1. Bakterienlyse als Voraussetzung für die Aufreinigung rekombinanter Proteine . . . . .	72
3.3.1.1. Lyse des Bakterienpellets mit rekombinant exprimierten hAgo2 . . . . .	72
3.3.1.2. Lyse des Bakterienpellets mit rekombinant exprimierten hTRBP oder hPACT . . . . .	72
3.3.2. Aufreinigung rekombinanter Proteine . . . . .	72
3.3.2.1. Aufreinigung von rekombinantem hAgo2 . . . . .	73
3.3.2.2. Aufreinigung von rekombinantem hTRBP oder hPACT . . . . .	73
3.3.2.3. Dialyse . . . . .	73
3.3.3. SDS-PAGE . . . . .	74
3.3.3.1. Detektion von Proteinen nach SDS-PAGE . . . . .	74
3.3.4. Spaltexperiment zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität von hAgo2 . . . . .	75
3.3.5. Fluoreszenzspektroskopische Messungen zur Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten . . . . .	76
3.3.6. Transiente Fluoreszenzmessungen mit Hilfe der <i>stopped flow</i> Methode . . . . .	77
3.3.7. Dynamische Lichtstreuung (DLS) zur Untersuchung der Aggregat-Bildung in Proteinlösungen . . . . .	78
3.3.8. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der <i>pulldown</i> Methode . . . . .	79
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>81</b>
4.1. Vorbemerkung . . . . .	81
4.2. <i>Guide</i> Strang-abhängige Ago-vermittelte Bindung und Spaltung von <i>target</i> Strängen . . . . .	81
4.2.1. Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen hAgo2 und <i>guide</i> bzw. <i>target</i> RNAs . . . . .	82
4.2.1.1. Kinetische Untersuchung der <i>guide</i> RNA Bindung durch hAgo2 . . . . .	83

4.2.1.2.	Kinetische Untersuchung der <i>target</i> RNA Erkennung und Bindung durch binäre hAgo2- <i>guide</i> RNA Komplexe . . . . .	89
4.2.1.3.	Zusammenfassung der kinetischen Parameter für die Bildung binärer und ternärer Komplexe . . . . .	96
4.2.1.4.	Charakterisierung der hAgo2-vermittelten <i>target</i> RNA Spaltung	96
4.2.2.	Vergleichende Analysen der Bildung von binären und ternären Komplexen an Hand von MjAgo . . . . .	99
4.2.2.1.	Kinetische Untersuchung der MjAgo-vermittelten <i>guide</i> DNA Bindung . . . . .	100
4.2.2.2.	Bestimmung der Affinität von MjAgo für verschiedene <i>guide</i> Substrate . . . . .	104
4.2.2.3.	Kinetische Untersuchung der <i>target</i> DNA Bindung durch binäre MjAgo- <i>guide</i> -Komplexe . . . . .	106
4.2.2.4.	Bestimmung der Affinität binärer Komplexe für <i>target</i> DNA . . . . .	109
4.2.2.5.	Zusammenfassung der biochemischen Parameter für binäre und ternäre Komplexe . . . . .	111
4.2.2.6.	Kinetische Analyse der MjAgo-vermittelten <i>target</i> DNA Spaltung	111
4.2.3.	Biochemische Analyse der Bedeutung des <i>guide</i> 5'-Nukleotids und der <i>guide</i> Sequenz für die Bildung binärer und ternärer Komplexe . . . . .	113
4.2.3.1.	Vergleichende kinetische Analyse der Bildung von binären Komplexen mit unterschiedlichen <i>guide</i> Strängen . . . . .	113
4.2.3.2.	Bestimmung der Affinität von Ago Proteinen für verschiedene <i>guide</i> Stränge . . . . .	120
4.2.3.3.	Vergleichende kinetische Analyse der Bildung ternärer Komplexe mit unterschiedlichen <i>guide</i> Strängen . . . . .	124
4.2.3.4.	Bestimmung der Affinität binärer MjAgo-let7 <i>guide</i> Komplexe für <i>target</i> DNA . . . . .	127
4.2.3.5.	Biochemische Analyse der Auswirkungen verschiedener <i>guide</i> Sequenzen auf die Ago-vermittelte Spaltung . . . . .	128
4.2.4.	Biochemische Analyse des Einflusses der <i>target</i> Länge auf die Bildung ternärer Komplexe . . . . .	133
4.2.4.1.	Einfluss der <i>target</i> Strang Länge auf die Kinetik der Assoziation ternärer Komplexe . . . . .	133
4.2.4.2.	Untersuchung der Affinität ternärer Komplexe in Abhängigkeit von der <i>target</i> Länge . . . . .	136
4.2.4.3.	Einfluss der <i>target</i> DNA Länge auf die Spaltaktivität der Ago Proteine . . . . .	138
4.2.4.4.	Der Einfluss der <i>target</i> RNA Länge auf das Oligomerisierungsverhalten von hAgo2 . . . . .	142

4.3.	Regulation der katalytischen Aktivität von hAgo2 durch die L2 Linker Region und das aktive Zentrum . . . . .	145
4.3.1.	Biochemische Analyse der Bedeutung der Aminosäuren der katalytischen Tetrade für die hAgo2-vermittelte RNA Spaltung . . . . .	145
4.3.2.	Biochemische Analyse der Bedeutung der L2 Linker Region für die katalytische Aktivität von hAgo2 . . . . .	149
4.3.2.1.	Analysen zur Bedeutung der Salzbrücke zwischen der L2 Linker Domäne und dem NSL . . . . .	149
4.3.2.2.	Analysen zur Bedeutung der Aminosäure I365 für die korrekte Positionierung der <i>guide</i> RNA in hAgo2 . . . . .	154
4.4.	Effekt von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von RNAs . . . . .	160
4.4.1.	Charakterisierung der Bindung von hTRBP und hPACT an siRNA . . . . .	160
4.4.1.1.	Kinetische Analyse der Assemblierung von siRNA und hTRBP bzw. hPACT . . . . .	160
4.4.1.2.	Bestimmung der Affinität von hTRBP und hPACT für siRNA . . . . .	162
4.4.2.	Untersuchung des Einflusses von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Spaltung von RNAs . . . . .	165
4.4.3.	Untersuchung des Einflusses von hTRBP und hPACT auf die Bindung von RNAs durch hAgo2 . . . . .	170
4.4.3.1.	Analyse des Effekts der dsRNA-bindenden Proteine auf die Bildung binärer Komplexe aus hAgo2 und siRNA . . . . .	171
4.4.3.2.	Analyse der Dissoziation ternärer Komplexe in Gegenwart dsRNA-bindender Proteine . . . . .	174
4.4.4.	Charakterisierung der Komplexe aus hAgo2, siRNA und dsRNA-bindenden Proteinen . . . . .	177
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>181</b>
5.1.	Molekulare Mechanismen der <i>guide</i> Strang-abhängigen Ago-vermittelten <i>target</i> Strang Spaltung . . . . .	182
5.1.1.	Die Assoziation des <i>guide</i> Strangs mit der Mid und der PAZ Domäne des Ago Proteins ist ein universelles Kennzeichen für die korrekte Positionierung des <i>guide</i> Strangs im binären Komplex . . . . .	182
5.1.1.1.	Unterschiede zwischen hAgo2 und MjAgo in der Bindung und Selektion von <i>guide</i> Substraten . . . . .	184
5.1.2.	Die Bindung des <i>guide</i> Strangs an Mid und PAZ Domäne stellt ein Auswahlkriterium für die Selektion von <i>guide</i> Strängen dar . . . . .	185
5.1.3.	Die Bildung katalytisch aktiver ternärer Komplexe erfordert nach jeder <i>target</i> Strang Spaltung eine erneute Positionierung des <i>guide</i> Strang 3'-Endes in der PAZ Domäne . . . . .	187
5.1.4.	Die Mechanismen der Bildung katalytisch aktiver ternärer Komplexe von hAgo2 und MjAgo sind vergleichbar . . . . .	189

5.1.5.	Die Geschwindigkeit der Dissoziation ternärer Komplexe wird durch konformationelle Umlagerungen der Ago Proteine bestimmt . . . . .	189
5.2.	Bedeutung des 5'-Nukleotids der <i>guide</i> Stränge für die Bildung binärer und ternärer Komplexe . . . . .	190
5.2.1.	Das humane Ago2 bildet katalytisch aktive Komplexe mit allen vier unterschiedlichen <i>guide</i> 5'-Nukleotiden . . . . .	191
5.2.1.1.	Der NSL stabilisiert vermutlich verschiedene 5'-Nukleotide in der Mid Bindungstasche . . . . .	192
5.2.2.	Das humane Ago2 und das archaeele MjAgo binden in vergleichbarer Weise an <i>guide</i> Stränge mit verschiedenen 5'-Nukleotiden . . . . .	193
5.2.3.	Der Einfluss des 5'-Phosphats auf die Bindung des <i>guide</i> Stranges an Ago ist abhängig vom 5'-Nukleotid . . . . .	195
5.2.4.	Die <i>guide</i> Strang Sequenz hat einen Einfluss auf die Bildung ternärer Komplexe . . . . .	196
5.3.	Bedeutung der <i>target</i> Länge für die Bildung ternärer Komplexe . . . . .	198
5.3.1.	Mit langer <i>target</i> RNA kann die Assoziation ternärer Komplexe den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spaltreaktion darstellen . . . . .	198
5.3.2.	Lange <i>target</i> Stränge können die Konformation ternärer Komplexe beeinflussen . . . . .	200
5.4.	Grundlagen der Regulation der <i>passenger</i> RNA Spaltung durch hAgo2 . . . . .	203
5.4.1.	Ein <i>target</i> RNA Überschuss beschleunigt die Dissoziation der <i>passenger</i> RNA durch einen möglichen „Stranginvasions“-Mechanismus . . . . .	203
5.5.	Die Bedeutung der katalytischen Tetrade von hAgo2 für die Spaltung von <i>target</i> RNAs . . . . .	205
5.6.	Die Bedeutung der L2 Linker Domäne für die Funktion von hAgo2 . . . . .	207
5.6.1.	Eine Interaktion zwischen der L2 Linker Domäne und der Mid Domäne stabilisiert hAgo2 . . . . .	207
5.6.2.	Die Aminosäure Ile365 assistiert bei der Positionierung der siRNA . . . . .	208
5.7.	Grundlagen des Effekts von dsRNA-bindenden Proteinen auf die hAgo2-vermittelte Spaltung . . . . .	209
5.7.1.	Charakterisierung der siRNA Bindung durch die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT . . . . .	210
5.7.2.	Die Effizienz der hAgo2-vermittelten Spaltung von <i>target</i> RNAs wird durch hTRBP und hPACT erhöht . . . . .	212
5.7.3.	hTRBP-D12 beschleunigt selektiv die Spaltung von kurzen <i>target</i> RNAs . . . . .	214
5.7.3.1.	hTRBP und hPACT beeinflussen die Spaltproduktfreisetzung durch hAgo2 . . . . .	214
5.7.4.	Die Beladung von hAgo2 mit siRNAs wird durch hTRBP und hPACT unterstützt . . . . .	215
5.7.5.	Die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT interagieren unterschiedlich mit den hAgo2-siRNA Komplexen . . . . .	216



5.8. Erweitertes mechanistisches Modell der hAgo2-vermittelten siRNA-abhängigen <i>target</i> RNA Spaltung . . . . .	218
5.9. Ausblick . . . . .	220
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>221</b>
<b>7. Abkürzungen</b>	<b>241</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>245</b>
<b>A. Theoretische Grundlagen der verwendeten Methoden</b>	<b>I</b>
A.1. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante unter Gleichgewichtsbedingungen . . . . .	I
A.2. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante mit Hilfe von Kompetitio- nstitration . . . . .	III
A.3. Bestimmung der <i>pre-steady state</i> Ratenkonstanten mit Hilfe der <i>stopped flow</i> Methode . . . . .	IV
A.4. Bestimmung von Partikelgrößen mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung (DLS) . . .	IV
<b>B. Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine</b>	<b>VII</b>



# 1. Zusammenfassung

Argonaute (Ago) Proteine werden in allen drei Domänen des Lebens gefunden. In Eukaryoten sind sie die Schlüsselenzyme der RNA Interferenz (RNAi), die spezifisch auf posttranskriptioneller Ebene die Genexpression reguliert. Ago Proteine binden u.a. an kurze doppelsträngige *small interfering* RNAs (siRNAs), wählen einen der beiden Stränge als *guide* aus und binden über diesen an komplementäre *target* mRNAs, deren Spaltung sie katalysieren. Eine vollständige biochemische Charakterisierung dieses Prozesses existiert bis heute nicht. In humanen Zellen ist nur hAgo2 zur Spaltung befähigt. Die siRNAs werden in der Zelle mit Hilfe eines Multiprotein Komplexes auf hAgo2 geladen. Dieser beinhaltet u. a. die dsRNA-bindenden Proteine humanes *TAR RNA-binding* Protein (hTRBP) und humanes *PKR-activating* Protein (hPACT). Der Einfluss dieser Proteine auf die hAgo2-vermittelte Spaltung von *target* RNAs ist bislang unklar. Die Aufgabe von Ago Proteinen in prokaryotischen Organismen ist im Gegensatz zu den eukaryotischen Ago Proteinen weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass sie in eine Verteidigungsstrategie gegen fremde genetische Elemente involviert sind.

Die vorliegende Promotionsarbeit leistet einen entscheidenden Beitrag, den Mechanismus der Bindung von hAgo2 an siRNAs sowie die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von *target* RNAs zu verstehen und so ein minimales mechanistisches Modell der siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten Spaltung von *target* RNAs zu etablieren. Dieses Modell passt sehr gut zu in Zellkultur erhobenen Daten und ermöglichte die Modellierung der RNAi im zellulären Kontext im Rahmen der Promotionsarbeit von S. Dornseifer. Außerdem bildete das minimal mechanistische Modell die Grundlage, um vergleichend das aus dem archaeellen *Methanocaldococcus jannaschii* stammende MjAgo zu analysieren, welches DNA als *guide* und *target* Substrat nutzt. Diese Arbeit präsentiert somit erstmals einen direkten Vergleich zwischen einem eukaryotischen und einem prokaryotischen Ago Protein, der zeigt, dass der Mechanismus der Nukleinsäure-Interaktion beider Proteine sehr ähnlich ist.

Anhand des minimal mechanistischen Modells wurde die Bedeutung des 5'-Nukleotids des *guide* Strangs für die Bildung binärer Ago-*guide* Komplexe analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass nicht, wie bisher vermutet, die selektiven Eigenschaften des *nucleotide specificity loop* (NSL) verantwortlich dafür sind, dass überwiegend *guide* Stränge mit einem 5'-terminalen Uracil gefunden werden. Sowohl hAgo2 als auch MjAgo binden *guide* Stränge mit verschiedenen 5'-terminalen Nukleotiden mit vergleichbarer Affinität und bilden katalytisch aktive ternäre Komplexe. Experimente mit hAgo2 Proteinen, die eine Mutation im NSL aufweisen, implizieren eine Funktion des NSL in der Anpassung der Mid Bindungstasche an verschiedene 5'-terminale Nukleotide. Die in verschiedenen Studien beschriebene signifikante Verminderung der Affinität von hAgo2 für unphosphorylierte *guide* Stränge mit einem 5'-terminalen Uracil konnte mit anderen 5'-Nukleotiden nicht bestätigt werden. Ähnliche Befunde konnten mit MjAgo erhoben

## 1. Zusammenfassung

werden. Die Bedeutung des 5'-terminalen Phosphats ist demnach vom 5'-terminalen Nukleotid abhängig. Das 5'-Nukleotid gewinnt an Bedeutung für die Bindung von Ago an einen *guide* Strang, wenn eine *guide-target* Kombination ausgewählt wird, die zu multiplen Spaltprodukten führt. Bedingt durch die Sequenz des *guide-target* Duplexes kann dieser unterschiedliche Positionen relativ zum aktiven Zentrum von hAgo2 einnehmen. Es zeigte sich, dass diese Positionierung durch das 5'-Nukleotid beeinflusst werden kann.

Weiterhin stellt diese Promotionsarbeit erstmals Analysen zur Bedeutung der *target* Strang Länge für die Ago-katalysierte Spaltung vor. Bislang wurden mögliche Effekte unterschiedlich langer *target* RNAs auf die enzymatischen Eigenschaften von Ago nicht systematisch untersucht. Es zeigte sich, dass lange *target* Stränge die Kinetik der Bildung ternärer Komplexe verändern. Die Konformation ternärer Komplexe ist somit abhängig von der *target* RNA Länge und beeinflusst die Effizienz der Spaltung ebenso wie die Positionierung des spaltbaren Phosphats der *target* RNA relativ zum aktiven Zentrum. Entscheidenden Einfluss hat die *target* Länge außerdem auf den postulierten „Stranginvasions“-Mechanismus. Schon mit einer kurzen *target* RNA konnte im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche „Stranginvasion“ in bestehende ternäre Komplexe gezeigt werden. Mit langer *target* RNA konnte eine mögliche „Stranginvasion“ auch in binäre hAgo2-siRNA Komplexe nachgewiesen werden.

Die Funktionalität der Ago Proteine wird jedoch nicht nur durch *guide* und *target* Substrate beeinflusst. Essentiell ist die katalytische Tetrade im aktiven Zentrum des Ago Proteins. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren dieser Tetrade die Grundlage für eine strukturelle Umlagerung zur Einnahme einer spaltungskompetenten Konformation bilden. Neben der katalytischen Tetrade spielt die Helix 7 der L2 Linkerregion eine wichtige Rolle. *In silico* Daten von Dr. M. Kalia zeigen, dass eine Salzbrücke zwischen dem K525 des NSL und dem D358 der Helix 7 entsteht, die zur Stabilisierung von hAgo2 beitragen kann. Dies konnte durch biochemische Analysen bestätigt werden. Es zeigte sich allerdings auch, dass neben der Ausbildung einer Salzbrücke eine definierte Länge der Helix 7 ein weiterer wichtiger Faktor für die Stabilität von hAgo2 ist. Die Helix 7 hat neben einer Stabilisierung des Enzyms eine wichtige Funktion für die Regulierung der Bildung binärer und ternärer Komplexe. Am unteren Ende der Helix 7 befindet sich das I365, dessen Rolle in der Bildung binärer und ternärer Komplexe in dieser Arbeit näher charakterisiert wurde.

Eine Modulation von hAgo2 erfolgt auch über andere Proteine des RNAi Weges. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte erstmals eine Funktion der dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT auf die siRNA-abhängige hAgo2-vermittelte *target* RNA Spaltung gezeigt werden. Zum Einen kommt es in Anwesenheit von hTRBP und hPACT zu einer korrekten Bindung von hAgo2 an Substrate, die von hAgo2 allein nicht in der richtigen Position gebunden werden können. Zum Anderen stabilisieren die beiden dsRNA-bindenden Proteine die Assoziation von hAgo2 und einem *guide* Substrat. Neben der Beladung von hAgo2 mit siRNA Substraten unterstützen hTRBP und hPACT außerdem die Regulation der Spaltprodukt-Freisetzung. Während in Anwesenheit von hPACT vermutlich die prämatüre Freisetzung eines ungespaltenen *target* Strangs blockiert wird, wird in Anwesenheit von hTRBP die Freisetzung der Spaltprodukte im *seed* Bereich beschleunigt, um Platz für neue *target* Substrate zu schaffen. Beide Proteine erhöhen so die Spalteffizienz von hAgo2 signifikant.

# Summary

Argonaute (Ago) proteins are found in all three domains of life. In eukaryotes they are the key enzymes of RNA interference (RNAi), a specific process to regulate gene expression on the posttranscriptional level. Ago proteins bind, amongst others, short double-stranded small interfering RNAs (siRNAs), select one of the strands as a guide to bind and cleave complementary target mRNAs. An in-depth biochemical characterization of this process does not exist. In human cells only hAgo2 is cleavage competent. In cells siRNA is loaded onto hAgo2 assisted by a multiprotein complex. Amongst others this complex contains human TAR RNA binding protein (hTRBP) und human PKR-activating Protein (hPACT). The implication of these proteins on hAgo2-mediated cleavage of target RNAs is not clear. In contrast to eukaryotic Agos the role of Ago proteins in prokaryotic organisms is largely unknown. They are suggested to be involved in a defense strategy against invading genetic elements.

This PhD thesis makes a crucial contribution the understanding of the mechanism of hAgo2 binding to siRNAs as well as the hAgo2-mediated binding and cleavage of target RNAs. These investigations eventually led to the establishment of a conclusive minimal mechanistic model of siRNA-dependent hAgo2-mediated cleavage of target RNAs. The model fits very well data from cell culture experiments and enabled modeling of RNAi in a cellular context within the scope of the PhD thesis of S. Dornseifer. Furthermore based on the minimal mechanistic model a comparative analysis of the *Methanocaldococcus jannaschii* Ago (MjAgo), using DNA as guide and target substrates, was conducted. This thesis presents the first direct comparison between a prokaryotic and a eukaryotic Ago protein, demonstrating the mechanisms of nucleic acid interaction being very similar.

Based on the minimal mechanistic model the impact of the guide 5'-nucleotide on the formation of binary Ago-guide complexes was analyzed. It could be shown that unlike suggested by others in the past, the selective properties of the nucleotide specificity loop (NSL) are not the cause for the observed prevalence of guide strands with a 5'-terminal uracil. MjAgo as well as hAgo2 bind guide strands with different 5'-terminal nucleotides with comparable affinities yielding catalytically active ternary complexes. Experiments with hAgo2 proteins mutated in the NSL imply the NSL to be involved in an adaption of the Mid binding pocket to different 5'-nucleotides. The significant reduction of affinity of hAgo2 for unphosphorylated guides described in various studies could not be confirmed using other 5'-nucleotides than a 5'-uracil. Similar results were obtained with MjAgo. The impact of the 5'-terminal phosphate is therefore determined by the nature of the 5'-nucleotide. The 5'-nucleotide gains in importance for the binding of hAgo2 to a guide RNA if a guide-target combination is selected that leads to multiple cleavage products. Dependent on the particular sequence the guide-target duplex may adopt different positions relative to the hAgo2 active site. As a consequence it could be shown substrate positioning can indeed be influenced by the 5'-nucleotide.

Moreover this thesis for the first time presents evidence for the importance of the target strand length on hAgo2-catalyzed cleavage. Until today there is no systematic analysis of pos-

## 1. Zusammenfassung

sible target length-induced effects on enzymatic properties of hAgo2. It was found that long target strands change the kinetics of ternary complex assembly. Therefore, ternary complex conformation is dependent on target RNA length and affects the efficiency of cleavage as well as the positioning of the target scissile phosphate relative to the active site. Furthermore the target length has decisive influence on a postulated „strand invasion“-mechanism. A possible „strand invasion“ into existing ternary complexes could be shown using short RNA strands. With a long target RNA a possible „strand invasion“ in binary hAgo2-siRNA complexes could be revealed.

The mode of action of Ago proteins is not only influenced by guide and target substrates. Essential for the function of Ago is its active site catalytic tetrad. It could be shown that these amino acids are crucial for structural transitions necessary to adopt a cleavage competent conformation. Besides the catalytic tetrad, helix 7 in the L2 linker region is important for Ago function. *In silico* data of Dr. M. Kalia show the formation of a salt bridge between K525 of the NSL and D358 within the helix 7 that might contribute to Ago stability. This could be confirmed by biochemical studies. Additionally, it was also shown that besides formation of the salt bridge a defined length of helix 7 is an important factor for Ago stability. In addition to stabilization of the enzyme helix 7 plays an important role in the regulation of binary and ternary complex formation. At the bottom of helix 7 there is I365 which was characterized regarding its role in binary and ternary complex formation.

A modulation of hAgo2 is also caused by means of other proteins of the RNAi pathway. This thesis for the first time presents a role of hTRBP and hPACT in siRNA-dependent hAgo2-mediated target RNA cleavage. On the one hand, in the presence of the two dsRNA-binding proteins correct binding of hAgo2 to substrates which cannot be bound by hAgo2 alone could be observed. On the other hand, both dsRNA-binding proteins stabilize the association of hAgo2 with guide substrates. In addition to assist loading of siRNAs to hAgo2 hTRBP and hPACT help to modulate cleavage product dissociation. While in presence of hPACT the premature release of uncleaved target RNAs is presumably blocked, hTRBP enhances the product release in the seed region to give room for new substrates. As a result both proteins significantly enhance hAgo2 cleavage efficiency.

## 2. Einleitung

### 2.1. RNA Interferenz

#### 2.1.1. Die Entdeckung der RNA Interferenz

RNA Interferenz (RNAi) ist ein hochspezifischer Mechanismus zur posttranskriptionellen Regulation der Genexpression unter Ausnutzung von kleinen doppelsträngigen regulatorischen RNAs. Eine Vielzahl von Lebewesen, angefangen bei Bakterien über Pilze, Insekten, Würmer und Säugetiere bis hin zum Menschen, besitzt die funktionelle Ausstattung für diesen evolutionär hoch konservierten Prozess<sup>(1-3)</sup>.

Erstmals beobachtet wurde das Phänomen der RNAi bereits im Jahre 1990 im Rahmen von Studien der Arbeitsgruppe um Jorgensen. Um die Blütenfarbe von Petunien zu intensivieren, brachten sie ein Transgen, welches für die Chalkonsynthese kodierte, in die Pflanzen ein. Die Chalkonsynthese produziert wichtige Intermediate für die Produktion von Anthocyanin, welches wiederum für die Blütenfarbe verantwortlich ist. Statt der erhofften Intensivierung der Blütenfarbe fanden sie jedoch einen teilweisen bis vollständigen Verlust der Blütenfarbe, welchen sie durch eine Stilllegung endogener und transgener Genloci durch Interaktion homologer Sequenzen erklärten. Sie nannten dieses Phänomen Co-Suppression, konnten aber den zu Grunde liegenden Mechanismus zunächst nicht erklären<sup>(4)</sup>. Eine weitere Arbeitsgruppe bestätigte die an Petunien beobachteten Effekte<sup>(5)</sup>. Ein der Co-Suppression sehr ähnlicher Effekt konnte zwei Jahre später über das Einbringen von homologen Sequenzen im Schimmelpilz *Neurospora crassa* (*N. crassa*) beobachtet werden. Hier wurde dieser Effekt *quelling* genannt, konnte aber ebenfalls nicht erklärt werden<sup>(6)</sup>. Weitere Hinweise zum Mechanismus der Co-Suppression bzw. des *quelling* lieferte eine Studie an Tabakpflanzen, welche durch virale Transgene eine Resistenz gegen dieses Virus erwarben. Die Arbeitsgruppe um Dougherty postulierte einen zytoplasmatischen Mechanismus, der über die Erkennung von RNA Sequenzen und deren Suppression eine Replikation des Virus verhindert<sup>(7)</sup>. Im gleichen Jahr wurde die erste endogen kodierte kleine regulatorische RNA entdeckt. Die Analyse der genomischen Sequenz des *lin-4* Gens ergab, dass es nicht für ein Protein kodiert. Trotzdem kommt es zu einer negativen Regulation der Menge des *lin-14* Proteins durch *lin-4*. Weitere Untersuchungen ergaben als Produkt des *lin-4* Gens zwei kurze Transkripte von etwa 20 und 60 Nukleotiden Länge, die Komplementarität zur 3'-untranslatierten Region (UTR) der *lin-14* mRNA aufwiesen. Die Arbeitsgruppe um Ambros vermutete, dass es sich um einen *antisense* Mechanismus zur Genregulation handeln könnte<sup>(8)</sup>.

Die Arbeiten von C. Mello und A. Fire lieferten dann erstmals genauere Informationen zu den Hintergründen der posttranskriptionellen Suppression von Transkripten. Sie nutzten als Modell-

## 2. Einleitung

organismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dem sie entweder einzelsträngige oder doppelsträngige RNA injizierten. Diese RNA deckte einen Sequenzbereich des *unc-22* Gens ab, welches für ein Myofilamentprotein kodiert. Sie fanden heraus, dass nur wenige Moleküle der doppelsträngigen RNA ausreichen, um Interferenz zu produzieren, während der Einzelstrang weit weniger effizient ist. Sie schlossen somit einen stöchiometrischen Suppressionseffekt aus und postulierten eine katalytische Komponente in dem Prozess, den sie RNA Interferenz nannten<sup>(9)</sup>. Damit war der Grundstein für die intensive Untersuchung des Mechanismus und des therapeutischen Potentials der RNAi gelegt. Dafür wurden C. Mello und A. Fire 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie ausgezeichnet.

Die entscheidende Publikation von C. Mello und A. Fire führte zur Identifikation weiterer kurzer regulatorischer RNAs, die angesichts ihrer geringen Länge als *microRNAs* (*miRNAs*) bezeichnet wurden<sup>(10–13)</sup>. Die Entwicklung eines *in vitro* assays zur Untersuchung der RNAi war dann die Grundlage für biochemische Charakterisierungen<sup>(14)</sup>, die dann auch zu ersten Informationen über die Anforderungen an eine zweite Klasse von kurzen regulatorischen RNAs, den *small interfering RNAs* (*siRNAs*) führten<sup>(15)</sup>. Gleichzeitig gelang der Nachweis, dass RNAi prinzipiell auch in humanen Zellen möglich ist<sup>(16)</sup>. Dies eröffnete den Weg für die Nutzung der RNAi sowohl zu therapeutischen Zwecken, als auch als Werkzeug für die funktionelle Analyse von Genen in humanen Zellen.

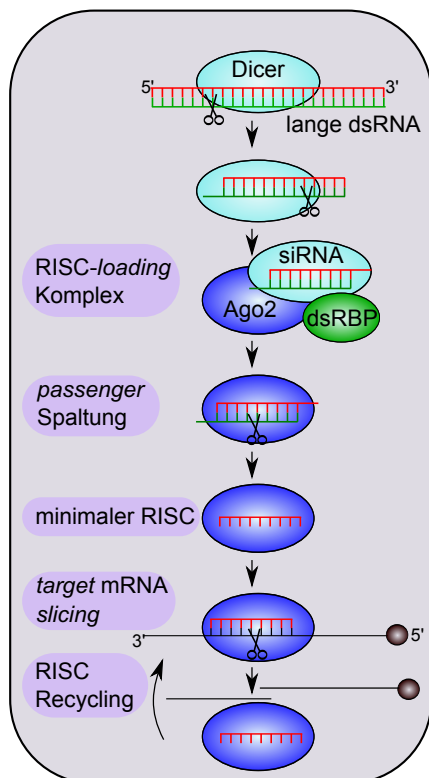
Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass etwa 20-30% der menschlichen Gene durch miRNAs reguliert werden<sup>(17,18)</sup>, obwohl sie weniger als 5% des gesamten Genoms ausmachen<sup>(19)</sup>. Die miRNA-vermittelte Regulation von Genexpression kontrolliert lebenswichtige Prozesse wie zum Beispiel Embryogenese, Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation und Apoptose<sup>(20,21)</sup>. Dabei bleibt es nicht aus, dass Fehlfunktionen des miRNA-Systems mit schweren Erkrankungen wie zum Beispiel verschiedenen Arten von Krebs und kardiovaskulären Krankheiten assoziiert sind<sup>(19,22,23)</sup>. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Entwicklung von RNAi-basierten Therapeutika.

Heute gibt es verschiedene miRNA-basierte Medikamente, die sich in klinischen Studien befinden. Beispielsweise befindet sich Miravirsin, ein miRNA-basierter Wirkstoff gegen das Hepatitis C Virus, bereits in Phase II klinischer Studien. Andere Medikamente zeigten sich in prä-klinischen Studien erfolgreich<sup>(24)</sup>. Aber auch siRNA-basierte Wirkstoffe werden getestet. Eines der ersten siRNA-basierten Medikamente ist Bevasiranib, welches vielversprechende Ergebnisse in der Therapie von Altersbedingter Makuladegeneration zeigt. Jedoch bestehen Zweifel, ob die positiven Effekte allein auf RNAi zurückzuführen sind, da die Applikation in Form von nackter siRNA erfolgt. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Teil des Effektes über die Aktivierung des *toll-like* Rezeptors 3 (TLR3) zu begründen ist<sup>(25)</sup>. Dieser teilweise auf Nebenwirkungen beruhende Erfolg von Bevasiranib, sowie die zielgenaue Applikation von therapeutischen siRNAs stellen die Forschung noch vor Herausforderungen<sup>(26)</sup>. Trotzdem befindet sich eine große Zahl therapeutischer siRNAs gegen verschiedene Krankheiten in klinischen Studien, nachdem im Tiermodell gute Erfolge erzielt werden konnten. Somit stellen trotz noch zu überwindender Hürden RNAi-basierte Medikamente eine vielversprechende Wirkstoffklasse für die Zukunft dar<sup>(25,27)</sup>.



### 2.1.2. Die siRNA-vermittelte RNAi

Bald nach der wegweisenden Publikation von C. Mello und A. Fire<sup>(9)</sup> wurden auch die siRNAs entdeckt. Die zuerst gefundenen siRNAs waren jedoch exogenen Ursprungs und gelangten durch virale Infektion, das Einbringen von Transgenen oder Transfektion in die Zelle<sup>(28)</sup>. Sie wurden in Pflanzen, Fliegen und Würmern nachgewiesen<sup>(29–31)</sup>. Die siRNAs exogenen Ursprungs dienen dabei sowohl in Pflanzen, Insekten, Würmern und Pilzen, als auch in Säugern unter anderem der antiviralen Abwehr<sup>(2,32,33)</sup> und dem Aufrechterhalten der genomischen Integrität, indem sie eine Reaktion auf fremde Nukleinsäuren wie zum Beispiel Transgene und Transposons bewirken<sup>(2)</sup>. Viel seltener zu finden sind die endogenen siRNAs. Anfangs wurden sie in Pflanzen und Würmern entdeckt<sup>(34,35)</sup>. Erst 2006 wurden endogene siRNAs auch in kultivierten humanen Zellen gefunden, womit der Nachweis erbracht war, dass Säuger endogene siRNAs besitzen können<sup>(36)</sup>. Etwas später konnten dann in Maus Oozyten endogene siRNAs gezeigt werden, die sich klar von miRNA Populationen unterschieden<sup>(37,38)</sup>. Die hauptsächliche Herausforderung bei der weiteren Untersuchung der endogenen siRNAs besteht jetzt darin herauszufinden, was genau die biologische Funktion der endogenen siRNAs ist und ob sie tatsächlich eine Rolle in der Regulation der mRNA Expression in der Zelle spielen.



**Abbildung 2.1: Mechanismus der siRNA-vermittelten RNAi.**

Lange dsRNAs werden zunächst durch Dicer gespalten, so dass 21- 25 nt kurze vollständig komplementäre dsRNAs mit zwei Nukleotiden 3'-Überhang entstehen. Mit Hilfe des *RNA-induced silencing complex* (RISC)-loading complex (RLC) wird die siRNA auf Ago2 geladen. Der RLC besteht aus Dicer, Ago2 und einem dsRNA-bindenden Protein (TRBP oder PACT). Ago2 spaltet den *passenger* Strang, der daraufhin aus dem Komplex entlassen wird. Zurück bleibt die einzelsträngige *guide* RNA gebunden an Ago2, genannt minimaler RISC. Dieser kann nun mit *target* mRNAs, die zur *guide* RNA komplementäre Bindungsstellen enthalten, assoziieren und deren Spaltung katalysieren. Die Spaltprodukte der *target* mRNA werden aus dem RISC entfernt, so dass eine neue *target* mRNA gebunden und gespalten werden kann. Abbildung modifiziert nach Jinek und Doudna<sup>(39)</sup>.

Der Mechanismus der siRNA-vermittelten RNAi ist im Gegensatz zur biologischen Funktion der siRNAs in seinen Grundzügen relativ gut verstanden. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2.1 zu finden. Zunächst werden lange Vorläufer dsRNAs in kurze dsRNA Fragmente, die siRNAs, gespalten. Diese Spaltung wird katalysiert durch das RNase III-ähnliche Enzym Dicer<sup>(40)</sup>. Die entstehenden siRNAs weisen Charakteristika auf, die für die Dicer-Spaltung spe-

## 2. Einleitung

zifisch sind. Dazu gehört die Länge von 21 - 22 Nukleotiden, die durch den Abstand der PAZ Domäne Dicers zu dessen beiden RNase III-Domänen bestimmt wird<sup>(41-43)</sup>. Außerdem tragen siRNAs einen Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende und ein 5'-Phosphat<sup>(1,41,44,45)</sup>. Die siRNA besteht aus zwei Strängen, der *guide* und der *passenger* RNA, welche perfekt komplementär zueinander sind. Sie wird auf das Schlüsselenzym der RNAi geladen, welches im human System das Argonaute2 Protein (Ago2) ist<sup>(1)</sup>. Die Beladung wird innerhalb eines Multiproteinkomplexes, genannt *RNA-induced silencing complex (RISC)-loading complex (RLC)*, durchgeführt. Dieser Komplex besteht aus Dicer, einem dsRNA-bindenden Protein und Ago2<sup>(46-48)</sup>. Bei den dsRNA-bindenden Proteinen kann es sich entweder um das *trans-activation response (TAR) RNA binding Protein (TRBP)* oder *protein activator of protein kinase R (PACT)* handeln<sup>(49,50)</sup>. Durch die thermodynamische Stabilität der siRNA wird bestimmt, welcher Strang als *guide* RNA an Ago2 gebunden bleibt und welcher Strang als *passenger* RNA eliminiert wird<sup>(51,52)</sup>. Auch TRBP und PACT spielen eine Rolle bei der *guide* Strang-Selektion<sup>(53,54)</sup>. Der als *passenger* RNA definierte Strang wird durch Ago2 gespalten und aus dem Komplex entfernt<sup>(55-57)</sup>. Die Ago2-vermittelte Spaltung von RNAs findet dabei immer am spaltbaren Phosphat gegenüber von Nukleotid 10 und 11, gerechnet vom 5'-Ende der *guide* RNA, statt<sup>(45,58)</sup>. Der verbleibende Komplex besteht minimal aus Ago2 und einer einzelsträngigen *guide* RNA und wird RISC genannt<sup>(31)</sup>. Mit Hilfe der *guide* RNA kann der RISC über Watson-Crick Basenpaarung an *target* RNAs mit zur *guide* RNA komplementären Sequenzen binden. Eine gebundene *target* RNA, die mindestens von Position 2 - 15 Basenpaarung mit der *guide* RNA aufweist<sup>(59)</sup>, wird gespalten, aus dem RISC entlassen und anschließend degradiert. Beim RISC handelt es sich um ein *multiple turnover* Enzym, d.h. es kann nach Entlassen der Spaltprodukte eine weitere *target* RNA binden und diese spalten<sup>(58,60,61)</sup>. Dieser Zyklus, bestehend aus *target* RNA Bindung und Spaltung kann bis zu 50 mal durchlaufen werden<sup>(61)</sup>.

### 2.1.3. Die miRNA-vermittelte RNAi

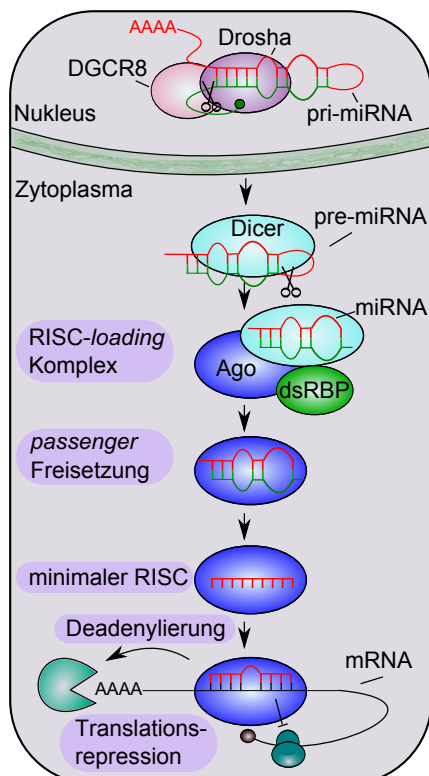
Schon lange vor der initialen Beschreibung der RNAi wurde die erste miRNA entdeckt<sup>(8)</sup>. Aber erst die Beschreibung der RNAi durch C. Mello und A. Fire 1998<sup>(9)</sup> und die nachfolgende Entdeckung einer Vielzahl von miRNAs in verschiedenen Organismen<sup>(10-13)</sup> führte dazu, dass die miRNAs als Vertreter der kleinen regulatorischen RNAs definiert wurden. Die Relevanz der miRNAs wurde durch die Erkenntnis, dass sie an der Regulation von etwa 20 - 30 % aller Gene beteiligt sind, deutlich<sup>(17,18)</sup>. Im Gegensatz zu den siRNAs ist der Ursprung der miRNAs überwiegend endogener Natur. Bis heute wurden etwa 15.000 für miRNAs kodierende Genloci in 142 Spezies identifiziert, was zur Expression von etwa 17.000 muren miRNAs führt<sup>(62)</sup>. Ein weiteres Kennzeichen, das die miRNAs von den siRNAs unterscheidet, ist die Art der Bindung an die *target* RNA. Während die siRNAs eine perfekte Komplementarität zu ihren *target* Bindungsstellen aufweisen, ist die miRNA nur partiell komplementär. Weiterhin befinden sich die Bindungsstellen für miRNAs vorwiegend im 3'-UTR von mRNAs und liegen dort in multipler Kopienzahl vor<sup>(28)</sup>.

Der Mechanismus der miRNA-vermittelten RNAi ist dem der siRNA-vermittelten RNAi prinzipiell recht ähnlich. Allerdings gibt es auch viele Unterschiede, die zum Einen der Tatsa-

che geschuldet sind, dass miRNAs endogen kodiert sind und zum Anderen die vielfältigen Möglichkeiten zur Regulation durch miRNAs im Vergleich zur siRNA zeigen. Eine schematische Darstellung des Mechanismus der miRNA-vermittelten RNAi ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Die Transkription der miRNAs erfolgt durch die RNA Polymerase II<sup>(63,64)</sup>. Das Transkript nennt sich *primary* (pri)-miRNA und besteht aus einem partiell komplementären doppelsträngigen Stamm, einer terminalen Schleife, sowie flankierenden Sequenzen<sup>(65)</sup>. Die pri-miRNA wird in zwei sequentiellen Schritten prozessiert<sup>(66)</sup>. Die erste Prozessierung erfolgt dabei im Nukleus. Dort spaltet das RNase III-ähnliche Enzym Drosha die pri-miRNA zu einer *precursor* (pre)-miRNA<sup>(67)</sup>. Diese Spaltung kann Drosha allerdings nicht alleine durchführen, da es keine dsRNA-bindenden Domänen (dsRBD) besitzt. Es erfolgt die Bildung des sogenannten Mikroprozessor-Komplexes aus Drosha und dem Protein *DiGeorge syndrome critical region gene* DGCR8, welches dsRBDs enthält und als molekularer Anker für Drosha dient<sup>(68-71)</sup>.

Ein miRNA Transkript muss aber nicht unbedingt nur miRNA *cluster*<sup>(11,12)</sup> enthalten, es kann ebensogut neben der miRNA auch für ein Protein kodieren. Somit gibt es neben der Prozessierung einer pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex einen zweiten Weg zur pre-miRNA zu gelangen. Dieser alternative Weg basiert darauf, dass die miRNAs in den Introns kodiert und durch *splicing* freigesetzt werden<sup>(72-74)</sup>.

Die pre-miRNAs werden dann durch eine zweite Prozessierung, die im Zytoplasma stattfindet, zu murenen miRNAs. Der Transport vom Nukleus ins Zytoplasma erfolgt mit Hilfe von Exportin-5-RanGTP, welches spezifisch pre-miRNAs, nicht aber pri-miRNAs, im Nukleus erkennt und ins Zytoplasma transportiert<sup>(75-77)</sup>. Der zweite Schritt der Prozessierung wird wie bei den siRNAs durch das RNase III-ähnliche Enzym Dicer durchgeführt, welches die terminale Schleife der pre-miRNA abspaltet<sup>(40,78)</sup>. Die entstehende reife miRNA ist ein partiell



**Abbildung 2.2: Mechanismus der miRNA-vermittelten RNAi.** Die pri-miRNAs werden im Zellkern durch den Drosha-DGCR8 Komplex prozessiert, um pre-miRNAs zu erhalten. Diese werden in das Zytoplasma transportiert, wo sie durch Dicer zu kurzen murenen miRNAs gespalten werden. Die murenen miRNAs werden mit Hilfe des RLC auf Ago geladen. Der *passenger* Strang wird entlassen und zurück bleibt die *guide* RNA gebunden an Ago, genannt minimaler RISC. Der minimale RISC bindet mit Hilfe der *guide* RNA an 3'-untranslatierte Regionen von mRNAs, zu denen die *guide* RNA typischerweise nur partielle Komplementarität aufweist. Die fehlende Komplementarität, sowie die Tatsache, dass den an miRNA bindenden Agos die für die Spaltaktivität notwendigen Aminosäuren fehlen, führt dazu, dass die gebundenen mRNAs nicht gespalten werden. Stattdessen kommt es zu einer Repression der Translation und zu einer Deadenylierung der mRNA, die deren Degradation nach sich zieht. Abbildung modifiziert nach Jinek und Doudna<sup>(39)</sup>.

## 2. Einleitung

komplementärer Duplex, der an beiden Enden die Charakteristika einer RNase III-Spaltung (3'-Überhang und 5'-Phosphat) aufweist<sup>(42,43)</sup>. Ihre Länge beträgt wie auch bei den siRNAs 21- 22 Nukleotide<sup>(41)</sup>. Wie die siRNA wird auch die miRNA mit Hilfe des RLC auf ein Ago Protein geladen<sup>(48)</sup>. Mit Hilfe von PACT und TRBP wird das thermodynamisch instabilere Ende identifiziert und somit ein Strang der miRNA als *guide* RNA ausgewählt, der an Ago gebunden bleibt und zusammen mit Ago den RISC konstituiert<sup>(51-54)</sup>. Der *passenger* Strang wird anders als bei den siRNAs nicht gespalten, sondern im Ganzen entwunden und aus dem RISC entfernt<sup>(55)</sup>. Der RISC kann nun *target* mRNAs binden. Anders als im Falle der siRNA sind die Bindungsstellen der *target* mRNA nicht perfekt komplementär zur *guide* RNA, sondern weisen Fehlpaarungen und *bulges* auf. Eine perfekte Komplementarität zur *guide* RNA ist nur im Bereich der sogenannten *seed* Region, die die Nukleotide 2 - 8 der *guide* RNA umfasst, notwendig<sup>(79,80)</sup>. Auf Grund der geringen Länge der *seed* Region kann eine miRNA eine Vielzahl verschiedener *target* mRNAs binden und regulieren<sup>(17)</sup>.

Für die Regulation durch miRNAs sind verschiedene Mechanismen beschrieben. Liegt eine komplette Komplementarität zur Bindungsstelle auf der *target* RNA vor, so kann auch eine miRNA-abhängige Spaltung der mRNA stattfinden<sup>(81-84)</sup>. Dies ist die in Pflanzen überwiegend vorkommende Art der Genregulation durch miRNAs<sup>(85-87)</sup>. In anderen Organismen sind allerdings ein sterischer Block der Translationsmaschinerie oder eine Deadenylierung der miRNA, die letztlich zur Degradation der mRNA führt, die vorherrschenden Mechanismen<sup>(65)</sup>.

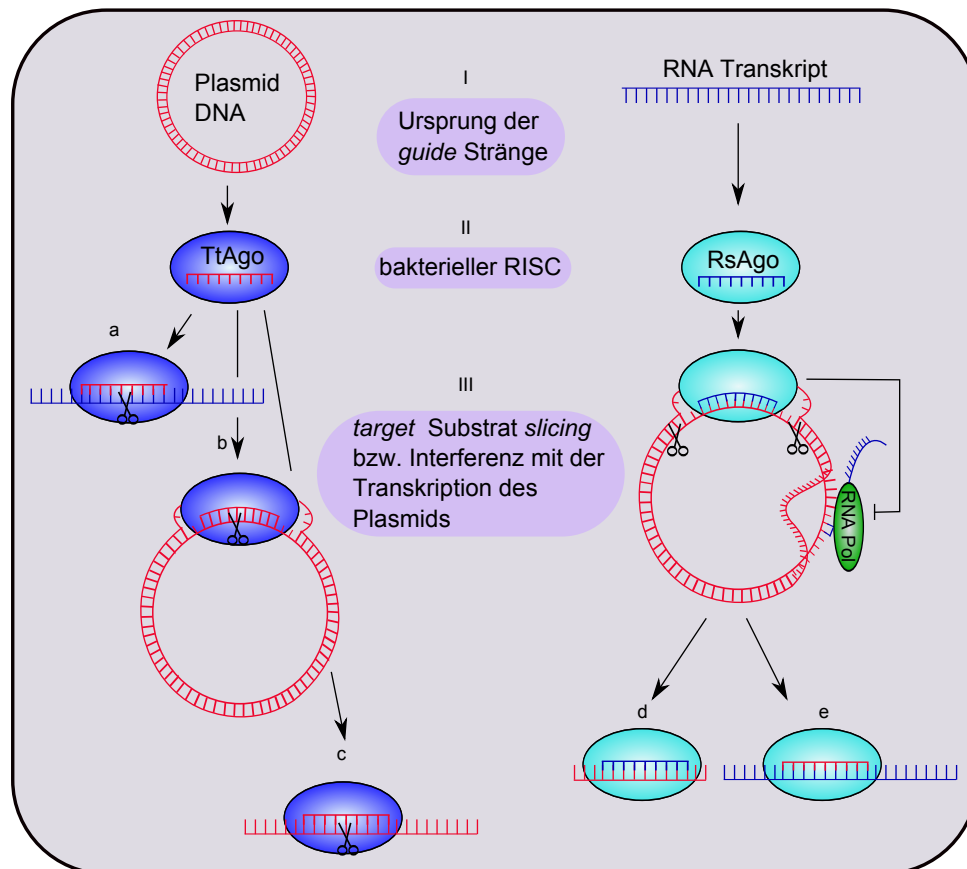
### 2.1.4. Die durch bakterielle Ago Proteine vermittelte Nukleinsäure-Interferenz

Die Mechanismen der Nukleinsäure-Interferenz durch bakterielle Ago Proteine sind wesentlich weniger erforscht als die der eukaryotischen bzw. humanen Ago Proteine. Vor allem über die Prozessierung der kurzen regulatorischen RNAs bzw. DNAs ist noch wenig bekannt. Erste mechanistische Einsichten existieren für das *T. thermophilus* Ago (TtAgo) Protein und das *R. sphaeroides* Ago (RsAgo) Protein.

Das TtAgo Protein bindet an 13 - 25 nt lange *guide* DNAs. Diese sind abgeleitet von Plasmid Sequenzen und tragen am 5'-Ende bevorzugt ein Cytosin und an der zweiten Position vom 5'-Terminus aus gerechnet ein Adenin. Allerdings zeigt TtAgo auch mit allen drei anderen möglichen 5'-Nukleotiden Spaltung von *target* Strängen. Möglicherweise resultiert die Neigung für ein 5'-Cytosin aus einem spezifischen Prozessierungsmechanismus<sup>(88)</sup>. Mit Hilfe dieser *guide* DNAs kann TtAgo einzelsträngige RNA<sup>(89)</sup> und DNA *target* Stränge, sowie negativ spiralisierte relaxierte Plasmide spalten. Bei den einzelsträngigen *target* DNAs handelt es sich um über das Kompetenzsystem aufgenommene Nukleinsäuren und Replikationsintermediate<sup>(88)</sup>. Das Ago Protein aus dem Bakterium *R. sphaeroides* (RsAgo) hat im Gegensatz zu TtAgo keine katalytische Aktivität. Es reguliert Nukleinsäuren allein auf Basis der Bindung. Als *guide* Stränge werden 15 -19 nt lange RNAs genutzt, die aus RNA Transkripten stammen und am 5'-Ende ein Uracil präferieren. An der zweiten Position findet sich wie bei TtAgo häufig ein Adenin. Die an RsAgo gebundenen RNAs sind komplementär zu einem Großteil der zellulären Transkripte. Dementsprechend ist keine bestimmte Struktur erkennbar, die Rückschlüsse auf eine Prä-Prozessierung zulassen würden. Mit Hilfe dieser *guide* RNAs kann RsAgo an Plasmid DNA

binden. Dadurch wird zum Einen die Transkription inhibiert. Zum Anderen kommt es zur Spaltung der Plasmid DNA durch ein anderes Protein, sodass zur *guide* RNA komplementäre 22 - 24 nt lange DNA Fragmente entstehen. Diese bleiben an den RsAgo-*guide* RNA Komplex gebunden oder binden als *guide* Strang an ein weiteres RsAgo, um posttranskriptionell regulierend einzugreifen<sup>(3)</sup>.

Für archaeele Ago Proteine gibt es zwar einige Informationen, welche Nukleinsäuren präferentiell als *guide* Strang gebunden werden und welche *target* Nukleinsäuren gebunden bzw. gespalten werden können, über die genaue Funktionsweise der Ago Proteine und die Herkunft der *guide* DNA gibt es bisher jedoch nur wenige Informationen.

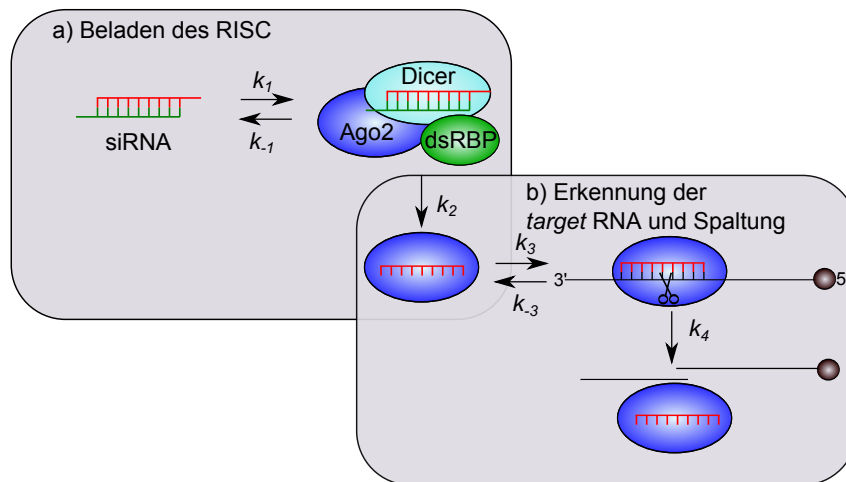


**Abbildung 2.3.: Putative Abläufe der durch bakterielle Ago Proteine vermittelten silencing Mechanismen.** I) Die *guide* Sequenzen von TtAgo bzw. RsAgo stammen von Plasmid DNA<sup>(88)</sup> bzw. von RNA Transkripten<sup>(3)</sup>. II) Der bakterielle RISC besteht aus TtAgo und einer 13-25 nt *guide* DNA<sup>(88)</sup> bzw. RsAgo und einer 15 – 19 nt *guide* RNA<sup>(3)</sup>. III) Als *target* Substrate dienen TtAgo a) einzelsträngige RNA<sup>(90)</sup>, b) negativ spiralisierte Plasmid DNA<sup>(88)</sup> und c) einzelsträngige DNA<sup>(88,90)</sup>. RsAgo RISC bindet an Plasmid DNA, die nachfolgend zu 22 – 24 nt Fragmenten gespalten wird. Bindung an Plasmid DNA führt möglicherweise zur Interferenz mit der Transkription des Plasmids. Die kurzen DNA Fragmente bleiben entweder an den RISC gebunden (d), oder können mit neuen RsAgo Molekülen einen DNA-RsAgo RISC bilden und die Transkription des Plasmids regulieren (e)<sup>(3)</sup>. Abbildungsteil RsAgo modifiziert nach Olovnikov et al.<sup>(3)</sup>.

## 2.2. Die Kinetik der siRNA-vermittelten RNAi

Ogleich der Mechanismus der siRNA-vermittelten RNAi intensiv untersucht wurde und wird, ist die biochemische Analyse noch nicht sehr weit fortgeschritten. Die Kinetik der siRNA-Bindung durch hAgo2 sowie die Erkennung, Bindung und Spaltung von *target* RNAs durch binäre hAgo2-*guide* RNA-Komplexe ist bislang noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt.

Ein erster Versuch, die siRNA-vermittelte RNAi kinetisch zu charakterisieren, wurde von Rana unternommen. Für eine grundsätzliche Beschreibung gliederte er den Prozess in zwei Schritte, obwohl auch zu diesem Zeitpunkt schon klar war, dass die von ihm beschriebenen Schritte in weitere Schritte differenziert werden können. Die von ihm zur Vereinfachung gewählten Schritte sind erstens das Laden von siRNAs in den RISC und zweitens die *target* RNA Erkennung, Bindung und Spaltung sowie Freisetzung der Spaltprodukte<sup>(91)</sup>. Eine schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 2.4 zu finden.



**Abbildung 2.4.: Kinetische Kontrollpunkte der siRNA-abhängigen RNAi.** In einem vereinfachten Modell wird die siRNA-abhängige RNAi in zwei kinetisch kontrollierte Prozesse unterteilt. Dabei handelt es sich um die Beladung des RISC (a) und die darauffolgende Erkennung und Spaltung von *target* RNAs (b). Bei der Beladung des RISC wird die siRNA auf Ago2 geladen. Darauf folgt die Ago2-vermittelte Spaltung der *passenger* RNA und die Freisetzung der Spaltprodukte, um einen funktionellen RISC zu erhalten, der *target* RNAs erkennen und binden kann. Die bestimmende Geschwindigkeitsratenkonstante stellt hierbei  $k_2$  dar. Nach anschließender Erkennung und Bindung einer *target* RNA, kommt es zur Spaltung. Damit eine weitere *target* RNA durch den RISC gebunden werden kann, müssen die Spaltprodukte der mRNA aus dem Komplex entfernt werden. Die Freisetzung der Spaltprodukte, beschrieben durch die Geschwindigkeitsratenkonstante  $k_4$ , stellt hierbei den zweiten kinetischen Kontrollpunkt dar. Abbildung modifiziert nach Rana<sup>(91)</sup>.

Die katalytische Effizienz der Beladung des RISC wird definiert durch die Ratenkonstante  $k_2$ , die hier den Geschwindigkeits-limitierenden Schritt darstellt<sup>(91)</sup>. Dieser Schritt kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die Effizienz der Bildung binärer Komplexe aus Ago2 und siRNA wird vor allem durch die Beschaffenheit der siRNA beeinflusst. Erste kinetische Untersuchungen zur Bildung von binären Komplexen wurden im Jahr 2007 mit Hilfe des *Aquifex aeolicus* (*A. aeolicus*) Ago, welches an DNA bindet, durchgeführt. Die Bildung des binären Komplexes wurde im Rahmen dieser Untersuchungen als biphasischer Prozess interpretiert, wobei kaum Unterschiede zwischen *guide* DNAs verschiedener Längen festgestellt wurden.

Daraus wurde geschlossen, dass ein Großteil der Bindungsenergie für die Interaktion der *seed* Region mit dem Protein aufgewendet wird und das 3'-Ende lediglich locker mit der PAZ Domäne assoziiert ist<sup>(92)</sup>. Das 5'-Ende des *guide* Stranges spielt insofern eine besondere Rolle für die Bildung eines funktionellen RISC. In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um S. Crooke wurde in Insektenzellen exprimiertes und über einen GST *tag* gereinigtes humanes Ago2 (hAgo2) verwendet, um die Bindung an verschiedene Substrate zu untersuchen. Hier wurde unter anderem die Bedeutung des 5'-Phosphats für die Inkorporation der *guide* RNA in den RISC untersucht. Eine 19-mer *guide* RNA mit 5'-Phosphat wird mit einer Affinität von 83 nM durch hAgo2 gebunden, während das Fehlen der 5'-Phosphatgruppe die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  um Faktor 5 erhöht. Dies spiegelt sich auch in den Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten wider. Bei fehlender 5'-Phosphatgruppe erhöht sich die Assoziationsratenkonstante von  $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  auf  $3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , während sich die Dissoziationsratenkonstante im Falle des fehlenden Phosphats um Faktor 15 von  $0,0068 \text{ s}^{-1}$  auf  $0,099 \text{ s}^{-1}$  beschleunigt<sup>(93)</sup>. Dies unterstreicht die Bedeutung des 5'-Endes des *guide* Stranges für die katalytische Effizienz des RISC.

Ein weiterer Punkt, der die Effizienz der RISC Beladung beeinflusst, ist die Auswahl der *guide* RNA durch den RISC. Die Selektion der *guide* RNA erfolgt unter anderem über die thermodynamische Stabilität der siRNA. Durch die Auswahl einer optimierten siRNA mit einem klar definierten thermodynamisch instabileren 5'-Ende kann die Effizienz der Beladung und somit  $k_2$  beschleunigt werden<sup>(51,52,94–98)</sup>.

Allerdings sind nicht alle RISC, die mit einer *guide* RNA beladen sind, gleich effizient. Somit muss als zweiter kinetischer Kontrollpunkt die Erkennung, Bindung und Spaltung von *target* RNA betrachtet werden. Die katalytische Effizienz dieses Schrittes wird durch die Geschwindigkeitsratenkonstante  $k_4$  definiert<sup>(91)</sup>. Verschiedene Prozesse können diese Geschwindigkeitsratenkonstante beeinflussen.

Die Zugänglichkeit der Bindungsstelle in der *target* RNA hat eine große Bedeutung für die Effizienz der RISC Beladung. Ist die Bindungsstelle der siRNA schwer zugänglich, ist auch die katalytische Effizienz herabgesetzt<sup>(99–101)</sup>. Dies ist außerdem ein Hinweis darauf, dass der RISC seine *target* RNA über einen Diffusions-kontrollierten Mechanismus findet und nicht durch eine systematische Überprüfung der *target* RNA. Zusätzlich dazu untersuchten Brown et al.<sup>(100)</sup>, wie sich ein sterischer Block auf der *target* RNA in Form eines 2'-O-Methyl Oligonukleotides an der 3'- und der 5'-Position neben der Bindungsstelle der *guide* RNA auswirkt. Diese Modifikation führte zu einer Erhöhung der katalytischen Effizienz des RISC durch Freilegung der Bindungsstelle für die *guide* RNA, was ebenfalls dafür spricht, dass die *target* RNA durch einen Diffusions-kontrollierten Prozess erkannt wird, nicht aber durch einen *scanning* Mechanismus, der durch den sterischen Block behindert worden wäre<sup>(91,100)</sup>. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Bindungsstellen-Zugänglichkeit für die Effizienz des RISC.

Ist eine *target* RNA erkannt, müssen verschiedene konformationelle Änderungen durchlaufen werden, die den RISC-*target*-Komplex in einen spaltungskompetenten Zustand überführen. Auch diese beeinflussen die katalytische Effizienz des RISC<sup>(91)</sup>.

## 2. Einleitung

**Tabelle 2.1.: Michaelis-Menten Parameter verschiedener RISC Enzyme.** Auflistung der Michaelis-Menten Parameter verschiedener RISC Enzyme, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen bestimmt wurden. *D. melanogaster* = *Drosophila melanogaster*; CDK9 = *Cyclin-dependent kinase 9*; GFP = Grün-fluoreszierendes Protein; n.a. = nicht angegeben; n.b. = nicht bestimmt. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um humane Proteine. Tabelle modifiziert nach Rana<sup>(91)</sup>.

RISC	$K_m$ (nM)	$V_{max}$ (nM s <sup>-1</sup> )	[RISC] (nM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Ref.
holo-RISC-CDK9	15,42	3,47x 10 <sup>-3</sup>	2,5	1,39x 10 <sup>-3</sup>	9,0x 10 <sup>-5</sup>	(100)
holo-RISC-GFP	14,32	3,52x 10 <sup>-3</sup>	3,0	1,17x 10 <sup>-3</sup>	8,2x 10 <sup>-5</sup>	(100)
minimaler RISC	2,3	7,1x 10 <sup>-3</sup>	0,4	1,79x 10 <sup>-2</sup>	7,8x 10 <sup>-3</sup>	(102)
rekombinanter RISC	1,4	1,3x 10 <sup>-3</sup>	0,15	8,7x 10 <sup>-3</sup>	6,2x 10 <sup>-3</sup>	(58)
<i>D. melanogaster</i> let7	8,4	7,1x 10 <sup>-3</sup>	1,0	7,1x 10 <sup>-3</sup>	8,4x 10 <sup>-4</sup>	(61)
RNase H	38	n.b.	n.a.	5,0x 10 <sup>-2</sup>	1,3x 10 <sup>-3</sup>	(103)

Eine Beeinflussung der Ratenkonstante  $k_4$  durch die Geschwindigkeit der Spaltung ist relativ unwahrscheinlich, da vermutet wird, dass die Spaltung im Vergleich zu Bindung und Freisetzung der *target* RNA relativ schnell ist. Die PIWI Domäne hat eine ähnliche Faltung wie die RNase H<sup>(104,105)</sup> und somit wird angenommen, dass die Geschwindigkeitsratenkonstante der Spaltung in einer vergleichbaren Größenordnung liegt. So wurde für die Spaltung von RNA durch die RNase H Domäne der retroviralen HIV-1 Reversen Transkriptase eine Geschwindigkeitsratenkonstante von 10 s<sup>-1</sup> bestimmt<sup>(106)</sup>.

Neben der *target* RNA Erkennung wurde schon sehr früh vermutet, dass ein limitierender Faktor für die Spaltung unter *multiple turnover* Bedingungen die Freisetzung der Spaltprodukte aus dem RISC sein könnte<sup>(61,102,107)</sup>. Genau wie für die Bindung der *target* RNA an den RISC, sind auch für die Freisetzung der Spaltprodukte konformationelle Änderungen notwendig, die sich negativ auf die katalytische Effizienz des RISC auswirken<sup>(102)</sup>. Spaltungsexperimente mit Affinitäts-gereinigtem RISC zeigten, dass die Spaltung unter *multiple turnover* Bedingungen in zwei Phasen abläuft. Zu Beginn der Reaktion wurde eine schnellere Phase (*burst* Phase) beobachtet, der sich eine zweite Phase mit einer langsameren Geschwindigkeit anschloss. Es wurde postuliert, dass diese *burst* Phase die Reaktion des präassemblierten RISC mit *target* RNA reflektiert, während die langsamere Phase die Spaltung weiterer *target* RNAs im Gleichgewicht repräsentiert, die höchstwahrscheinlich durch die Freisetzung der Spaltprodukte limitiert wird<sup>(107)</sup>.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten Parameter ist die katalytische Effizienz von verschiedenen RISC Enzymen mit verschiedenen Parametern direkt vergleichbar (siehe Tabelle 2.1). Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Daten jeweils unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen gewonnen wurden.

Haley et al.<sup>(61)</sup> nutzten *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) Embryolysat. Den RISC programmierten sie *in vivo* mit einer let7 siRNA und mischten dann die gewünschte RISC Konzentration mit *target* RNA, so dass sie den sogenannten Holo-RISC untersuchten. Entsprechend führten Brown et al.<sup>(100)</sup> ein Jahr später ihre Experimente durch. Diese Gruppe



nutzte zytoplasmatische HeLa-Extrakte, um ihre kinetischen Studien durchzuführen. Auch eine andere Arbeitsgruppe nutzte zytoplasmatischen HeLa-Extrakt, um den humanen RISC mit einer doppelsträngigen siRNA zu assemblieren. Allerdings trug die siRNA in dieser Arbeit eine Biotin-Gruppe am 3'-Ende, sodass eine Biotin-Streptavidin Affinitätschromatographie durchgeführt werden konnte, um den RISC von den anderen Proteinen des Extrakts zu trennen<sup>(102)</sup>. Ganz ohne Extrakt, sondern unter Ausnutzung von rekombinant in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimierten und über einen GST *tag* gereinigten Ago2, führten Rivas et al.<sup>(58)</sup> ihre Studien zur Kinetik des minimalen RISC durch. So unterscheidet sich in allen vier verschiedenen Studien die Proteinzusammensetzung des RISC. In den Extrakten sind viele andere Proteine enthalten, die zur Proteinkomposition des RISC beitragen<sup>(61,100)</sup>. Auch der aus Extrakt über Affinitätschromatographie aufgereinigte RISC enthält neben Ago2 vermutlich einige andere Proteine<sup>(102)</sup>, da Ago2 mit vielen Proteinen interagieren kann<sup>(108)</sup>. So interagiert Ago2 zum Beispiel unter anderem mit TRBP<sup>(93)</sup>, welches eine wichtige Komponente des RLC ist (siehe Abschnitt 2.1.2). Dagegen sollte im rekombinanten RISC nur das humane Ago2 zu finden sein. Die vorgestellten RISC unterscheiden sich allerdings nicht nur in der Proteinkomposition. Es wurden auch unterschiedliche *target* RNAs verwendet, um die kinetischen Parameter zu untersuchen. So wurden in den Studien von Brown und Haley mRNAs verwendet, während für den rekombinanten und den minimalen RISC kurze *target* RNAs mit 50 nt bzw. 21 nt Länge eingesetzt wurden<sup>(58,61,100,102)</sup>.

Die verschiedenen experimentellen Bedingungen könnten auch der Grund für die großen Unterschiede zwischen dem  $K_m$ - und dementsprechend dem  $k_{cat}/K_m$ -Wert des humanen Holo-RISC und des minimalen humanen RISC sein (siehe Tabelle 2.1). Die katalytische Effizienz des humanen Holo-RISC, beschrieben durch den  $k_{cat}/K_m$ -Wert, ist wesentlich geringer als die des humanen rekombinanten und minimalen RISC. Rana stellte die Hypothese auf, dass dies an einer eingeschränkten Flexibilität des Ago2 Proteins in Anwesenheit weiterer Proteine liegen könnte, welche konformationelle Änderungen bei Bindung und Freisetzung von *target* RNAs erschwert<sup>(91)</sup>. Der  $K_m$ -Wert, der den größten Anteil an der verringerten katalytischen Effizienz des Holo-RISC hat, könnte aber auch einen Hinweis auf den Mechanismus der *target* RNA Erkennung geben. Anders als im rekombinanten und minimalen RISC stehen dem Holo-RISC weitere mRNAs, die im zytoplasmatischen Extrakt vorhanden sind, zur Verfügung. Vermutlich bindet der Holo-RISC, bevor das vollständig komplementäre *in vitro* hinzugefügte *target* erkannt wird, auch an nur partiell komplementäre *target* RNAs und muss dann erst wieder dissoziieren, bevor eine andere *target* RNA gebunden werden kann<sup>(91)</sup>.

## 2.3. Die Argonaute Proteine

Die erste Erwähnung der Ago Proteine erfolgte in einer Studie, welche sich mit verschiedenen Mutanten der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) befasste. Die Pflanzen mit Mutationen im Ago1-Gen zeigten eine seltsame Morphologie der Blätter, die an die Tentakel von Tintenfischen erinnerte. So wurde das Gen und das daraus entstehende Protein nach dem Tintenfisch *Argonauta Argo* benannt<sup>(109)</sup>. Erst später wurde das Argonaute Protein als katalytische Komponente der RNAi identifiziert<sup>(110)</sup>. Seitdem wurden die evolutionäre Entwicklung und die

## 2. Einleitung

Funktionen der etwa 100 kDa großen Ago Proteine in verschiedenen Organismen gründlich untersucht.

Ago Proteine sind in allen drei Domänen des Lebens vertreten (siehe Abbildung 2.5). Allerdings weist die Gruppe der Eukaryoten im Vergleich zur Gruppe der Bakterien und Archaea den größten Anteil an Ago Proteinen auf. In ~65% aller sequenzierten Eukaryoten Genome kann ein Argonaute Protein identifiziert werden, während es in Bakterien und in Archaea nur ~9% bzw. ~32% sind<sup>(111)</sup>. In Eukaryoten können die Ago Proteine basierend auf ihrer Sequenz in drei paraloge Hauptgruppen aufgeteilt werden: WAGO (nur in Würmern), AGO und PIWI. Durch Genduplikation kam es im Laufe der Evolution zu einer Diversifizierung, die es dem Ago Protein ermöglicht, viele verschiedene Funktionen auszufüllen. Das beste Beispiel für die Diversifizierung der Ago Proteine ist in *C. elegans* zu finden. Das Genom dieser Nematode kodiert für 27 verschiedene Ago Proteine der WAGO Klasse<sup>(1,112,113)</sup>. Die WAGO Proteine können im Gegensatz zu anderen Ago Proteinen nicht nur in verschiedenen Wegen der RNAi wirken, sondern auch sequentiell im selben Pfad agieren<sup>(112)</sup>.

Die Ago Proteine sind nah verwandt mit *A. thaliana* Ago1, während die PIWI Gruppe nahe Verwandtschaft mit dem *D. melanogaster* PIWI Protein aufweist<sup>(1)</sup>. Die phylogenetische Analyse Ago-ähnlicher und PIWI-ähnlicher Proteine zeigt, dass der letzte gemeinsame Vorfahr beide Proteine exprimiert haben muss und es dann im Laufe der Evolution teilweise zum Verlust eines der Paraloge gekommen ist<sup>(1)</sup>.

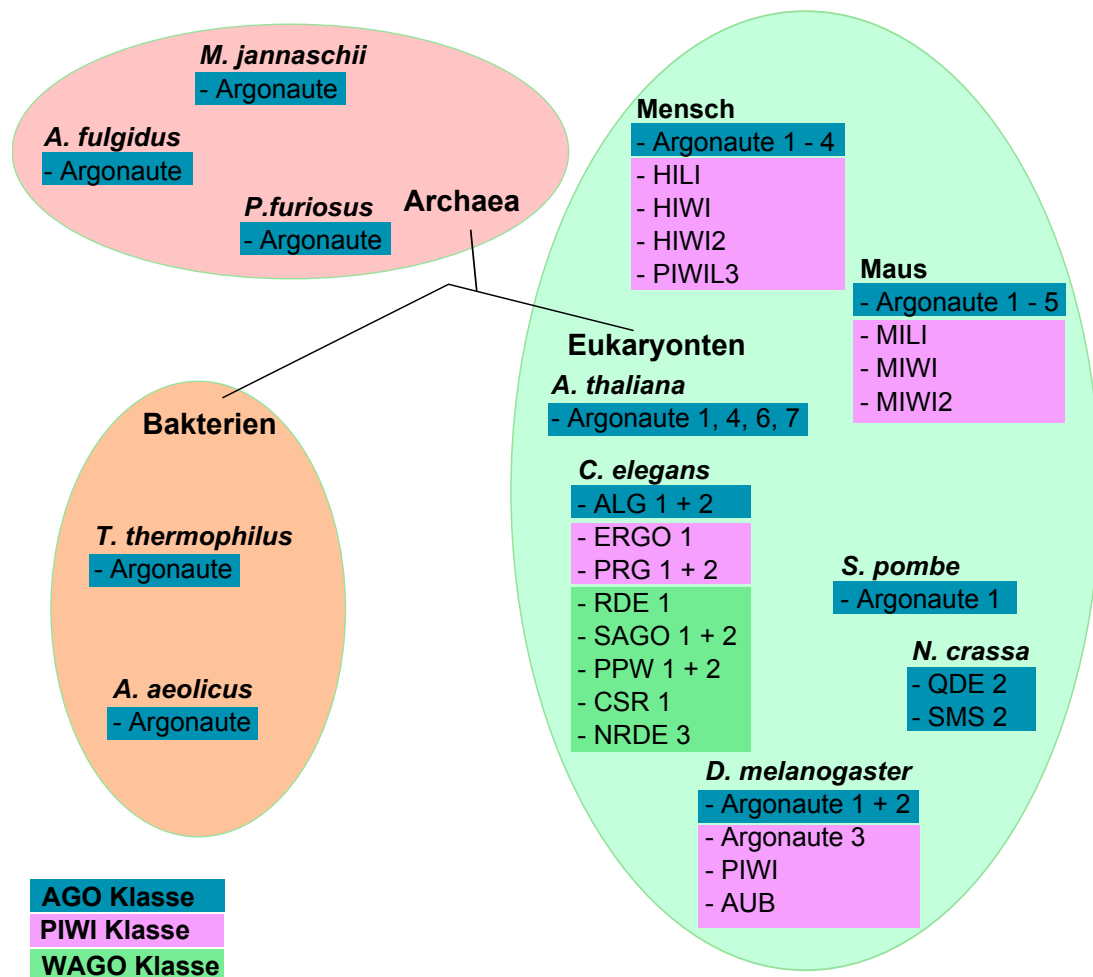
Ein großer Unterschied zwischen den AGO und PIWI Proteinen ist die Gewebeverteilung. Während die AGO Gruppe ubiquitär exprimiert wird, kommt die PIWI Gruppe nur in Keimzellen vor<sup>(114)</sup>. In den Keimzellen sind die PIWI Proteine vor allem für Keimzellentwicklung, Stammzellerneuerung und *silencing* von Retrotransposons verantwortlich<sup>(115,116)</sup>. Der Mensch besitzt vier dieser PIWI Proteine: HIWI, HIWI2, HIWI3, HILI<sup>(113,117)</sup>. Die sogenannten *PIWI interacting* (pi) RNAs, die mit den PIWI Proteinen interagieren, unterscheiden sich in ihrem Ursprung und ihrer Prozessierung von den miRNAs und siRNAs, die mit Proteinen der AGO Klasse wechselwirken<sup>(118–120)</sup>.

Die ubiquitär exprimierten AGO Proteine erfüllen verschiedene Funktionen (siehe Tabelle 2.2). Im Menschen existieren vier verschiedene Varianten des Ago Proteins: Ago1 - 4<sup>(113,117,124)</sup>. Das einzige dieser Proteine, welches zur Spaltung von *target* RNAs befähigt ist und somit die siRNA-vermittelte RNAi katalysieren kann, ist das Ago2 Protein<sup>(104,125)</sup>. Es gibt aber auch Beispiele, die zeigen, dass Ago2 Funktionen ausüben kann, die unabhängig von der endonukleolytischen *slicer* Aktivität sind. So ist die Fähigkeit, RNAs zu spalten, für den Effekt von Ago2 in der Hämatopoese entbehrlich. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass Ago2 die Entwicklung von frühen lymphoiden und erythroiden Zellen reguliert, indem es als Schlüsselregulator der miRNA Homöostase fungiert. Depletion von Ago2 führt zu Defekten in der miRNA Biogenese<sup>(126)</sup>.

Wenig später wurde eine weitere Aufgabe des Ago2 Proteins in der miRNA Biogenese entdeckt, für die es allerdings seine *slicer* Aktivität benötigt. Ago2 ist Teil eines alternativen Weges der pre-miRNA Prozessierung, welcher unabhängig von Dicer ist. Stattdessen prozessiert Ago2 selbst die pre-miRNA, um so funktionelle mature miRNAs zu erhalten<sup>(127)</sup>.

Hauptsächlich sind die Proteine der AGO Klasse die Schlüsselenzyme der miRNA- und der siRNA-vermittelten RNAi, deren Hauptaufgaben die Regulation der Expression und Verteidigung gegen fremdes genetischen Material sind (siehe Abschnitt 2.1.2 und Abschnitt 2.1.3). Diese Funktion üben sie überwiegend im Zytoplasma aus. Sie können allerdings auch Aufgaben im Zellkern erfüllen<sup>(128)</sup>. Dazu gehört ebenfalls die siRNA- bzw. miRNA-vermittelte RNAi. Im Kern dient sie vor allem der Regulation von nicht-kodierenden und aberranten Transkripten, die aus Transposons und genomischen Tandem-Wiederholungen stammen. Aber auch normale Transkripte werden schon im Kern durch den RISC targetiert, um deren Expression räumlich und zeitlich zu kontrollieren. Außerdem sind die AGO Proteine im Nukleus in die Regulation von *small nuclear* (sn) RNAs involviert<sup>(129)</sup>.

Eine weitere Funktion der Ago Proteine im Kern ist das sogenannte transkriptionelle *silencing*. Dazu werden sie in den sogenannten *RNA-induced transcriptional silencing* (RITS) Kom-



**Abbildung 2.5.: Argonaute Proteine in den verschiedenen Domänen des Lebens.** In allen drei Domänen des Lebens konnten Argonaute Proteine nachgewiesen werden. Allein in den Eukaryonten wurden drei verschiedene Argonaute Klassen identifiziert. Dabei handelt es sich um die Klassen AGO, PIWI und WAGO. Argonaute Proteine der WAGO Klasse werden ausschließlich in Würmern gefunden, während die PIWI Klasse bisher nur in Tieren gezeigt wurde<sup>(120,121)</sup>. Prokaryontische Argonaute Proteine werden der AGO Klasse zugerechnet<sup>(122)</sup>. Eine Überlagerung der Strukturen von prokaryotischen und humanen Argonaute Strukturen zeigt, dass die Struktur und Organisation der Domänen der Argonaute Proteine hoch konserviert ist<sup>(123)</sup>.

## 2. Einleitung

plex inkorporiert. Dort binden sie in den Promotorregionen der zu regulierenden Gene und führen teilweise durch Induktion von Histonmethylierung zur Ausbildung von fakultativem Heterochromatin<sup>(130)</sup>. Dieser Mechanismus wurde in *Saccharomyces pombe* (*S. pombe*) bereits 2002 beschrieben<sup>(131)</sup>. Nicht in jedem Fall von transkriptionellem *silencing* allerdings sind Histonmodifikationen involviert. Sogenannte *antigene* (ag) RNAs können mit Hilfe von Ago Proteinen entweder direkt in der Promotorregion oder etwas weiter *upstream* binden und so die Transkription bestimmter Gene verhindern<sup>(132)</sup>.

Sind die Ago Proteine nicht im Zellkern lokalisiert, sondern üben ihre Funktion im Zytoplasma aus, sind sie häufig an sogenannten Prozessierungskörperchen lokalisiert, wo sie mit deren Komponenten interagieren<sup>(133)</sup>. Diese Wechselwirkungen sind essentiell für die Funktion der miRNA-vermittelten *target* RNA Regulation<sup>(134,135)</sup>.

Die durch Bindung an miRNA entstandenen RISC (miRISC) können aber auch an Stressgranula lokalisiert sein. Es wird vermutet, dass hierdurch ein zweiter funktioneller Zustand des miRISC repräsentiert wird<sup>(136)</sup>. Im Gegensatz zur Lokalisation von Ago an Prozessierungskörperchen ist die Bindung von Ago an eine miRNA für die Lokalisation an Stressgranula essentiell. Es wird vermutet, dass unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel unter Stress, eine Rekrutierung von Ago, welches an miRNA und *target* RNA gebunden ist, an Stressgranula stattfindet<sup>(136)</sup>.

**Tabelle 2.2.: Funktionen der humanen Argonaute Proteine in verschiedenen Kompartimenten der Zelle.** Im Menschen werden noch zwei weitere Ago-Varianten, nämlich Ago3 und Ago4, exprimiert, die hier keine Erwähnung finden. TGS = Transkriptionelles Gen *silencing*.

Protein	Funktion	Kompartiment	Referenz
Ago1	miRNA-vermittelte Genregulation	Zytoplasma	(125)
	Induktion von Heterochromatinbildung (TGS)	Zellkern	(130)
	TGS durch Bindung an Promotor über agRNA	Zellkern	(132)
	indirekte Rolle in siRNA-vermittelter RNAi - Schutz/ Transport von RNA	Zellkern	(132)
Ago2	siRNA- und miRNA-vermittelte RNAi	Zytoplasma	(104,125)
	Dicer-unabhängige pre-miRNA Prozessierung	Zytoplasma	(127)
	Regulation der miRNA-Homöostase	Zytoplasma	(126)
	Induktion von Heterochromatinbildung (TGS)	Zellkern	(130)
	TGS durch Bindung an Promotor über agRNA	Zellkern	(132)

Auch in Prokaryoten spielen die Ago Proteine eine wichtige Rolle. Obwohl sie nur in ~32% bzw. ~9% aller sequenzierten Archaea- bzw. Bakterien-Genomen gefunden werden, so sind sie doch in ~70% aller prokaryotischen Phyla vertreten<sup>(111)</sup>. In ihrer Evolution unterscheiden sich so offensichtlich die prokaryotischen von den eukaryotischen Ago Proteinen. Während die eukaryotischen Proteine durch Genduplikation diversifiziert und von Generation zu Generation weitervererbt oder verloren wurden, lässt die weit gestreute Verbreitung von Ago Proteinen in Prokaryoten eher einen horizontalen Gentransfer vermuten<sup>(111,137,138)</sup>.

**Tabelle 2.3.: Substratpräferenzen bakterieller Ago Proteine.** n.b. = nicht bestimmt; inaktiv = keine katalytische Tetrade vorhanden, Inhibition nur über Bindung an den *target* Strang; () = Affinität signifikant erniedrigt.

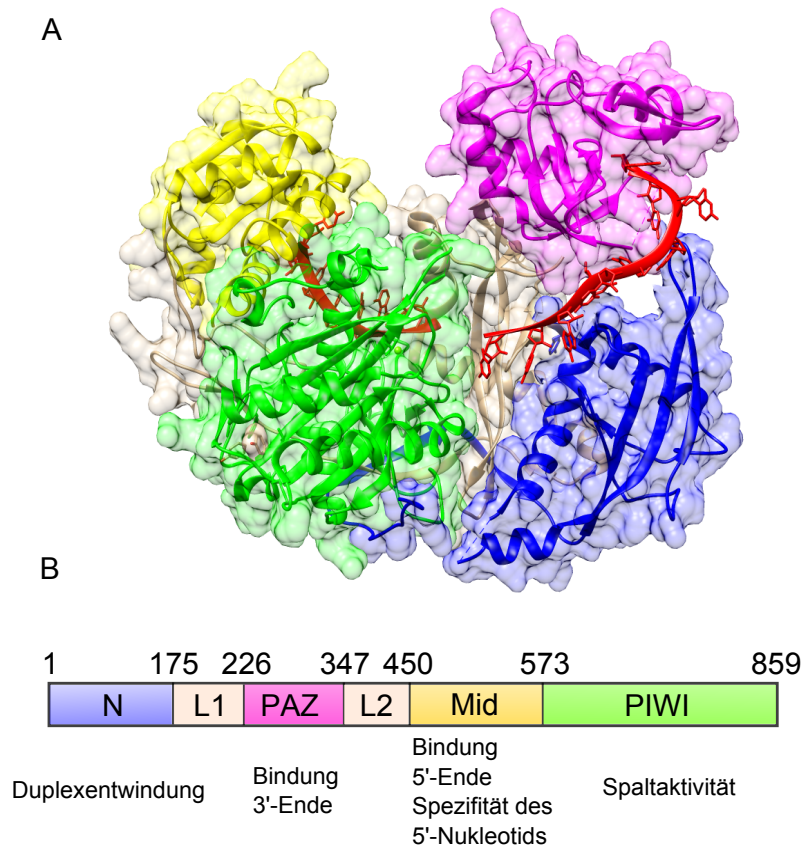
Protein	<i>guide</i> Substrat	Bindung an <i>target</i> Substrate	Spaltung von <i>target</i> Substraten	Referenz
<b>Archaea</b>				
<i>M. jannaschii</i> Ago	DNA	ssDNA, ssRNA	ssDNA	(139)
<i>A. fulgidus</i> Ago	DNA (RNA)	ssDNA, ssRNA	n.b.	(140)
<b>Bakterien</b>				
<i>A. aeolicus</i> Ago	DNA, (RNA)	ssRNA, ssDNA	n.b.	(141)
<i>R. sphaeroides</i> Ago	RNA, DNA	ssRNA, Plasmid DNA	inaktiv	(3)
<i>T. thermophilus</i> Ago	DNA	ssDNA, ssRNA, Plasmid DNA	ssDNA, ssRNA, Plasmid DNA	(88–90)

Die Aufgabe der Ago Proteine in Prokaryoten ist längst nicht so gut erforscht wie in Eukaryoten. 28% aller prokaryotischen Ago Proteine haben die vollständige katalytische Tetrade und können somit theoretisch die *slicer* Aktivität besitzen<sup>(111)</sup>. Im Gegensatz zu eukaryotischen Ago Proteinen benutzen sie häufig DNA statt RNA als *guide* Strang (siehe Tabelle 2.3). Mit Hilfe dieser *guide* DNA können sie zum Teil eine Vielfalt an *target* Strängen spalten (siehe Abschnitt 2.1.4). Im Falle des TtAgos sind dies ssRNA<sup>(89)</sup>, ssDNA und dsDNA<sup>(88)</sup>. Andere prokaryotische Agos, wie zum Beispiel das *Methanocaldococcus jannaschii* (*M. jannaschii*) Ago können dagegen nur DNA spalten<sup>(139)</sup>. Schon 2009 wurde von der Gruppe um J. van der Oost<sup>(137)</sup> vermutet, dass die prokaryotischen Ago Proteine an der Abwehr gegen Phagen und Plasmide beteiligt sein könnten, da sie häufig in genomischen Regionen gefunden werden, in deren Nachbarschaft Proteine, die in die Abwehr von fremden genetischen Material involviert sind, kodiert werden. Erst kürzlich erschienen erste Studien, die nachweisen, dass prokaryotische Agos tatsächlich Teil einer wichtigen Verteidigungsstrategie von Bakterien gegen fremdes genetisches Material sind. So nutzt RsAgo kurze RNAs, um fremde DNA zu degradieren<sup>(3)</sup>. TtAgo nutzt DNA, um doppelsträngige Plasmide sowie einzelsträngige DNA, die über das Kompetenzsystem aufgenommen wurden, zu zerstören und ist somit ebenfalls eine wichtige Säule der Verteidigungsstrategie des Bakteriums<sup>(88)</sup>.

Im Folgenden sollen die Ago Proteine, welche für diese Arbeit eine entscheidende Rolle spielen, näher vorgestellt werden. Dabei handelt es sich um das humane Ago2 und das *M. jannaschii* Ago (MjAgo). Die Domänen des Ago Proteins werden an Hand des humanen Proteins näher beleuchtet, da hier die meisten Informationen vorhanden sind und für diese Arbeit das humane Protein im Vergleich zum Homolog aus dem Archaea System eine übergeordnete Bedeutung hat.

### 2.3.1. Das humane Argonaute2 (hAgo2) Protein

Das hAgo2 Protein hat eine Länge von 859 Aminosäuren und wird auf Chromosom 8 kodiert, während hAgo1, 3 und 4 auf Chromosom 1 lokalisiert sind<sup>(114)</sup>. Ursprünglich wurde es als eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor eIF2C2 identifiziert, während es heute vor allem dadurch bekannt ist, dass es als einziges der humanen Ago Proteine zur Spaltung von *target* RNAs fähig ist und somit das Schlüsselenzym der siRNA-vermittelten RNAi darstellt<sup>(104,125)</sup>. Die Spal-



**Abbildung 2.6.: Das humane Argonaute2 Protein.** (A) Röntgenkristallstruktur des humanen Argonaute2 Protein im Komplex mit einer miRNA *guide* RNA (PDB 4W5N). Die *guide* RNA (rot) kann von Nukleotid 1 – 8 und 12 – 21 beobachtet werden. Die Qualität der Elektronendichte der Nukleotide 9 - 11 ist nicht ausreichend, um die Position dieses Abschnitts klar zu bestimmen<sup>(142)</sup>. (B) Überblick über die Domänenaufteilung von hAgo2<sup>(123)</sup>. Die Mid Domäne (gelb) bindet das 5'-Ende der *guide* RNA und trägt mit Hilfe des *nucleotide specificity loop* zu deren Selektion bei<sup>(143,144)</sup>, während das 3'-Ende in der PAZ Domäne (magenta) verankert ist<sup>(145)</sup>. Die PIWI Domäne (grün) mit ihrer RNase H-ähnlichen Faltung enthält die katalytische Tetrade und ist somit für die endonukleolytische *slicer* Aktivität von hAgo2 verantwortlich<sup>(105,146)</sup>. Für die Entwindung des siRNA Duplex wichtig ist die N-terminale Domäne (blau)<sup>(147)</sup>. Weiterhin beeinflussen Teile der N-terminalen Domäne die PIWI Domäne und sind somit essentiell für die Spaltaktivität von hAgo2<sup>(148–150)</sup>. Die Linker-Regionen sind hellbraun gefärbt.

taktivität von hAgo2 wird vor allem über die katalytische Tetrade, die sich in der PIWI Domäne befindet, ermöglicht<sup>(123,151)</sup>. Wäre es allerdings nur die PIWI Domäne, welche wichtig für die Spaltung von *target* RNAs ist, so müsste auch das hAgo3 Protein zur Spaltung befähigt sein. Dies ist allerdings nicht der Fall. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass neben einer vollständigen katalytischen Tetrade in der PIWI Domäne ein weiterer Schlüssel zur katalytischen Aktivität des hAgo2 Proteins die N-terminale Domäne ist<sup>(148–150)</sup>.

Damit hAgo2 seine verschiedenen Aufgaben (siehe Tabelle 2.3) korrekt erfüllen kann, bedarf es der Modulation durch andere Proteine. Es konnte bereits eine Reihe von Interaktionspartnern von hAgo2 identifiziert werden. Wie diese jedoch hAgo2 beeinflussen können ist weitgehend unbekannt. Direkte Wechselwirkungen von hAgo2 konnten mit den dsRNA-bindenden Proteinen TRBP und PACT, sowie dem RNase III-ähnlichem Enzym Dicer nachgewiesen werden<sup>(49,152,153)</sup>, die alle wichtige Funktionen in der RNAi ausführen (siehe Abschnitt 2.1.3, 2.1.2 und 2.5). Weitere Wechselwirkungen geht hAgo2 u. a. mit den GW182 Proteinen TNRC6A und B ein, welche wichtige Komponenten der Prozessierungskörperchen und essentiell für die RNAi-vermittelte Gensuppression sind<sup>(108,134,154)</sup>. Außerdem kann hAgo2 mit der Methyltransferase PRMT5 assoziieren, von der vermutet wird, dass sie Komponenten des RISC methyliert und dadurch mit für die Lokalisation an Prozessierungskörperchen verantwortlich ist<sup>(108)</sup>.

Wichtig für die Funktion von hAgo2 ist neben den Interaktionspartnern auch die posttranslationale Modifikation bestimmter Aminosäuren. Eine Rolle spielt dabei die Hydroxylierung des Prolin 700 (P700) durch die Prolyl-4-Hydroxylase. Es konnte gezeigt werden, dass diese Modifikation entscheidend für die Stabilität des Proteins und auch für die Effizienz in der siRNA-vermittelten RNAi ist. Neben ihrer Aufgabe, Stabilität und Effizienz zu gewährleisten, ist die Hydroxylierung an P700 ein Faktor für die Lokalisation an Prozessierungskörperchen. Fehlt die Hydroxylierung, ist die Assoziation von hAgo2 mit den Prozessierungskörperchen verringert<sup>(155)</sup>. Auch Phosphorylierungen an Aminosäureresten von hAgo2 sind in die Funktion des Proteins involviert. So wurde 2008 eine Phosphorylierung am Serin 387 entdeckt, von der angenommen wird, dass sie ebenfalls zur Lokalisation an den Prozessierungskörperchen beiträgt<sup>(156)</sup>. Aber nicht nur für die Lokalisation von hAgo2 können die modifizierten Aminosäuren einen Beitrag leisten. Die Arbeitsgruppe um G. Meister entdeckte 2011, dass die Phosphorylierung des Tyrosin 529 (Y529) möglicherweise einen molekularen Schalter zur Kontrolle der Aktivität des Proteins darstellen kann<sup>(157)</sup>. Y529 ist eine Aminosäure, die in der Mid Bindungstasche mit dazu beiträgt, die Assoziation mit kleinen RNAs zu kontrollieren. Im unphosphorylierten Zustand geht die Aminosäure  $\pi - \pi$ -Interaktionen mit der Base des 5'-Nukleotids ein und bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Sauerstoffatom der 5'-Phosphatgruppe aus<sup>(123,151)</sup>. Wird diese Aminosäure nun phosphoryliert, ist diese Wechselwirkung nicht mehr möglich und die Bindung von kleinen regulatorischen RNAs gestört. Eine Folge dieser verschlechterten Bindung an den *guide* Strang ist dann auch eine signifikant erniedrigte Effizienz der Spaltung von *target* RNAs<sup>(157)</sup>.

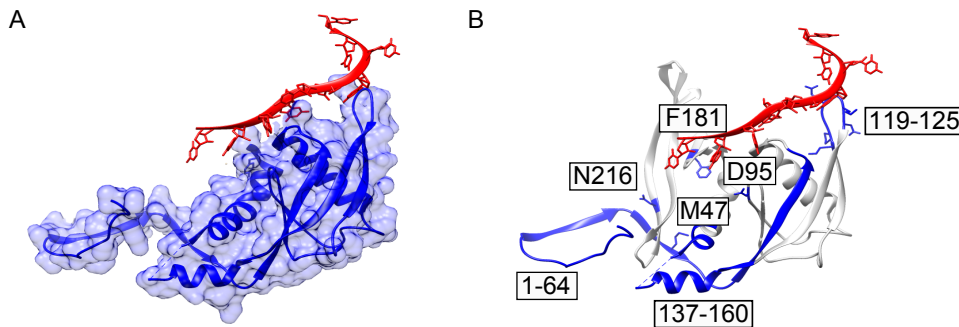
Vermutlich gibt es noch weitere posttranslationale Modifikationen, die bei der Regulation des hAgo2 Proteins assistieren. Allerdings existieren bis heute keine weiteren Untersuchungen zu diesem Thema.

#### 2.3.2. Die N-terminale Domäne

Die N-terminale Domäne von hAgo2 umfasst die Aminosäuren 1 - 175<sup>(123)</sup>. Zusammen mit der PAZ Domäne bildet sie den N-terminalen Lappen des Ago Proteins, welches eine zweigeteilte Struktur aufweist (siehe Abbildung 2.6 A). In Abbildung 2.7 ist die N-terminale Domäne

## 2. Einleitung

dargestellt. Die für die Funktion der N-terminalen Domäne essentiellen Aminosäuren sind hervorgehoben.



**Abbildung 2.7.: Die N-terminale Domäne.** (A) Röntgenkristallstruktur der N-terminalen Domäne aus der Struktur von hAgo2 in Komplex mit einer *guide* RNA miRNA (PDB 4W5N). (B) Darstellung der für die Funktion der N-terminalen Domäne von hAgo2 als essentiell beschriebenen Aminosäuren. Wichtig für die Entwindung von miRNA Duplexen sind die Aminosäuren M47, D95, F181 und N216, wobei die beiden letztgenannten in der der N-terminalen Domäne angegliederten L1-Linker Region liegen<sup>(123,147)</sup>. Die Aminosäuren 1 – 64 und 137 – 160 beeinflussen die Konformation der PIWI Domäne und sind somit essentiell für die Spaltungsaktivität von hAgo2<sup>(148)</sup>. Die in Schurmann et al.<sup>(149)</sup> beschriebenen Motive sind im Text beschrieben, der Übersichtlichkeit halber jedoch in der Abbildung ausgespart. Die Aminosäuren 119 – 125 bilden eine Haarnadel-Struktur, welche die Nukleinsäure-Bindungsfurche beendet<sup>(142)</sup>.

Erste funktionelle Erkenntnisse bezüglich dieser Domäne konnten an Hand von Röntgenkristallstrukturen des TtAgo Proteins gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass im Rahmen der Assemblierung des ternären Komplexes die Duplex-Bildung zwischen *guide* und *target* RNA nur bis zum 16. Nukleotid fortschreiten kann und dann durch die N-Domäne blockiert wird<sup>(90)</sup>.

Der N-terminalen Domäne kommt eine wichtige Funktion für die Spaltung von RNAs zu. Für die *slicer* Aktivität von hAgo2 spielt nicht nur die katalytische Tetrade eine Rolle. Bestimmte Bereiche der N-terminalen Domäne können die katalytische Aktivität verstärken oder inhibieren. Es wurden zwei verschiedene Motive identifiziert, die daran beteiligt sein könnten. Die Arbeiten von Hauptmann et al.<sup>(148)</sup> benennen die Aminosäuren 1 - 64 als Motiv I und die Aminosäuren 137 - 160 als Motiv II. Der Gruppe um D. Grimm<sup>(149)</sup> gelang es, das Motiv I auf die Aminosäuren 44 - 48 einzugrenzen. Das von dieser Gruppe gefundene Motiv II wird auf die Region zwischen Aminosäure 134 und 166 beschränkt. Beide Motive sind unerlässlich für die Aktivierung der katalytischen Fähigkeiten der Ago Proteine. Ein Vergleich des Motivs II von hAgo2 und hAgo3 zeigt, dass das Motiv in hAgo3 weitaus festere Interaktionen mit der PIWI Domäne eingeht, was die Funktionalität der N-Domäne stark beeinträchtigt<sup>(149)</sup>. In Motiv I scheint vor allem das Met 47 eine wichtige Rolle für die Duplex-Entwindung zu spielen<sup>(147,149)</sup>. Aber auch die Mutation von einzelnen Aminosäuren, die nicht in den beschriebenen Regionen liegen, erzeugen schwere Defekte in der Duplex Entwindung, die sich dann in der verminderten Spaltung von *passenger* RNA widerspiegeln (D95A, F181A, N216A). Diese Defekte können durch die Verwendung von instabileren Duplexen aufgehoben werden, d.h. nur für die Entwindung komplett komplementärer Duplexe ist eine voll funktionelle N-Domäne essentiell<sup>(147)</sup>.

Kwak et al.<sup>(147)</sup> postulierten einen „Keil“-Mechanismus, der je nachdem, ob es sich um die Entwindung von *guide* und *passenger* RNA oder *guide* und *target* RNA handelt, aktiv oder



passiv sein kann. Bei Beladung des hAgo2 Proteins mit einem siRNA-Duplex wird die Domäne zunächst nach außen positioniert, um Platz für den perfekten Duplex zu schaffen. Ist der Duplex an Mid und PAZ Domäne gebunden, bewegt sich die Domäne zurück und schiebt sich aktiv wie ein Keil zwischen *guide* und *passenger* RNA. Kwak et al.<sup>(147)</sup> vermuten, dass hierbei ein Chaperon involviert ist. Der passive Mechanismus wird für die Entwindung von *guide* und *target* RNA genutzt. Die N-Domäne blockiert eine Duplex-Propagation nach Nukleotid 16 und ermöglicht so eine Entwindung des *guide-target* Duplexes.

Zusammen mit der PAZ Domäne bildet die N-terminale Domäne einen engen Kanal, durch den die Nukleotide 14 -18 der *guide* RNA gefädelt werden müssen. Interaktionen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der *guide* RNA führen dazu, dass im binären Komplex keine  $\pi - \pi$ -Interaktionen zwischen den Basen ausgebildet werden können und diese nicht für Basenpaarung mit einer *target* RNA zur Verfügung stehen. Dies ist erst möglich nach konformationellen Änderungen, die mit der Bindung von *target* RNA im Bereich der *seed* Region einhergehen (siehe Abschnitt 2.4.2). Die Aminosäuren 119 – 125 bilden eine Haarnadelstruktur, die diesen Nukleinsäure-Bindungskanal beendet und das 3'-Ende der *guide* RNA in die PAZ Domäne führt<sup>(142)</sup>.

### 2.3.3. Die PIWI/Argonaute/Zwille (PAZ) Domäne

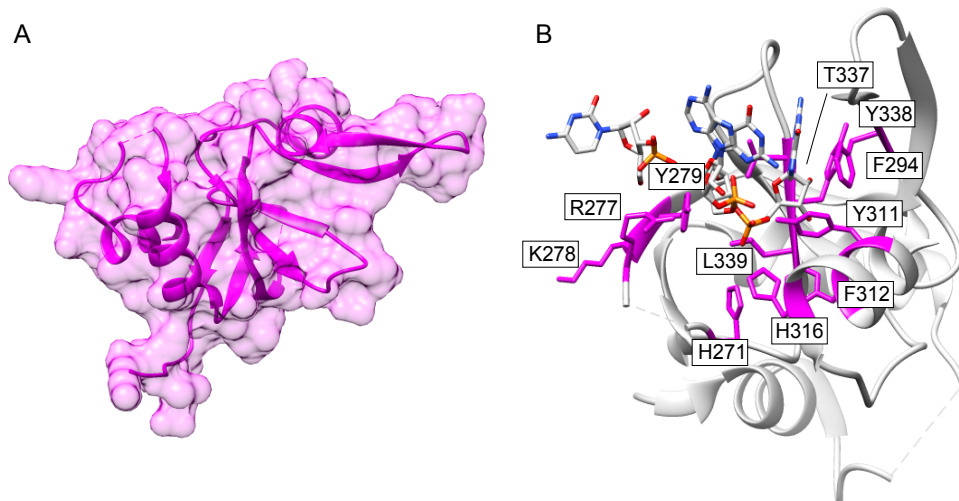
Die PAZ Domäne umfasst die Aminosäuren 226 bis 347 und ist durch die L1 Linker Region mit der N-terminalen Domäne (siehe Abschnitt 2.3.2) verbunden<sup>(123)</sup>. Sie wurde nach den Proteinen PIWI, Argonaute und Zwille benannt; die drei Proteine, in denen die Domäne zunächst entdeckt wurde. Die PAZ Domäne bindet das 3'-Ende der siRNA bzw. miRNA im Ago Protein<sup>(158)</sup>. Eine Darstellung der Struktur der Domäne, sowie den für die Bindung der RNA wichtigsten Resten, findet sich in Abbildung 2.8.

2003 wurden die ersten Strukturen der *D. melanogaster* PAZ Domäne veröffentlicht<sup>(158,159)</sup>, gefolgt von der Struktur der PAZ Domäne des hAgo1 Proteins in Komplex mit einem 9-mer RNA Oligonukleotid<sup>(160)</sup>. Diese Strukturen zeigten, dass die zentrale Struktur der PAZ Domäne ein  $\beta$ -barrel (fassähnliche Struktur) aus fünf<sup>(159)</sup> bzw. sechs<sup>(158,160)</sup> Strängen ist. Alle drei Arbeiten zeigen, dass das  $\beta$ -barrel durch die Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  an einem Ende verschlossen ist. Zwischen  $\beta 5$  und  $\beta 6$  bildet sich eine Haarnadelstruktur, die zusammen mit  $\alpha 3$  zwischen  $\beta 4$  und  $\beta 5$  inseriert ist. Dies könnte zum Beispiel die Funktion der PAZ Domäne modulieren<sup>(158–160)</sup>. Die Faltung der PAZ Domäne ähnelt der Oligonukleotid/Oligosaccharid Bindungs (OB)-Faltung<sup>(159,160)</sup>. Im Gegensatz zur kanonischen OB-Faltung jedoch gleicht die PAZ Domäne mit ihrem  $\beta$ -barrel, welches gegenüber der  $\beta 3/4$ - $\alpha 3$ -Struktur positioniert ist, eher einer Klammer-artigen Struktur und nicht einem perfekt geformten Fass. In dieser Spalte zwischen den beiden Strukturen befindet sich die Furche, in der die Nukleinsäuren gebunden werden können<sup>(159)</sup>. Diese Furche ist basisch und somit prädestiniert dafür, die negativ geladenen Oligonukleotide zu binden. Das Oligonukleotid befindet sich in einer A-Form Helix in dieser Furche, während die zwei überhängenden Nukleotide am 3'-Ende scharf von der Helix abknicken, um in der zentralen PAZ Bindungstasche gebunden zu werden. Drei Reste dieser Bindungstasche sind in allen PAZ Domänen invariant<sup>(160)</sup>. Es handelt sich im hAgo2 Protein

## 2. Einleitung

um F294, L339 und Y311<sup>(123)</sup>. Diese Art und Weise, Nukleinsäuren zu binden, impliziert eine Rolle der PAZ Domäne in der Unterscheidung zwischen murenen siRNAs bzw. miRNAs und langen unprozessierten Vorläufermolekülen<sup>(1,159)</sup>. Yan et al.<sup>(158)</sup> führten auch Untersuchungen zur Substratspezifität der *D. melanogaster* Ago1 PAZ Domäne durch. Dabei fanden sie heraus, dass ssRNA stark über ssDNA präferiert wird. Eine komplett komplementäre dsRNA wird nur wenig schwächer als eine ssRNA gebunden.

Neben den Untersuchungen der Funktion der PAZ Domäne wurden auch Untersuchungen zum Mechanismus der siRNA-Bindung an die PAZ Domäne durchgeführt. Mit Hilfe von Einzelmolekül Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen konnte gezeigt werden, dass ein sogenanntes PAZ *cycling* stattfindet. Dabei muss für die Bindung der *target* RNA die *guide* RNA von der PAZ Domäne entlassen werden. Ist die *target* RNA wieder aus dem Komplex entlassen, so findet eine erneute Assoziation der *guide* RNA mit der PAZ Domäne statt<sup>(139,161)</sup>. Diese Untersuchungen sind an prokaryotischen Ago Proteinen durchgeführt worden. Auf Grund der evolutionär hoch konservierten Struktur<sup>(123)</sup> steht jedoch zu vermuten, dass sich die PAZ Domäne von hAgo2 vergleichbar verhält.

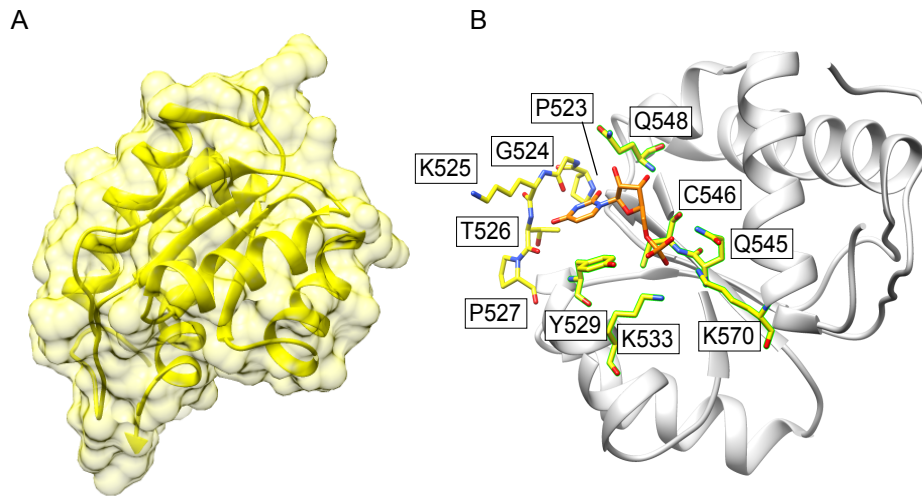


**Abbildung 2.8.: Die PAZ Domäne.** (A) Röntgenkristallstruktur der PAZ Domäne aus der Struktur von hAgo2 in Komplex mit der *guide* RNA miR-20a (PDB 4F3T). (B) Darstellung der für die Funktion der PAZ Domäne von hAgo2 als essentiell beschriebenen Aminosäuren. Die letzten beiden Nucleotide sitzen in der Bindungsfurche der PAZ Domäne und die letzte Base geht  $\pi - \pi$ -Interaktionen mit F294 ein. H316 und H271 koordinieren das nichtbrückenbildende Sauerstoffatom zwischen den letzten beiden Nucleotiden, während Y311 jeweils ein anderes nichtbrückenbildendes, sowie ein brückenbildendes Sauerstoffatom stabilisiert<sup>(123)</sup>. Die anderen markierten Aminosäuren spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Assoziation mit RNA; werden sie mutiert, ist die Bindung der PAZ Domäne an RNAs gestört<sup>(133,162)</sup>.

### 2.3.4. Die *middle* (Mid) Domäne

Die Mid Domäne umspannt die Aminosäuren 450 - 572 und bildet die strukturelle Basis für die Erkennung des 5'-Nucleotids der *guide* RNA<sup>(123,144)</sup>. Zusammen mit der PIWI Domäne (siehe Abschnitt 2.3.5) bildet sie den C-terminalen Lappen des Ago Proteins. Über die L2 Linker Region ist die Mid Domäne mit dem N-terminalen Teil des Ago Proteins verbunden (siehe Abbildung 2.6 A). In Abbildung 2.9 ist die Mid Domäne mit den an der Bindung des

5'-Nukleotids hauptsächlich beteiligten Aminosäuren dargestellt. Das 5'-Nukleotid ist vom Rest der *guide* RNA im Phosphatrückgrat abgeknickt und bildet keine Basenpaarung mit der *target* RNA aus<sup>(61,79,140,163)</sup>. Die Struktur der Mid Domäne zeigt eine Rossmann-ähnliche Fal-



**Abbildung 2.9.: Die Mid Domäne.** (A) Röntgenkristallstruktur der Mid Domäne aus der Struktur von hAgo2 in Komplex mit der *guide* RNA miR-20a (PDB 4F3T). (B) Darstellung der für die Funktion der Mid Domäne von hAgo2 als essentiell beschriebenen Aminosäuren. Die Mid Domäne enthält den *nucleotide specificity loop*, der aus den Aminosäuren P523, G524, K525, T526 und P527 besteht und die Selektion des 5'-Nukleotids beeinflusst<sup>(144)</sup>. (B) Darstellung der für die Funktion der Mid Domäne von hAgo2 als essentiell beschriebenen Aminosäuren. Y529 bildet  $\pi - \pi$ -Interaktionen mit der Base des 5'-Nukleotids aus, während der Zucker der Base durch Q548 stabilisiert wird. Die nichtbrückenbildenden Sauerstoffe der Phosphatgruppe des Nukleotids gehen zahlreiche stabilisierende Interaktionen mit weiteren Aminosäuren der Mid-Bindungstasche ein<sup>(123,140,144)</sup>.

tung<sup>(123,144,164,165)</sup>. Vier  $\beta$ -Stränge flankiert von  $\alpha$ -Helices bilden das zentrale  $\beta$ -Faltblatt<sup>(164)</sup> (siehe Abbildung 2.9). Das 5'-Nukleotid wird durch verschiedene Reste fest in seiner Position gehalten. Vor allem das 5'-Phosphat zeigt intensive Wechselwirkungen mit Resten der Mid Domäne<sup>(89,123,140,144,165,166)</sup>. Die komplette hAgo2-Struktur, sowie auch die QDE2-Mid-PIWI-Struktur lässt erkennen, dass neben Resten der Mid Domäne auch Teile der PIWI Domäne an der Stabilisierung des 5'-Nukleotids beteiligt sind<sup>(123,165)</sup>.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass ein Großteil der miRNAs in den unterschiedlichsten Organismen vom Wurm über die Fliege bis zum Menschen eine ausgeprägte Präferenz für ein U-Nukleotid am 5'-Ende zeigt<sup>(12,167,168)</sup>. Die Arbeiten von Frank et al.<sup>(144)</sup> haben erstmals Aufschluss über die strukturelle Basis für diese Präferenz gegeben. Sie fanden den sogenannten *nucleotide specificity loop* (NSL), der die Aminosäuren von P523 - P527 umfasst. Die 5'-terminale Base interagiert mit dem Rückgrat von G524 und T526 im NSL. Diese stabilisierenden Wechselwirkungen finden allerdings nur mit einem U- oder A-Nukleotid statt. Ist das 5'-terminale Nukleotid ein C oder ein G, so sind repulsive Interaktionen mit dem NSL zu beobachten. Auch andere Interaktionen der Base mit der Mid Bindungstasche können nur in Anwesenheit eines 5'-U oder 5'-A stattfinden. Affinitätsmessungen zwischen der isolierten

## 2. Einleitung

Mid Domäne und UMP, AMP, CMP oder GMP konnten zeigen, dass CMP und GMP wesentlich schlechter gebunden werden als UMP oder AMP.

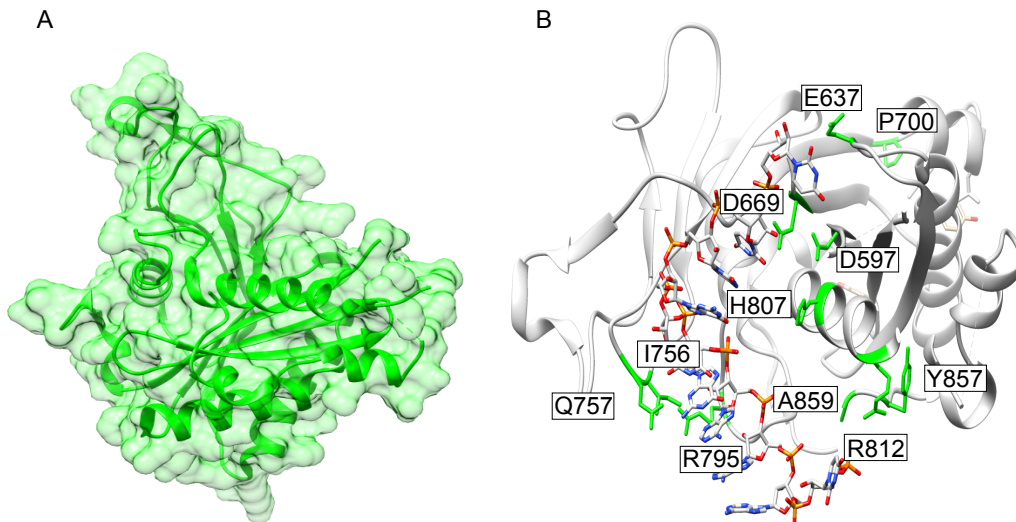
Insgesamt gesehen ist der Beitrag des 5'-Phosphats zur Bindung an die Mid Domäne wesentlich höher als der Beitrag der Base. Insofern kann der Phosphatgruppe auch eine höhere Bedeutung für die Positionierung und Fixierung der *guide* RNA im Protein und somit für die Determinierung der Spaltposition beigemessen werden. Fehlt das 5'-Phosphat, wird die Befestigung des *guide* Stranges gelockert und es kann zu einem Verlust der Genauigkeit in Bezug auf die Spaltposition kommen, wie es von Rivas et al.<sup>(58)</sup> beobachtet wurde.

Neben ihrer Hauptaufgabe, der Bindung und Positionierung der *guide* RNA, dient die Mid Domäne auch als Plattform für Protein-Protein-Interaktionen. So können GW182 Proteine mit ihrem „Ago-Haken“ an ein Bindungsmotiv in der Mid-PIWI-Grenzfläche binden. Aminosäure-Reste der 5'-Nukleotid-Bindungstasche sind an der Assoziation des „Ago-Hakens“ beteiligt. In Kombination mit der Erkenntnis, dass der „Ago-Haken“ zu einer Aufhebung der miRNA-vermittelten RNAi führen kann, wird eine regulierende Funktion des „Ago-Hakens“ vermutet. Dieses etwa 22 Reste umfassende lineare konservierte Motiv wurde initial im Tas3 Protein des RITS Komplexes von *S. pombe* entdeckt<sup>(169)</sup>.

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

Die PIWI Domäne ist die größte Domäne des hAgo2 Proteins und umfasst die Aminosäuren 573 - 859<sup>(123)</sup>. Sie weist eine RNase H-ähnliche Faltung auf und nutzt genau wie diese divalente Kationen, um die Spaltung zu katalysieren<sup>(58,105,141,170)</sup>. Ebenso wie die RNase H besitzt auch hAgo2 eine katalytische Tetrade. Dies wurde allerdings erst sehr spät erkannt. In beiden 2012 veröffentlichten Strukturen von hAgo2 wurde nur die katalytische Triade bestehend aus D597, D669 und H807 beschrieben<sup>(123,151)</sup>. Die vierte zur katalytischen Tetrade gehörende Aminosäure wurde im gleichen Jahr in der Struktur von *Kluyveromyces polysporus* (*K. polysporus*) Ago (KpAgo) entdeckt. Die katalytische Tetrade von hAgo2 wird komplettiert durch E637, welches sich in einer flexiblen Schleife befindet, und je nach Konformation des Proteins in räumlicher Nähe der katalytischen Triade ist, oder nicht. Diese flexible Ergänzung der katalytischen Tetrade wird Glutamatfinger genannt<sup>(146)</sup> (siehe Abschnitt 2.4.3).

Eine Besonderheit der eukaryotischen PIWI Domäne ist die sogenannte C-terminale Insertion, welche aus zwei eng gepackten  $\alpha$  Helices besteht. Diese wurde erstmals in der QDE-2-Mid-PIWI Struktur beschrieben<sup>(165)</sup>. In der 2012 veröffentlichten Röntgenkristallstruktur von hAgo2 ist diese C-terminale Insertion nur partiell aufgelöst. Eine Überlagerung beider Strukturen zeigt jedoch, dass die C-terminale Insertion die RNA-Bindungsfurche zwar abdeckt, aber immer noch Raum für mögliche Basenpaarung mit einer *target* RNA lässt. Außerdem ist erkennbar, dass Wechselwirkungen mit der PAZ Domäne in dieser relativ geschlossenen Konformation für die C-terminale Insertion möglich sind. Ändert das Protein jedoch seine Konformation in einen offenen Zustand beispielsweise durch Bindung einer *target* RNA, so wird das Erreichen der PAZ Domäne unmöglich<sup>(123)</sup>. Diese Erkenntnisse implizieren, dass die C-terminale Insertion



**Abbildung 2.10.: Die PIWI Domäne.** (A) Röntgenkristallstruktur der PIWI Domäne aus der Struktur von hAgo2 in Komplex mit der *guide* RNA miR-20a (PDB 4F3T). (B) Darstellung der für die Funktion der PIWI Domäne von hAgo2 als essentiell beschriebenen Aminosäuren. Die katalytische Tetrade wurde erstmals identifiziert in KpAgo<sup>(146)</sup> und wird gebildet aus den Aminosäuren D597, E637, D669 und H807. Der Übersicht halber wurden die Aminosäuren, die mit dem Rückgrat der *guide* RNA wechselwirken (K709, R714, H753, I756, R761, Y790, R792, S798, Q757, Y804<sup>(123,151)</sup>), ebenso wie die Tryptophan-Bindungstaschen weggelassen. Y857 und A859 als Teil des hydrophoben C-Terminus (M856, Y857, F858, A859) tragen ebenso wie R812 zur Stabilisierung der Phosphatgruppe des 5'-Nukleotids bei<sup>(123,146,151)</sup>. R795, I756 und Q757 flankieren die kleine Furche und gehen *Van der Waals* sowie hydrophobe Wechselwirkungen mit dem *guide-target* Duplex von Position 2 – 7 ein<sup>(142)</sup>.

ein Sensor oder auch ein Regulator der Ago Proteine sein könnte<sup>(123,165)</sup>.

Neben der Katalyse der RNA Spaltung ist eine weitere Aufgabe der PIWI Domäne das Arrangement der Basen in der *seed* Region. Die Basen 2 - 6 gehen  $\pi - \pi$ -Interaktionen miteinander ein und sind präarrangiert, um eine passende *target* RNA effizient binden zu können. Die PIWI Domäne organisiert die Basen der *seed* Region über Interaktionen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat<sup>(123,171)</sup>.

Auch nach Bindung der *target* RNA ist die PIWI Domäne in die Positionierung der *seed* Region involviert. Die Aminosäuren I756, Q757 und R795 bilden Van der Waals und hydrophobe Wechselwirkungen mit der kleinen Furche des *guide-target* Duplexes von Position 2 – 7 aus und stabilisieren diesen so im Protein<sup>(142)</sup>.

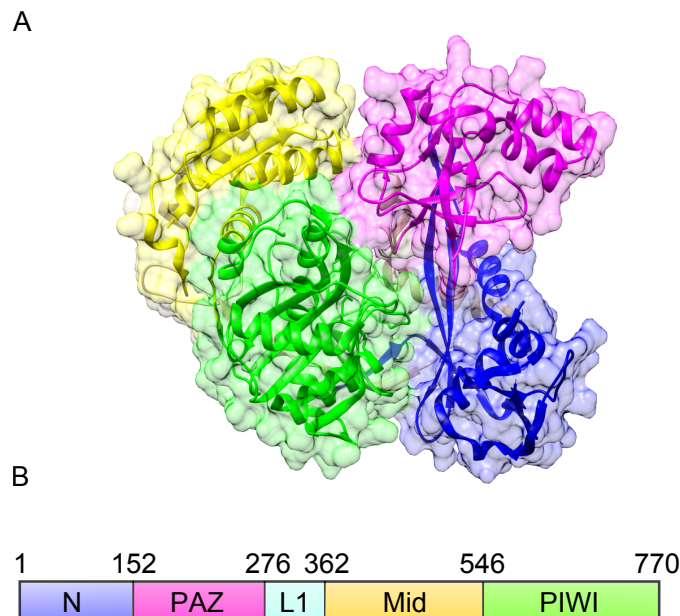
Außerdem kann die PIWI Domäne wie auch die Mid Domäne als Plattform für Protein-Protein-Interaktionen dienen. Es konnte gezeigt werden, dass die PIWI Domäne von hAgo2 TRBP binden kann<sup>(93)</sup>.

### 2.3.6. Das *Methanocaldococcus jannaschii* Argonaute Protein

Erstmal beschrieben wurde MjAgo als Protein mit einer PIWI Domäne im Rahmen von Untersuchungen der Gruppe um A. Bateman<sup>(172)</sup>. Sie konnten erstmals zeigen, dass PIWI Do-

## 2. Einleitung

mänen auch in prokaryotischen Proteinen zu finden sind. Es existiert keine Röntgenkristallstruktur des *M. jannaschii* Proteins. Als Modell dient daher die Röntgenkristallstruktur eines anderen archaebakteriellen Ago Proteins, des *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) Ago Proteins (siehe Abbildung 2.11). Mit diesem Protein teilt es eine Sequenzhomologie von 28%. Die Domänenorganisation ist sehr ähnlich zum hAgo2 Protein. Der größte Unterschied zwischen den beiden Strukturen liegt in der Organisation des N-terminalen Lappens<sup>(139)</sup>. Die PAZ und die N-terminale Domäne sind viel weiter nach innen rotiert als beim humanen Ago (vergleiche Abbildung 2.6). Dadurch nimmt das Protein eine geschlosseneren Konformation an. Die beiden hier verglichenen Strukturen sind allerdings auch in ihrem funktionellen Zustand unterschiedlich. Das dargestellte *P. furiosus* Ago ist in der APO-Konformation kristallisiert, während das hAgo2 an einen *guide* Strang gebunden ist.



**Abbildung 2.11.: Das *Pyrococcus furiosus* Argonaute Protein.** (A) Röntgenkristallstruktur des *P. furiosus* Argonaute Proteins (PDB 1Z25). (B) Schematische Repräsentierung der Domänenabgrenzungen<sup>(105)</sup>.

Das katalytisch aktive *M. jannaschii* Ago Protein nutzt als *guide* Strang keine RNA sondern DNA. Das passende *target* ist ebenfalls DNA an Stelle von RNA<sup>(139)</sup>. Das Archäobakterium *M. jannaschii* ist thermophil und methanogen und wird in hydrothermalen Quellen tief im Ozean, den sogenannten „Weißen Rauchern“, gefunden. Daraus folgt, dass sich die Reaktionsbedingungen stark von den Bedingungen des humanen Ago Proteins unterscheiden. Eine Spaltung von *target* DNAs kann erst bei über 75°C beobachtet werden<sup>(139)</sup>. Im Gegensatz zu hAgo2 ist über die Anforderungen an *guide* und *target* Substrate wenig bekannt. Die Herkunft der *guide* Sequenzen, ebenso wie eine mögliche Präferenz für ein 5'-Nukleotid ist nicht bekannt. Die archaeeellen Ago Proteine besitzen keinen NSL bzw. die zum NSL korrespondierende Sequenz ist soweit von der Mid Bindungstasche entfernt, dass spezifische Interaktionen mit dem 5'-Nukleotid nicht möglich sind<sup>(144)</sup>.



## 2.4. Strukturelle Voraussetzungen für die hAgo2-vermittelte siRNA-abhängige target RNA Spaltung

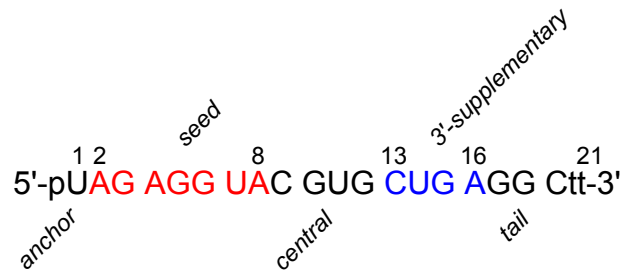
### 2.4.1. Strukturelle Eigenschaften von kleinen regulatorischen RNAs und target RNAs

Die kleinen regulatorischen RNAs, welche auf die Ago Proteine geladen werden, haben bestimmte Eigenschaften, die ihre Funktion im RISC beeinflussen. Dabei ist es sehr wichtig, dass die siRNA effizient in den RISC geladen wird. Charakterisiert sind siRNAs, die effizient in den RISC geladen werden, durch zwei Nukleotide 3'-Überhang und ein 5'-Phosphat, da diese Kennzeichen wichtige Voraussetzungen für die Bindung an die Mid und die PAZ Domäne darstellen (siehe Abschnitt 2.3.4 und Abschnitt 2.3.3). Diese Eigenschaften erhalten die siRNAs im Rahmen ihrer Prozessierung durch das RNase III-ähnliche Enzym Dicer<sup>(41,45)</sup>. Während des Ladens der siRNA in den RISC, wird einer der beiden Stränge als *guide* ausgewählt. Dies geschieht auf Grund thermodynamischer Parameter der siRNA; der Strang mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende wird als *guide* gebunden<sup>(51,52)</sup> (siehe Abschnitt 2.1.2). Somit weist eine besonders effiziente siRNA eine klare thermodynamische Differenz zwischen 3'- und 5'-Ende auf.

Ist der *guide* Strang gebunden, wird er durch das Ago Protein in verschiedene Domänen aufgeteilt, die verschiedene Aufgaben bei *target* Erkennung, Bindung und Spaltung übernehmen (siehe Abbildung 2.12). Die *anchor* Sequenz ist dabei ebenso wie die *tail* Sequenz verantwortlich für eine Vereinfachung der Beladung des Ago Proteins und eine Sicherung des *guide* Stranges im Ago Protein nach Entlassen des *passenger* Stranges. Beide Sequenzen gehen keine Basenpaarung mit der *target* RNA ein, auch wenn eine Basenpaarung auf Grund der Sequenz vorausgesagt wird<sup>(173)</sup>. Die *seed* Sequenz ist präarrangiert in Form einer Helix angeordnet und ermöglicht somit eine vereinfachte Assoziation mit einer passenden *target* RNA<sup>(171,173)</sup>. Die Basenpaarung in der *seed* Region ist besonders wichtig und vor allem im zentralen Abschnitt unabdingbar für eine effiziente *target* Bindung, während in den Randbereichen der *seed* Region Fehlpaarungen theoretisch möglich sind. Ist die Basenpaarung in diesen Bereichen schwächer, gewinnt die Basenpaarung in der 3'-*supplementary* Region an Bedeutung. Die Basenpaarung im zentralen Bereich um die Spaltstelle jedoch ist essentiell für die Spaltung der *target* RNA. Hier werden keine Fehlpaarungen toleriert<sup>(173)</sup>.

Ist ein binärer Komplex aus hAgo2 und *guide* RNA gebildet, kann eine *target* RNA gebunden werden. Auch diese RNA hat bestimmte strukturelle Eigenschaften, die ihre Bindung an den RISC und die *silencing* Effizienz beeinflussen. Zunächst ist es wichtig, dass es Bindungsstellen gibt, die wie oben beschrieben ausreichend komplementär zur *guide* RNA sind, damit Spaltung stattfinden kann<sup>(59,173)</sup>. Dabei ist es eine notwendige Voraussetzung, dass sich zwischen der *guide* und der *target* RNA eine A-Form Helix ausbildet. Ist dies nicht der Fall, kann keine Spaltung stattfinden<sup>(61,91,174)</sup>. Deshalb toleriert hAgo2 nur RNA, nicht aber DNA als *guide* bzw. *target* Strang. RNA zeigt eine A-Form Helix-Geometrie, während DNA eine B-Form Helix ausbildet<sup>(91)</sup>. Interessanterweise zeigt die aus *guide* DNA und *target* DNA bestehende Helix in prokaryotischen Ago Proteinen ebenfalls eine Helix-Geometrie, die eher einer A- als einer B-

## 2. Einleitung



**Abbildung 2.12.: Funktionale Domänen der *guide* RNA.** Nachdem die *guide* RNA auf das Ago Protein geladen ist, wird sie in funktionale Domänen geteilt. So sind vor allem die *anchor* und die *tail* Region am Beladen des Ago Proteins beteiligt und tragen dazu bei, dass nach Entlassen der *passenger* RNA die *guide* RNA fest an das Ago Protein gebunden bleibt. Basenpaarung mit der *target* RNA kann im Bereich der *seed*, *central* und *3'-supplementary* Region stattfinden<sup>(173)</sup>.

Form ähnelt<sup>(59)</sup>. Offensichtlich ist das prokaryotische Ago Protein in der Lage, die Ausbildung der Helix zwischen *guide* und *target* DNA so zu beeinflussen, dass sich statt einer für DNA typischen B-Form eine A-Form ausbildet.

Die Bindungsstellen befinden sich typischerweise im 3'-UTR der *target* mRNAs<sup>(18)</sup>. Die Zugänglichkeit der Bindungsstelle spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle für die Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi. Blockieren Sekundärstrukturen der mRNA den Zugang zur Bindungsstelle, ist die *silencing* Effizienz stark herabgesetzt<sup>(99,100)</sup>.

### 2.4.2. Konformationelle Änderungen des Argonaute Proteins bei Bindung von siRNAs bzw. *target* RNAs

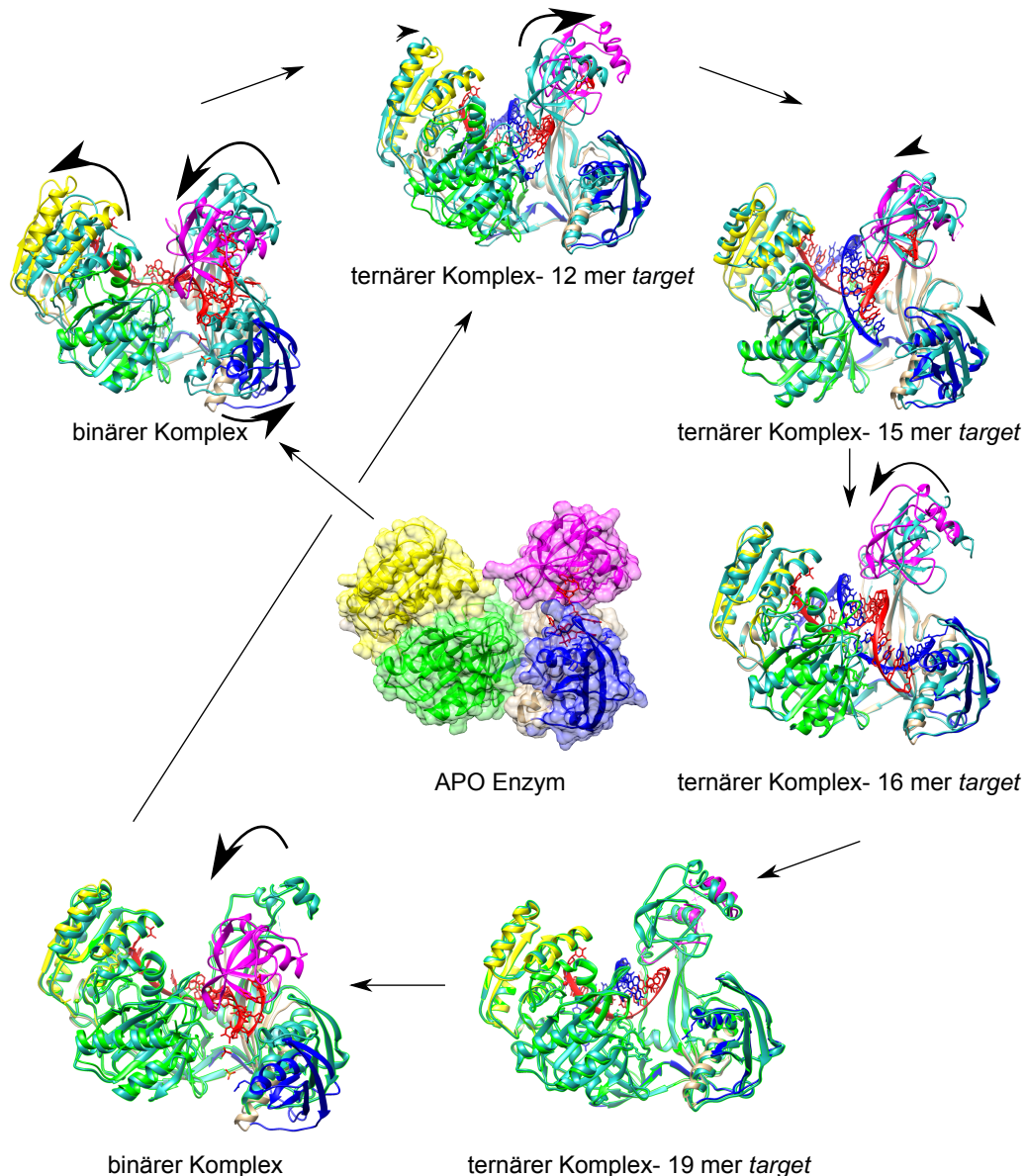
Um eine *target* RNA zu spalten, muss das Ago Protein zunächst *guide* und *target* RNA in der richtigen Orientierung binden. Dazu sind große konformationelle Änderungen notwendig (siehe Abbildung 2.13). Diese sollen im folgenden Abschnitt an Hand von Röntgenkristallstrukturen verschiedener binärer und ternärer Komplexe genau beschrieben werden. Allerdings ist diese Serie von Röntgenkristallstrukturen verschiedener Komplexe des Ago Proteins bisher nur für das Ago Protein des Eubakteriums *T. thermophilus* gelöst worden<sup>(59,89,166)</sup>. Für hAgo2 existieren bisher nur Röntgenkristallstrukturen für einen binären Komplex aus hAgo2 und einer 21-mer *guide* RNA<sup>(123,151)</sup>, sowie Strukturen ternärer Komplexe mit verkürzter *target* RNA von maximal 11 Nukleotiden Länge<sup>(142)</sup>. Überlagerungen des binären Komplexes mit seinem eubakteriellen Gegenstück zeigen jedoch, dass die Strukturen sehr homolog und nahezu identisch in Positionierung und Orientierung der Domänen sind. Dasselbe gilt für die archaebakteriellen Ago Proteine<sup>(123)</sup>.

Das Ago Protein ist äußerst flexibel, solange es keinen *guide* gebunden hat. Die Bindung einer Nukleinsäure führt dazu, dass Ago stabilisiert und die Flexibilität stark eingeschränkt wird<sup>(92,123,175)</sup>. Die größte Bewegungsfreiheit hat im ungebundenen Zustand der N-terminale Teil des Proteins. Dabei ist erkennbar, dass vor allem die PAZ Domäne hohe Fluktuationen aufweist. Dies könnte wichtig für die Assoziation mit einem *guide* sein<sup>(92,175)</sup>.

Es gibt keine Röntgenkristallstruktur eines humanen oder eubakteriellen Ago Proteins, welches keinerlei Nukleinsäure gebunden hat, was ein weiterer Hinweis auf die hohe Flexibilität des Proteins ist. Die Struktur eines Ago Proteins, welches im Bereich der PAZ Domäne mit ei-



2.4. Strukturelle Voraussetzungen für die hAgo2-vermittelte siRNA-abhängige target RNA Spaltung



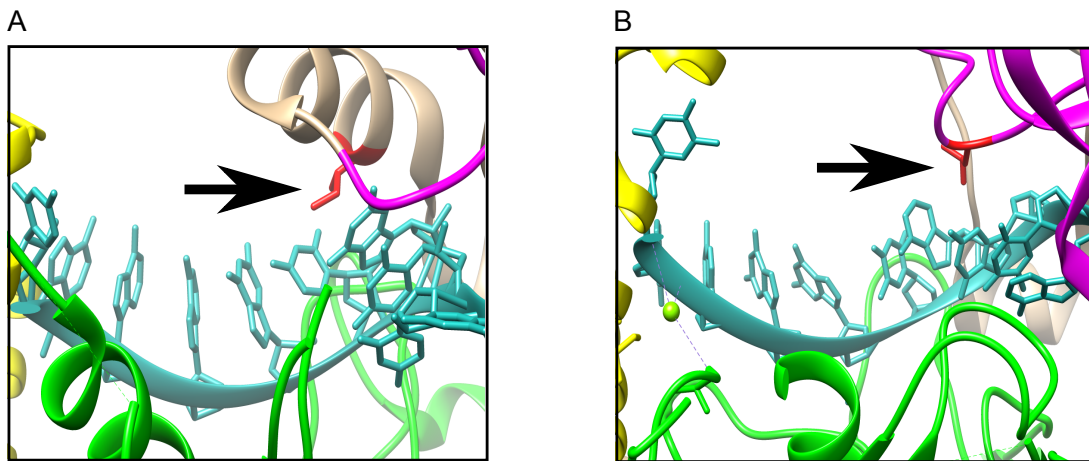
**Abbildung 2.13.: Konformationelle Änderungen des Ago Proteins bei Bindung von *guide* und *target* Strängen.** Dargestellt sind Röntgenkristallstrukturen des TtAgo Proteins, die den Ablauf von *guide* und *target* Bindung repräsentieren. Farblich markiert sind jeweils die Domänen des benannten Komplexes (N: dunkelblau; PAZ: magenta; Mid: gelb; PIWI: grün). Dieser ist mit dem mittelblau eingefärbten jeweils vorangehenden Komplex übereinander gelegt, sodass die strukturellen Transitionen, die im Rahmen der Nukleinsäurebindung stattfinden, erkennbar sind. Kristalle derartiger Komplexe des humanen Ago Proteins wurden bisher nicht aufgelöst. Die *guide* DNA ist in rot, die *target* DNA in blau dargestellt. Domänenbewegungen sind durch große Pfeile gekennzeichnet. Das APO Enzym (PDB 3DLB) ist kristallisiert in Komplex mit einem 10mer *guide*. Die PDB ID's für die weiteren Komplexe lauten wie folgt: binärer Komplex mit 21-mer *guide* DNA (3DLH); ternäre Komplexe (alle mit 21-mer *guide* DNA): 12-mer *target* DNA (4N47), 15-mer *target* DNA (4N41), 16-mer *target* DNA (4NCA), 19-mer *target* DNA (4N76).

ner 10-mer DNA interagiert, ist diejenige, die dem ungebundenen (APO) Protein am Nächsten kommt. Im Vergleich zur Struktur des binären Komplexes, repräsentiert durch Ago gebunden an eine 21-mer *guide* DNA, sind große konformationelle Änderungen zu beobachten (siehe Abbildung 2.13). Die *guide* DNA ist im binären Komplex mit dem 5'-Ende in der Mid Domäne verankert und mit ihrem 3'-Ende mit der PAZ Domäne assoziiert. Dazu sind große Anpassungen des

## 2. Einleitung

Proteins notwendig, da im APO Enzym kein Platz für eine 21 Nukleotide lange Nukleinsäure ist. Die Mid Domäne rotiert um  $22^\circ$ , um den Nukleinsäure-Bindungskanal um  $8 \text{ \AA}$  zu verlängern. Gleichzeitig rotiert auch die PAZ Domäne um  $25^\circ$ , damit sich der Nukleinsäure-Bindungskanal etwas verengt, was die Positionierung und Fixierung des *guide* ermöglicht. Aber auch in der relativen Positionierung der N-terminalen Domäne finden Veränderungen statt<sup>(166)</sup>. Der entstehende binäre Komplex ist bereit, ein *target* zu binden.

Auch für die Bindung des *target* Strangs sind Anpassungen des Proteins notwendig (siehe Abbildung 2.13). Im binären Komplex ist der Nukleinsäure-Bindungskanal zu eng, um den helikalen Duplex von *guide* und *target* aufzunehmen. In Abbildung 2.13 ist die schrittweise Bindung des *target* Stranges durch binäre hAgo2-*guide* Strang-Komplexe mit verschiedenen langen *target* DNAs dargestellt. Die Nukleation der Bildung des Duplexes zwischen *guide* und *target* DNA wird durch den Komplex mit der 12-mer DNA dargestellt. Für die initiale Nukleation findet die Basenpaarung zwischen Nukleotid 2 und 8, also in der *seed* Region, statt<sup>(61,107,141,176)</sup>.



**Abbildung 2.14.: Unterbrechung der  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen in der *seed* Region der *guide* RNA.** (A) Vergrößerung der *seed* Region gebunden an hAgo2 (Ausschnitt aus PDB 4F3T). Nukleotid 2 – 6 zeigen  $\pi$  –  $\pi$ -Interaktionen, die Basen sind nach außen ausgerichtet und prä-arrangiert, um die *target* RNA zu binden. Zwischen Base 6 und 7 interkaliert I365, welches sich auf der Linker Region zwischen Mid und PAZ Domäne befindet. Dadurch wird die  $\pi$  –  $\pi$ -Interaktion zwischen den Basen unterbrochen und ein Knick in die *guide* RNA eingefügt. (B) Auch im TtAgo finden  $\pi$  –  $\pi$ -Interaktionen zwischen den Basen statt. Allerdings können sich diese von Nukleotid 2 – 7 ausbilden und der danach eingefügte Knick durch L267 ist wesentlich weniger ausgeprägt<sup>(123)</sup>.

Dies ist etwas anders im humanen Ago2. Hier ist vermutlich eine Basenpaarung zwischen Nukleotid 2 und 7 ausreichend. In der hAgo2 Struktur ist zu sehen, dass zwischen Nukleotid 6 und 7 ein Isoleucin (Ile365, Teil der Helix 7) interkaliert, welches die Interaktion der Basen stört und einen Knick in die *guide* RNA eingefügt<sup>(123)</sup>. Dies ist in Abbildung 2.14 A zu erkennen. In Abbildung 2.14 B ist der viel weniger ausgeprägte Knick im TtAgo, eingeführt durch ein Leucin (L267, Teil der PAZ Domäne) zwischen Nukleotid 7 und 8, dargestellt.

Bereits diese initiale Basenpaarung im Bereich der *seed* Region setzt eine Rotation der PAZ Domäne voraus. Auch die N-terminale Domäne bewegt sich und so bewegen sich C-terminaler und N-terminaler Teil des Proteins auseinander, was zu einer Erweiterung des Nukleinsäure-Bindungskanals führt. Je länger die *target* DNA ist und je größer die Anzahl der Basenpaare

#### 2.4. Strukturelle Voraussetzungen für die hAgo2-vermittelte siRNA-abhängige target RNA Spaltung

wird, desto mehr bewegt sich der N-terminale Teil des Proteins, um mehr Platz für den Duplex zu schaffen<sup>(59)</sup>.

Dies konnte auch in der Kristallstruktur des ternären Komplexes mit hAgo2 und einer kurzen *target* RNA beobachtet werden. Eine erweiterte Basenpaarung erfordert eine signifikante Öffnung des Nukleinsäure-Bindungskanal. Schon eine Basenpaarung, die über das Nukleotid 5 hinausgeht, erfordert, dass sich die Helix 7, die im binären Komplex das interkalierende Ile365 positioniert, um etwa 4 Å bewegt, da sich ansonsten sterische Hinderungen mit den *target* Nukleotiden 6 und 7 ergeben würden. In ihrer neuen Position interagiert die Helix 7 dann mit der kleinen Furche des *guide-target* Duplexes. Diese durch Basenpaarung in der *seed* Region ausgelöste Bewegung der Helix 7 scheint auch zur Rotation in der PAZ Domäne zu führen. Offenbar bewegen sich die PAZ Domäne und die Helix 7 im humanen Protein zusammen in einer fest verbundenen Einheit. Die dadurch hervorgerufene Erweiterung des Nukleinsäure-Bindungskanal führt zu einer Umstrukturierung der *guide* RNA, deren Nukleotide 11 – 16 anschließend in einer A-Form-ähnlichen Konformation vorliegen<sup>(142)</sup>. Im Gegensatz zu archaelen Ago Proteinen kann die Helix 7 in eubakteriellen Ago Proteinen nicht gefunden werden<sup>(166)</sup>.

Kristallstrukturen ternärer Komplexe mit TtAgo zeigen, dass die Ausbildung von mindestens 14 Basenpaaren zu einer weiteren Rotation der PAZ Domäne führt, sodass diese durch das 3'-Ende des *guide* Strangs nicht mehr erreicht werden kann<sup>(59)</sup>. Es kommt zu einer Freisetzung des 3'-Endes und zur Ausbildung des spaltungskompetenten ternären Komplexes. Dazu kommen Veränderungen im Bereich der katalytischen Tetrade, die ebenfalls notwendige Voraussetzung für die Spaltung sind. Diese werden in Abschnitt 2.4.3 genauer beschrieben. Insgesamt rotiert die PAZ Domäne um 23,1° und die N-Domäne um 18,6°. Dazu kommt eine Translation von 1,4 Å bzw. 0,6 Å<sup>(89)</sup>. Die Spaltung der *target* DNA führt nicht zu konformationellen Änderungen im Protein. Erst die Freisetzung der Spaltprodukte und die Rückkehr zum binären Komplex erfordern wieder Anpassungen des Proteins vor allem im Bereich der PAZ und der N-terminalen Domäne.

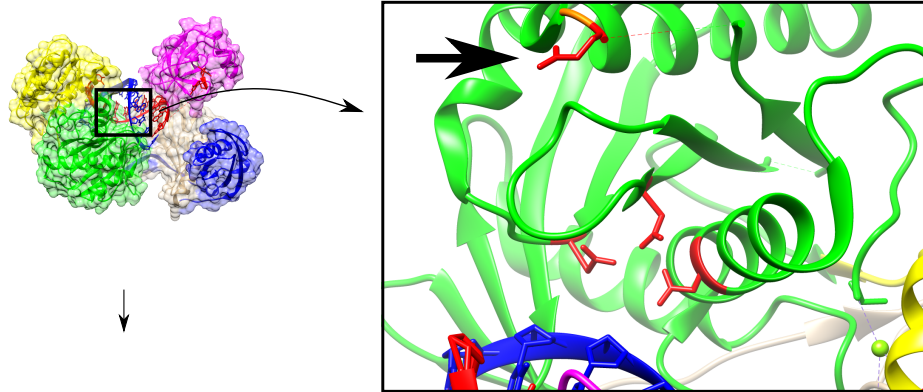
Die hier vorgestellten Strukturen bekräftigen das 2005 postulierte *two state* Modell, das besagt, dass im freien binären Komplex das 3'-Ende der *guide* RNA an die PAZ-Domäne gebunden vorliegt, während bei Bindung einer komplementären *target* RNA eine Freisetzung des 3'-Endes von der PAZ Domäne erforderlich ist<sup>(177)</sup>. Weitere Unterstützung bekommt das Modell durch Einzelmolekül FRET Messungen, die ebenfalls eine Freisetzung des *guide* von der PAZ Domäne bei *target* Bindung zeigen<sup>(139,161)</sup>.

#### 2.4.3. Der Mechanismus der Argonaute-vermittelten Spaltung

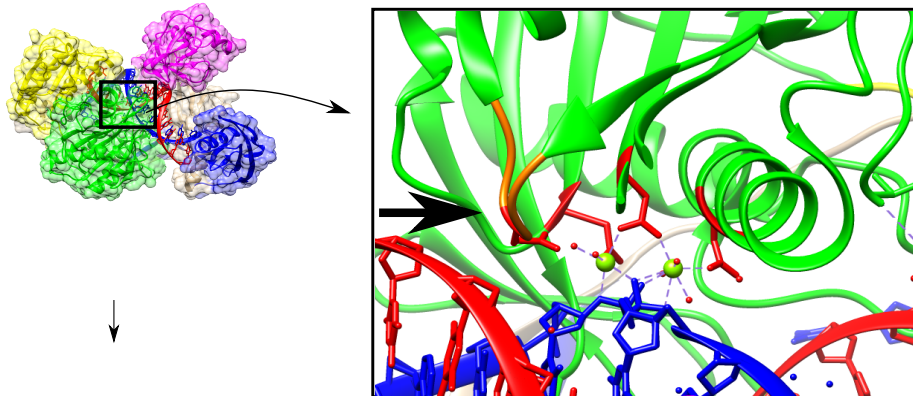
Lange Zeit wurde angenommen, dass eine katalytische Triade für die Ago-vermittelte Katalyse ausreichend ist. Auf Basis der Analogie der PIWI Domäne zur RNase H, welche für die Spaltung von RNA eine katalytische Tetrade benötigt, wurde jedoch immer wieder nach einer vierten Aminosäure gesucht. Erst 2012 entdeckte die Gruppe um D. Patel in der von ihnen gelösten Röntgenkristallstruktur des binären Komplexes mit KpAgo, dass ein Glutamat, positioniert in einer flexiblen Schleife des Proteins, diese fehlende Aminosäure der katalytischen Tetrade sein könnte. Es vervollständigt die katalytische Tetrade, um ein spaltungskompetentes Ago Prote-

## 2. Einleitung

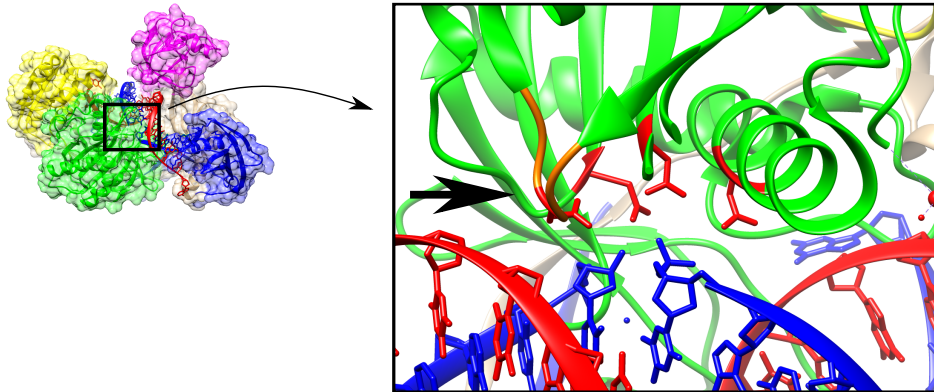
A) spaltungsincompetenter ternärer Komplex



B) spaltungskompetenter ternärer Komplex



C) ternärer Komplex mit gespaltenem *target*



**Abbildung 2.15.: Bewegung des Glutamatfingers am Beispiel von TtAgo.** Dargestellt sind Röntgenkristallstrukturen ternärer Komplexe im spaltungsincompetenten und spaltungskompetenten Zustand sowie ein Komplex mit gespaltenem *target* DNA. Ein Pfeil markiert jeweils die Position des Glutamatfingers. (A) Der spaltungsinkompetente Komplex wird repräsentiert durch einen ternären Komplex mit einer 12-mer *target* DNA (PDB 4N47). (B) Ein ternärer Komplex mit einer ungespaltenen 19-mer *target* DNA (PDB 4NCB) zeigt den spaltungskompetenten Zustand. (C) Ebenfalls ein ternärer Komplex mit einer 19-mer *target* DNA (PDB 4NCB), die jedoch in diesem Falle gespalten vorliegt, stellt die Position des Glutamatfingers nach Ablauf der Spaltreaktion vor Entlassen der Spaltprodukte dar.

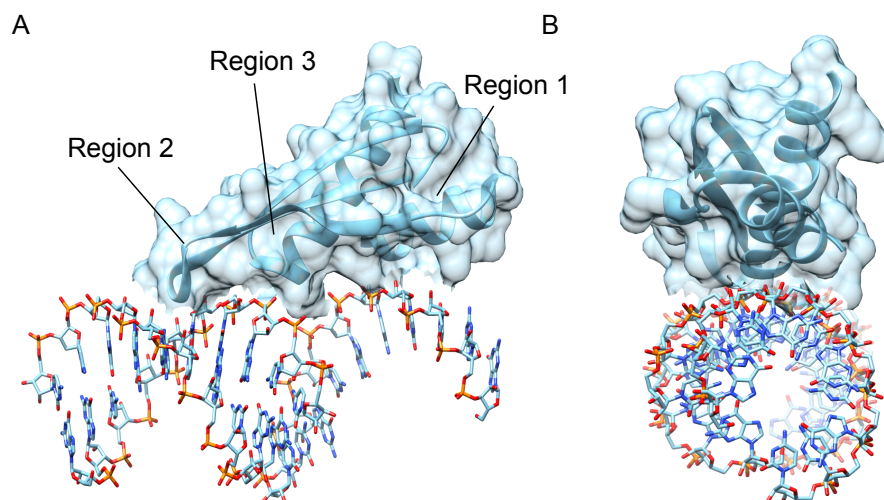
in zu erhalten. Im spaltungsincompetenten Ago Protein ist dieses Glutamat weit vom aktiven Zentrum entfernt. In der sogenannten „*plugged-in*“ Konformation jedoch, welche die Gruppe um D. Patel an Hand der vorhandenen ternären Strukturen des TtAgo<sup>(89,90)</sup> näher untersuchte, ist das Glutamat nahe dem 2'-OH des Nukleotids neben dem spaltbaren Phosphat und



direkt neben einem der divalenten Kationen des aktiven Zentrums positioniert<sup>(146)</sup>. Im Unterschied zu den prokaryotischen Strukturen ist in hAgo2 und KpAgo der Glutamatfinger bereits in den binären Komplexen in der „*plugged-in*“ Konformation. Im TtAgo ist der Glutamatfinger erst in der „*plugged-in*“ Position, wenn ein *target* gebunden und das 3'-Ende des *guide* von der PAZ Domäne freigesetzt wurde<sup>(59,111)</sup>. Die Bewegung des Glutamatfingers ist in Abbildung 2.15 gezeigt. Eine Überlagerung der aktiven Zentren der RNase H und des Ago Proteins mit dem Glutamatfinger in der „*plugged-in*“ Position zeigt, dass die aktiven Zentren nahezu isosterisch sind. Die Notwendigkeit zur Vervollständigung des aktiven Zentrums des Ago Proteins im Vergleich zur konstitutiv aktiven RNase H ist vermutlich damit zu erklären, dass die RNase H unspezifisch spaltet, während eine Spaltung durch Ago eine hohe Spezifität erfordert. Der Glutamatfinger könnte somit einen Kontrollmechanismus darstellen<sup>(146)</sup>.

## 2.5. Die dsRNA-bindenden Proteine

Zur Gruppe der dsRNA-bindenden Proteine wird eine Reihe von Proteinen gezählt, die ein gemeinsames Sequenzmotiv teilen. Dabei handelt es sich um die sogenannte dsRNA-bindende Domäne (dsRBD), die aus einer Konsensussequenz von 65 - 70 Aminosäuren besteht<sup>(178,179)</sup>. Die dsRNA-bindenden Proteine werden in einer Vielzahl von Organismen prokaryotischen und eukaryotischen Ursprungs gefunden<sup>(180–184)</sup>. Sogar in viralen Genomen sind sie kodiert<sup>(180)</sup>.



**Abbildung 2.16.:** Die zweite dsRBD von *Xenopus laevis* RNA-binding protein A (Xlrpba) gebunden an dsRNA. Seitenansicht (A) bzw. Frontalansicht (B) der an dsRNA gebundenen dsRBD-2 von Xlrpba. Die drei Bindungsregionen sind in (A) nach Ryter et al.<sup>(179)</sup> markiert. Abbildung modifiziert nach Tian et al.<sup>(185)</sup>.

Es gibt mindestens neun Familien dsRNA-bindender Proteine, die eine unterschiedliche Anzahl von dsRNA-bindenden Domänen besitzen<sup>(186)</sup>. Eukaryotische dsRNA-bindende Proteine können bis zu fünf dsRBDs enthalten, während vor allem viral kodierte Proteine nur eine dsRBD aufweisen<sup>(180)</sup>. Die dsRNA-bindenden Proteine sind an einer Vielzahl von verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt. Diese Vielfältigkeit wird ihnen dadurch ermöglicht, dass sie Sequenz-unabhängig an dsRNA binden können<sup>(178)</sup>. Die Spezifität, die für die verschie-

## 2. Einleitung

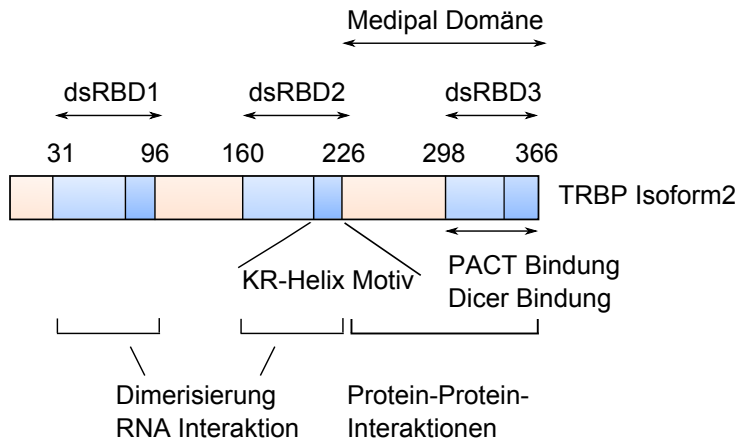
denartigen Aufgaben benötigt wird, wird vermutlich durch die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt<sup>(180)</sup>.

Schon früh wurde erkannt, dass sowohl strukturelle Eigenschaften als auch einzelne Reste an der Bindung von dsRNA beteiligt sind<sup>(178)</sup>. Mit ihrer konservierten  $\alpha - \beta - \beta - \alpha$ -Struktur binden die dsRBDs spezifisch dsRNA, die klar von dsDNA oder ssRNA unterschieden wird<sup>(179,183,187)</sup>. Die dsRBD kann dabei in drei bindende Regionen aufgeteilt werden (siehe Abbildung 2.16 A). Region 1 ist die N-terminale Helix  $\alpha_1$ , welche in der kleinen Furche der RNA-Helix bindet. Bei der zweiten Region handelt es sich um die Schleife zwischen  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , die mit einer weiteren kleinen Furche interagiert. Die dritte Region ist die Schleife zwischen  $\beta_3$  und  $\alpha_2$  und einem Teil der Helix  $\alpha_2$ , die mit der großen Furche wechselwirken. Dabei werden direkte Interaktionen mit den 2'-OH Gruppen in der kleinen Furche ausgebildet, was einen Beitrag zur Unterscheidung zwischen RNA und DNA leistet<sup>(179,181)</sup>. Ein weiterer Punkt, der zwischen RNA und DNA diskriminiert, ist der Abstand zwischen den kleinen Furchen der Nukleinsäure-Helix. DNA liegt üblicherweise in der B-Form vor und da der Abstand zwischen den verschiedenen Bindungsregionen der dsRBD mit den Distanzen zwischen den Furchen der A-Form Helix korrespondiert, wird die Bindung von RNA stark präferiert<sup>(181)</sup>. Die Bindung einer dsRBD an dsRNA überspannt 12-16 Basenpaare<sup>(179,181)</sup>. Sie erfolgt nur auf einer Seite der dsRNA Helix und lässt so auch auf einer kurzen dsRNA Raum für die Bindung mehrerer dsRBDs<sup>(185)</sup> (siehe Abbildung 2.16 B). Die Assoziation zwischen dsRBD und dsRNA ist dabei sehr dynamisch, so dass die Bindungsregionen flexibel mit unterschiedlichen 2'-OH Gruppen in der kleinen Furche interagieren können. Somit sind nur minimale Änderungen in der Struktur von Protein und dsRNA für die Bindung erforderlich<sup>(181)</sup>.

### 2.5.1. Das humane TRBP im Kontext der RNAi

Das humane TRBP (hTRBP) ist ein Mitglied der Familie der dsRNA-bindenden Proteine. Es besitzt drei dsRBDs, von denen allerdings nur die ersten beiden an dsRNA binden können. Diese beiden Domänen sind außerdem notwendig für die Homodimerisierung des Proteins<sup>(188,189)</sup>. Neben der Homodimerisierung sind die dsRBD1 und 2 auch wichtig für die Interaktion mit der PKR<sup>(190,191)</sup>. Die dritte dsRBD weist lediglich strukturelle Ähnlichkeiten mit den dsRBDs auf. Sie ist Teil der sogenannten Medipal Domäne und in Protein-Protein-Interaktionen mit Dicer und PACT involviert<sup>(188,189,191,192)</sup> (siehe Abbildung 2.17). Es gibt zwei Isoformen von hTRBP mit einer Größe von 40 bzw 43 kDa, die durch alternatives *splicing* entstehen<sup>(193-195)</sup>.

Zunächst wurde TRBP als Protein identifiziert, welches an die HIV TAR RNA bindet<sup>(196,197)</sup>. Dann wurde es als Inhibitor der PKR beschrieben<sup>(198,199)</sup> und erst sehr viel später als Komponente der RNAi entdeckt<sup>(49,200)</sup>. Bis heute wurden viele verschiedene Aufgaben von TRBP in der RNAi beschrieben, jedoch ist die genaue Funktion nach wie vor unklar. Eine wichtige Rolle spielt TRBP zum Beispiel in der Prozessierung von pre-miRNAs. Es konnte gezeigt werden, dass TRBP über die Medipal Domäne direkt mit Dicer interagieren kann<sup>(200)</sup>, wodurch es die Dicer-vermittelte Spaltung von pre-miRNAs moduliert. Der Komplex aus Dicer und TRBP wird dabei durch die Phosphorylierung von TRBP stabilisiert, was ein Regulator der miRNA Biogenese sein könnte<sup>(201)</sup>. Die Interaktion von TRBP mit Dicer kann sowohl zu einer Ver-



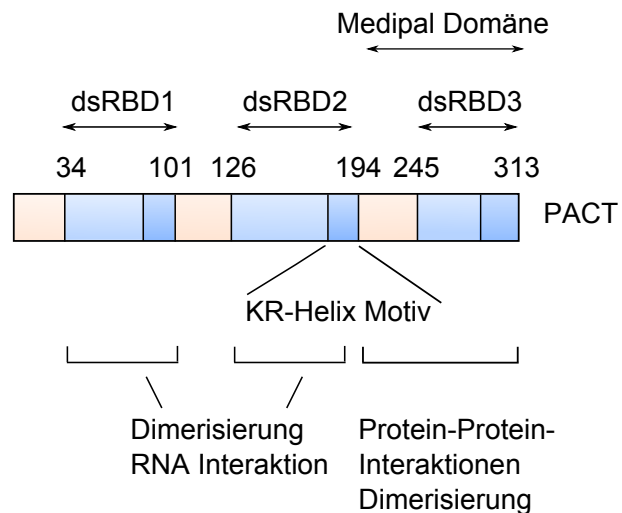
**Abbildung 2.17: Das humane TRBP.** Schematische Repräsentation der Domänenaufteilung von humanem TRBP Isoform 2. Die dsRBDs 1 und 2 binden dsRNA, während die dsRBD3 zwar eine schwache Homologie mit den ersten beiden dsRBDs aufweist, aber nicht an dsRNA binden kann. Abbildung modifiziert nach Daniels et al.<sup>(192)</sup>.

stärkung<sup>(202,203)</sup> als auch zu einer Abschwächung<sup>(204)</sup> der Prozessierung führen, was vermutlich mit der Struktur des dsRNA-Substrates zusammenhängt. Aber nicht nur die Effizienz der Spaltung durch Dicer kann durch TRBP beeinflusst werden. Es kann auch die Produktion von isomiRs induziert oder auch verstärkt werden<sup>(204)</sup>. IsomiRs sind unterschiedliche miRNAs, die infolge alternativer Spaltung durch Dicer aus derselben pre-miRNA generiert werden<sup>(205)</sup>.

Auch der konsequente Schritt der RNAi, nämlich die Beladung des Ago Proteins mit der matten miRNA oder siRNA, wird durch TRBP beeinflusst. Direkte Wechselwirkungen mit Ago und Dicer identifizierten TRBP als Teil des RLC<sup>(47-49)</sup>. Es wird vermutet, dass TRBP die Bildung des RISC vereinfacht, indem es den Transfer der miRNA bzw. siRNA von Dicer auf Ago (z. B. durch Rekrutierung von Ago2 zu Dicer-Komplexen) unterstützt<sup>(49,200,206)</sup>. Dabei könnte TRBP auch die Auswahl der *guide* RNA beeinflussen. R2D2, das TRBP Homolog in *D. melanogaster*, wurde als ein Sensor für die thermodynamische Asymmetrie im siRNA Duplex beschrieben<sup>(207)</sup>. Auch für hTRBP gibt es erste Erkenntnisse, die implizieren, dass es an der Auswahl der *guide* RNA beteiligt ist<sup>(53,54)</sup>. Es wird vermutet, dass es die Bindung des 3'-Endes der siRNA an die PAZ Domäne stabilisiert und so bei der korrekten Positionierung der siRNA assistiert<sup>(48,208)</sup>. Liu et al.<sup>(206)</sup> postulierten, dass TRBP eine funktionelle Verbindung zwischen Initiation und Exekution der RNAi darstellt. Ob es eine Rolle in der Spaltung von *target* RNAs spielt und somit auch einen Einfluss auf die Aktivität des Ago Proteins haben kann, ist bislang nicht erforscht.

### 2.5.2. Das humane PACT im Kontext der RNAi

Auch das humane PACT (hPACT) mit einer Größe von 35 kDa besitzt als Vertreter der dsRNA-bindenden Proteine drei dsRBDs. Analog zu hTRBP, zu dem hPACT eine hohe Sequenzhomologie aufweist, binden nur die dsRBD1 und 2 an dsRNA<sup>(209)</sup>. Neben der Interaktion mit dsRNA sind die beiden Domänen wichtig für die Homodimerisierung und die Heterodimerisierung mit TRBP und PKR<sup>(188,209)</sup>. Die dritte dsRBD weist ebenfalls lediglich strukturelle Ähnlichkeiten zu den anderen dsRBDs auf und ist wichtig für die Interaktion mit der PKR, als dessen Aktivator PACT zunächst identifiziert wurde (siehe Abbildung 2.18)<sup>(188,209-211)</sup>. Die Funktion von PACT als Bestandteil des RLC wurde erst 2006 erkannt<sup>(120,153)</sup>. Zusammen mit TRBP oder auch allein kann PACT mit Dicer assoziieren und somit ebenfalls die Prozessierung von Vorläufermolekülen der RNAi modulieren. Die Prozessierung kann entweder verstärkt<sup>(202,212)</sup> oder im Ge-



**Abbildung 2.18: Das humane PACT.** Schematische Repräsentation der Domänenaufteilung von PACT. Die ersten beiden dsRBDs binden an dsRNA, während die dritte dsRBD zwar eine schwache Homologie mit den ersten beiden dsRBDs aufweist, jedoch nicht an dsRNA binden kann. Abbildung modifiziert nach Laraki et al.<sup>(188)</sup>.

gensatz zu TRBP im Fall von pre-siRNA inhibiert werden<sup>(212)</sup>. Weiterhin konnte für PACT eine Rolle in der Selektion der *guide* RNA gezeigt werden<sup>(54)</sup>. Dabei kann PACT Dicer-unabhängig mit Ago wechselwirken. Mutationen der dsRBD3 von PACT, die die Interaktion von PACT mit Dicer verhindern, zeigen, dass PACT unabhängig von Dicer über seine ersten beiden dsRBDs mit Ago interagieren kann<sup>(153)</sup>.

Im Vergleich zu TRBP ist die Rolle von PACT in der RNAi bislang noch wenig erforscht. Es sieht aber so aus, als würden die beiden Proteine in ähnlichen Prozessen wie zum Beispiel der pre-miRNA Prozessierung wirken. Die Funktion von TRBP und PACT in der Kontrolle der PKR ist bereits wesentlich besser untersucht. Beide Proteine sind am selben Prozess beteiligt, die von ihnen vermittelten Effekte jedoch gegensätzlich. PACT führt zu einer Aktivierung, während TRBP eine inhibierende Wirkung hat. In der RNAi zeichnet sich dagegen ein wesentlich komplexeres Bild ab. Die Funktionen von PACT und TRBP sind vielfältiger und ihr Effekt auf einige Teilprozesse der RNAi ähnlich, während sich in anderen Fällen deutliche Unterschiede abzeichnen. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung des genauen Mechanismus der TRBP- und PACT-vermittelten Effekte, sowie die grundsätzliche Analyse ihres Einflusses auf die Ago2 abhängige *target* RNA Spaltung stehen noch aus.

## 2.6. Ziel und Motivation dieser Arbeit

Die Regulation der Genexpression ist sowohl für Prokaryoten als auch für Eukaryoten sehr bedeutsam. In Prokaryoten dient sie vor allem der Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen, während sie in Eukaryoten neben dieser Funktion vor allem essentiell für die Differenzierung von Zellen in einem multizellulären Organismus ist. Alle Zellen besitzen die gleiche genetische Information und so kann nur die kontrollierte Expression der Gene die Entstehung von verschiedenen Geweben und Organen steuern.

Die RNAi ist ein bedeutender Bestandteil der Genregulation. Nur ein winziger Teil unseres Genoms ist in der Lage, die Expression eines Drittels unserer Gene zu regulieren. Die durch RNAi regulierten Gene sind dabei in lebenswichtige Prozesse involviert, was bedeutet, dass eine hohe Präzision bzw. Spezifität erforderlich ist. Störungen in diesem System können zu



schweren Erkrankungen führen. Auf der anderen Seite bietet diese hoch spezifische Art der Genregulation viele Möglichkeiten, therapeutisch aktiv zu werden, indem beispielsweise die Expression von Genen verhindert wird, die krankheitsverursachend sind.

In ihren Grundzügen ist die RNAi bereits relativ gut verstanden, während die genauen Mechanismen zum Großteil noch im Dunkeln liegen. Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit ist es, die Funktion und Regulation der zentralen Komponente der RNAi, des humanen Ago2 Proteins, besser zu verstehen. Dazu wird in dieser Arbeit auf ein etabliertes Expressions- und Reinigungssystem für hAgo2 zurückgegriffen. Die Nutzung von rekombinanten Proteinen erlaubt es, die Funktion der einzelnen Proteine besser zu verstehen. Untersuchungen eines Proteins im Zellsystem und in immunopräzipitierten Präparationen involvieren auch immer weitere Proteine, die im Zellsystem vorhanden sind oder als Interaktionspartner co-präzipitiert werden. Nur rekombinant exprimierte und gereinigte Proteine erlauben die Untersuchungen eines Proteins unabhängig von anderen Proteinen.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Charakterisierung der Bindung und Spaltung von siRNA bzw. *target* RNA, um das in der Arbeit von Dr. A. Deerberg begonnene minimal mechanistische Modell der hAgo2-vermittelten Spaltung zu vervollständigen und zu erweitern. Dabei wird der Fokus auf den Einfluss verschiedener Sequenzen der *guide* RNA auf die Effizienz der Spaltung und die Determinierung der Spaltposition gerichtet. In diesem Kontext wird auch die Bedeutung des 5'-Endes des *guide* Stranges sowie der Einfluss der Länge des *target* Strangs untersucht. Diese Analysen werden unter anderem mit Hilfe von MjAgo durchgeführt. Obwohl MjAgo im Gegensatz zu hAgo2 DNA sowohl als *guide* als auch als *target* Substrat einsetzt, stellte sich im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit heraus, dass die Mechanismen der Nukleinsäurebindung und -spaltung sehr vergleichbar sind.

Auf Grund der Röntgenkristallstrukturen von hAgo2 können einige Aminosäuren identifiziert werden, die einen besonderen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins zu haben scheinen. Zum Einen handelt es sich dabei natürlich um die katalytische Tetrade von hAgo2, die essentiell für die Spaltung von RNAs ist. Daneben scheint das Isoleucin 365 eine große Rolle bei Erkennung und Bindung der *target* RNA zu spielen. Aber auch die Bindung von *guide* bzw. siRNAs ist eine Grundvoraussetzung für die Bildung von katalytisch aktiven Komplexen. *In silico* Experimente von Dr. M. Kalia konnten in diesem Kontext eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Aminosäuren der Mid Domäne und der L2 Region von hAgo2 identifizieren. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll die Bedeutung dieser sieben Aminosäuren mit Hilfe von Mutanten des hAgo2 Proteins und durch kinetische Analysen beleuchtet werden.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss akzessorischer Proteine der RNAi auf die Funktion von hAgo2. Dazu werden die beiden dsRNA-bindenden Proteine TRBP und PACT untersucht und ihr Effekt auf die hAgo2-vermittelte Bindung von siRNAs bzw. *target* RNAs sowie die Spaltung von *target* RNAs biochemisch charakterisiert. Um die Natur der durch TRBP und PACT vermittelten Effekte besser zu verstehen, werden verschiedene Mutanten des TRBP sowie des hAgo2 Proteins eingesetzt.



## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

Auflistung der Firmensitze der Materialhersteller: Abcam (Cambridge, UK); Amersham Pharmacia (Freiburg, D); Applied Biosystems (Freiburg, D); Applied Photophysics (Leatherhead, UK); Ascenion GmbH (München, D); Bandelin (Berlin, D); Braun Melsungen AG (Melsungen, D); Beckmann Coulter (Krefeld, D); Becton Dickinson (Heidelberg, D); Berthold (Bad Wildbad, D); Biomers (Ulm, D); Biometra (Göttingen, D); Biorad (München, D); Biotec-Fischer (Reiskirchen, D); Biosciences (St. Louis, USA); Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, D) Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, D); Brand (Wertheim, D); Canon (Krefeld, D); Eppendorf (Hamburg, D); Erithacus Software (Surrey, UK); Feather (Osaka, Japan); Fermentas (St. Leon-Rot, D); Finnzymes (Espoo, Fin); Fluka (Buchs, D); Forma Scientific (Marietta, USA); Fuji (Düsseldorf, D); GE Healthcare (München, D); Gerhardt (Königswinter, D); Gibco (Karlsruhe, D); Gilson (Bad Camberg, D); Greiner (Frickenhausen, D); H + P Labortechnik (Oberschließheim, D); Heidolph (Schwalbach, D); Hellma (Jena, D); Heraeus Instruments (Hanau, D); Hettich (Tuttlingen, D); Hirschmann (Eberstadt, D); Hofer (San Francisco, USA); Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, D); IBA Lifesciences (Göttingen, D); Infors (Bottmingen, CH); Invitrogen (Karlsruhe, D); Jahnke & Kunkel (Staufen, D); Jena Bioscience (Jena, D); Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, D); KnF Neuberger (Freiburg, D); Kodak (Rochester, USA); Life technologies (Darmstadt, D); LKB (Bromma, Schweden); Macherey & Nagel (Düren, D); Merck (Darmstadt, D); Micromath (St. Louis, USA); Millipore (Schwalbach, D); Miltenyi (Bergisch Gladbach, D); Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA); neoLab (Heidelberg, D); New Brunswick Scientific (Edison, USA); New England Biolabs (Ipswich, USA); Peqlab (Erlangen, D); Perkin-Elmer (Boston, USA); Phase (Lübeck, D); Promega (Mannheim, D); Qiagen (Hilden, D); Renner GmbH (Dannstadt, D); Roche (Basel, CH); Roth (Karlsruhe, D); Sarstedt (Nümbrecht, D); Sartorius (Göttingen, D); Savant (Midland, USA); ScalTec (Göttingen, D); Sci Ed Central (Cary, USA); Schleicher & Schüll (Dassel, D); Schott (Darmstadt, D); Scotsman (Vernon Hills, USA); Serva (Heidelberg, D); Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D); Sörk-Tronik (Medingen, D); Spectrum (Breda, NL); Systec (Wettenberg, D); Takara Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F); Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA); UCSF Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics (San Francisco, USA); Vilber Lourmat (Eberhardzell, D); Waters (Eschborn, D); Werner Hassa GmbH (Lübeck, D); Whatman (Dassel, D); Wyatt Technology (Santa Barbara, USA).

### 3.1.1. Geräte

Tabelle 3.1.: Geräte

Bezeichnung	Firma
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments
Dampfsterilisator Varioklav <sup>®</sup>	H + P Labortechnik
Dampfsterilisator Systec	Systec
Diagrammschreiber LKB Rec 102	GE Healthcare
DLS DynaPro MS/X	Wyatt Technology
Feinwaage ALJ 220-5 DNM	Kern & Sohn GmbH
Flockeneismaschine AF 100	Scotsman
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409	Perkin-Elmer
Fluoreszenzküvetten	Hellma
Fluoreszenzspektrometer FluoroMax <sup>®</sup> -3	Horiba Jobin Yvon
FPLC Advanced Protein Purification System 650E	Waters
Fraktionssammler GradiFrac	GE Healthcare
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	Forma Scientific
Geldokumentation Variocam	Phase
Gelkammer Agarosegele Sub-Cell <sup>®</sup> GT	Biorad
Gelkammer SDS-PAGE (10 cm x 10,5 cm)	Hofer
Gelkammer Sequenziergele Sequi-Gen <sup>®</sup> GT	Biorad
Geltrocknungsanlage 583	Biorad
Heizblock Techne DRI-Block <sup>®</sup> DB 2D	Werner Hassa GmbH
Kühlschrank 4 °C	Bosch
Küvetten Schleuder	neoLab
Laborzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Laborzentrifuge Microfuge <sup>®</sup> R	Beckman Coulter
Magnetrührer IKAMAG RCT	Jahnke & Kunkel
Mikrowelle	Bosch
Multiwellenlängendetektor 486	Waters
Netzgerät Electrophoresis Power Supply - EPS 600/3500	Amersham Pharmacia
Netzgerät Power Pac 300	Biorad
Netzgerät Power Pac HV	Biorad
PCR-Block UNO II	Biometra
Peristaltik-Pumpe Minipuls 3	Gilson
pH-Meter Lab 850	Schott
PhosphorImager Typhoon <sup>™</sup> 8600	Amersham Pharmacia
Pipette (1-10 µl)	Eppendorf
Pipette (20 - 100 µl)	Gilson

*fortgesetzt auf der folgenden Seite*

Tabelle 3.1 *fortgesetzt von der vorangegangenen Seite*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Pipette (50 - 200 µl)	Gilson
Pipette (100 - 1000 µl)	Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann
Reinstwassersystem	Millipore
Scanner CanoScan N670U	Canon
Schüttelinkubator HT	Infors
Spektralphotometer DU <sup>®</sup> 640	Beckmann Coulter
Spektrophotometer Nanodrop	Peqlab
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus Instruments
<i>Stopped flow SX20</i>	Applied Photophysics
<i>Storage Phosphor Screen</i>	Fuji
Thermomix 5436	Eppendorf
Quarzküvetten	Hellma
Ultraschallbad super RK510	Bandelin
Ultraschallhomogenisator Sonopuls UW/GM 70	Bandelin
Vakuum-Pumpe Laboport <sup>®</sup>	KnF Neuberger
Vakuum Zentrifuge Speed Vac <sup>®</sup> Plus SC100A	Savant
Vortexer Vibrofix VF1 Electronic	Jahnke & Kunkel
Waage SBA41	ScalTec
Waage 2354	Sartorius
Wasserbad W22	Sörk-Tronik
Zentrifuge Rotixa 120 R	Hettich
Zentrifuge Avanti <sup>™</sup> J-25	Beckmann Coulter
Zentrifugenbecher (50 ml, 500 ml)	Beckman Coulter

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2.: Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Dialyse-Schläuche Spectra/Por MWCO 12 - 14 kDa	Spectrum
Einmalinjektionskanülen	Braun Melsungen AG
Einmalküvetten (1,5 ml)	Brand
Filterpapier GB003	Whatman
Filtermembranen (0,2 µm, regenerierte Zellulose)	Whatman

*fortgesetzt auf der folgenden Seite*

### 3. Material und Methoden

Tabelle 3.2 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Filtermembranen (0,2 µm, Zellulosenitrat)	Whatman
Nick Säulen (Sephadex G-50)	GE Life Sciences
Kryo-Röhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Greiner
PCR-Röhrchen (8-er Strips, je 0,2 ml, DNase-/RNase-frei)	Biozym Scientific
Petrischalen (10 cm)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl)	Molecular Bioproducts
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Plastik-Einmalpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner
Skalpell	Feather
Spritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	Becton Dickinson
Sterilfilter für Spritzen (0,2 µm)	Sartorius
Szintillationsgefäße (3 ml)	Perkin-Elmer

#### 3.1.3. Säulen und Säulenmaterialien

Tabelle 3.3.: Säulen und Säulenmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Nick Säule Sephadex-G50 (Gelfiltrationssäule; Einmalnutzung)	GE Healthcare
Glutathion Sepharose High Performance	GE Healthcare
TALON Superflow	Takara Clontech
Superformance 50-10 Säule	Merck
XK 16/20 Säule	GE Healthcare

#### 3.1.4. Chemikalien

Tabelle 3.4.: Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1 v/v)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1 v/v)	Roth
Agar	Gibco

*fortgesetzt auf der folgenden Seite*

Tabelle 3.4 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
dNTPs	Jena Biosciences
Essigsäure	Roth
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Gibco
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ficoll® 400	Fluka
Formamid (entionisiert)	Sigma-Aldrich
Glutathion (reduziert)	Thermo Fisher Scientific
Glycerol (87 %)	Roth
Glycogen	Fermentas
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumacetat (KCH <sub>3</sub> COOH)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kanamycin	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Fluka
Methanol	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumacetat (NaCH <sub>3</sub> COOH)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth

fortgesetzt auf der folgenden Seite

### 3. Material und Methoden

Tabelle 3.4 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

Bezeichnung	Firma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Neomycin	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Merck
Sigmacote®	Sigma-Aldrich
Stains-All	Sigma-Aldrich
Sypro® Ruby	Life technologies
Szintillationslösung	Sigma-Aldrich
tRNA aus Hefe (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Xylencyanol (XC)	Sigma-Aldrich
$\alpha, \alpha, \alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris)	Roth

#### 3.1.5. Radiochemikalien

Tabelle 3.5.: Radiochemikalien

Bezeichnung	Firma
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (3000 Ci/mmol)	Perkin und Elmer

#### 3.1.6. Puffer und Lösungen

**Tabelle 3.6.: Puffer und Lösungen.** Für die Zubereitung der Puffer wurde Millipore Wasser verwendet. Die Puffer für Proteinreinigung, Bindungsmessungen und Spalttests wurden vor Gebrauch filtriert. Die Puffer für die Bindungsexperimente und die Proteinreinigung wurden zusätzlich entgast.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Ago Bindungspuffer für Proteinreinigung	50 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA, 10 mM DTT
Ago Bindungspuffer (10x)	100 mM Tris (pH 7,4), 1 M KCl
Ago Spaltspuffer (10x)	100 mM Tris (pH 7,4), 1 M KCl, 20 mM $\text{MgCl}_2$
Aufschlusspuffer (1x)	50 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA

*fortgesetzt auf der folgenden Seite*



Tabelle 3.6 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
CCMB80-Puffer	10 mM KOAc (pH 7,0), 80 mM CaCl <sub>2</sub> , 20 mM MnCl <sub>2</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 % Glycerin
Coomassie Färbelösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250
Coomassie Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure
Elektrophoresepuffer Agarosegele	1x TAE (pH 8,5)
Elektrophoresepuffer PAGE	1 x TBE (pH 8,3)
Elektrophoresepuffer SDS PAGE (10 x)	250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
Elutionspuffer hAgo2	50 mM Tris (pH 8,3), 20 mM Glutathion (pH nach Glutathion Zugabe nicht mehr justieren)
Elutionspuffer hTRBP/hPACT	20 mM Tris (pH 7,5), 200 mM Imidazol, 50 mM NaCl
Hybridisierungspuffer für siRNA (5x)	15 mM HEPES (pH 7,4), 50 mM KOAc, 1 mM MgOAc <sub>2</sub>
Ladepuffer (6x) für native PAGE und Agarosegele	25 % (w/v) Ficoll 400, 1x TAE, 0,1 % BPB, 0,05 % XC
Ladepuffer (6x) SDS PAGE	300 mM Tris-HCl (pH 6,8), 12 % (w/v) SDS, 60 % (w/v) Glycerin, 600 mM DTT, 0,06 % (w/v) BPB
Ladepuffer (2x) denaturierende PAGE	95 % Formamid (entionisiert), 0,025 % (w/v) SDS, 0,5 mM EDTA, 0,025 % (w/v) BPB, 0,025 % (w/v) XC
Lagerpuffer hTRBP/hPACT	20 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % (w/v) Glycerin
Lysispuffer für Proteinpräparation hAgo2	1x Aufschlusspuffer, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 10 mM DTT
Lysispuffer für Proteinpräparation hTRBP/hPACT	20 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM Imidazol, 5 mM β-Mercaptoethanol
Phosphatpuffer (10x)	720 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 170 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
RNase T1 Puffer	77 mM Tris (pH 7,5), 3 mM EDTA
Sammegel Puffer (8x)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Trenngel Puffer (4 x)	1.5 M Tris (pH 8,8)
TAE (50x)	2 M Tris-HCl (pH 8,5), 2 M Essigsäure, 50 mM EDTA

fortgesetzt auf der folgenden Seite

Tabelle 3.6 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
TBE (10x)	890 mM Tris, 890 mM Borat, 20 mM EDTA
TE (1x)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
TRBP Bindungspuffer (10x)	200 mM Tris (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 mM EDTA
TRBP Bindungspuffer für Proteinreinigung	20 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM Imidazol

### 3.1.7. Polyacrylamidgele

Im folgenden Abschnitt sind die in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gellösungen aufgelistet:

#### 8 %-iges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel

8% Rotiphorese® Gel40 (19 :1), 1xTBE

#### 8 %-iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel

8 % Rotiphorese® Gel40 (19 :1), 7 M Harnstoff, 1xTBE

#### 20 %-iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel

20 % Rotiphorese® Gel40 (19 :1), 7 M Harnstoff, 1xTBE

### 3.1.8. Enzyme

Tabelle 3.7.: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Firma
AflII	Fermentas
AgeI	Fermentas
BspHI	NEB
CIP (Calf Intestine Phosphatase)	NEB
DNaseI	NEB
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich
NdeI	NEB
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas
RNase T1	Fermentas

fortgesetzt auf der folgenden Seite

Tabelle 3.7 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
SacI	Fermentas
SpeI	NEB
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas
<i>Taq</i> Polymerase	NEB
XhoI	NEB

### 3.1.9. Kits und Größenmarker

Tabelle 3.8.: Verwendete Kits und Größenmarker.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Bradford Assay Kit	Biorad
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
Gene Ruler™ DNA Ladder 1 kb Plus	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder High Range	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Low Range	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Phusion High Fidelity Polymerase Kit	NEB
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System	Promega
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit	Promega

### 3.1.10. Nukleinsäuren

#### 3.1.10.1. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden PAGE-gereinigt von den Firmen IBA, MWG Eurofins oder Biomers bezogen.

**Tabelle 3.9.: Oligonukleotide.** Großbuchstaben symbolisieren DNA Nukleotide, während kleine Buchstaben RNA Nukleotide repräsentieren. \* Position der C6-gekoppelten 5/6-FAM Markierung.

Bezeichnung	Sequenz
<b>RNA</b>	
as2b	uag agg uac gug cug agg cTT
a-as2b	aag agg uac gug cug agg gTT
g-as2b	gag agg uac gug cug agg cTT
as2b <sup>FAM</sup>	uag agg uac gug cT*g agg cTT
as2b <sub>kurz</sub> <sup>FAM</sup>	uag agg uac gug*
s2b	gcc uca gca cgu acc ucu aTT
c-s2b	ccc uca gca cgu acc ucu uTT
s2b <sup>FAM</sup>	gcc uca gca cgu acc ucu aTT*
s2b <sub>seed-mm</sub>	gcc uca gca gcg gga aua uTT
s2b <sub>3'-mm</sub>	cug cgg ugc gau acc ucu aTT
let7	uga ggu agu agg uug uau agu
let7 <sup>FAM</sup>	uga ggu agu agg uug uaT* agu
let7 <i>target</i>	uau aca acc uac uac cuc gu
aslam	ugu ucu ucu gga agu cca gTT
aslam <sup>FAM</sup>	u*gu ucu ucu gga agu cca gTT
slam	cug gac uuc cag aag aac aTT
asGL3	ucg aag uac uca gcg uaa gTT
sGL3	cuu acg cug agu acu ucg aTT
asR206	uuu gua uuc agc cca uau cTT
sR206	gau aug ggc uga aua caa aTT
<b>DNA</b>	
D-T-as2b	TAG AGG TAC GTG CTG AGG CTT
D-G-as2b	GAG AGG TAC GTG CTG AGG CTT
D-T-as2b <sup>FAM</sup>	TAG AGG TAC GTG CT*G AGG CTT
D-G-as2b <sup>FAM</sup>	GAG AGG TAC GTG CT*G AGG CTT
D-s2b	GCC UCA GCA CGU ACC UCU ATT
D-T-let7	TGA GGT AGT AGG TTG TAT AGT
D-T-let7 <sup>FAM</sup>	TGA GGT AGT AGG TTG TAT* AGT
D-G-let7	GGA GGT AGT AGG TTG TAT AGT

*fortgesetzt auf der folgenden Seite*

Tabelle 3.9 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

Bezeichnung	Sequenz
D-G-let7 <sup>FAM</sup>	GGA GGT AGT AGG TTG TAT* AGT
D-let7 <i>target</i>	TAT ACA ACC TAC TAC CTC GT
D-let7 langes <i>target</i>	AGG TGA TAA GAC TAT ACA ACC TAC TAC CTC GTA ATG TCC GT

### 3.1.10.2. Primer

Alle Primer wurden HPLC-gereinigt von Biomers bezogen.

Tabelle 3.10.: Primer.

Bezeichnung	Sequenz
<b>Primer</b>	
<b>hAgo2/hAgo2 Mutanten</b>	
hAgo2-fwd AfIII	TGA CTA GCT TAA GAT GTA CTC GGG AGC CGG CC
hAgo2-rev Agel Stopp	TCA GTC AAC CGG TTC AAG CAA AGT ACA TGG TGC GCA GAG
hAgo2-D597A	GGG AGC AGC CGT CAC TCA CCC
hAgo2-E637A	ACC GGC AGG CGA TCA TAC AAG
hAgo2-I365A	GTT GCT CTG GCC ATG GTT GAG
hAgo2-D358A	GGT CTG ATT GGC CGT TAA TTT T
hAgo2-Y529A	GAC GCC CGT GGC CGC CGA GGT C
hAgo2-K533A	CGC CGA GGT CGC GCG CGT GGG AG
hAgo2-Q545A	GAT GGC CAC GGC GTG CGT GCA G
hAgo2-Adapter SacI rev	GGA TGA GGA GCT CGC GGA CC
hAgo2-Adapter BspHI	GTG GTC ATG AGG CAC TTG CC
<b>Primer</b>	
<b>hTRBP/hTRBP Mutanten</b>	
hTRBP- fwd NdeI	TAT ACA GCA TAT GAT GAG TGA AGA GGA GCA AGG CTC C
hTRBP-rev XhoI	TAT AGG TCT CGA GCT TGC TGC CTG CCA TGA TCT TG
hTRBP-ChiPri1	GAC ATC TCA ACA CGG CAG CAG GCA GGG

fortgesetzt auf der folgenden Seite

Tabelle 3.10 – fortgesetzt von der vorangegangenen Seite

Bezeichnung	Sequenz
hTRBP-ChiPri2	TGA GAT GTC CCG CCG TGC CCT GCA GTA
hTRBP-FLM1-M1	ATT AGG CTG GGC GGC TTG GC
hTRBP-FLM1-M2	TGG CTG CCG CCT TGC TG
hTRBP-FLM1-M2A	CCT TGT GCG CGG CTG C
hTRBP-FLM2-M1	CTT TGC GGG CGG CTG GCC C
hTRBP-FLM2-M2	CCG CGC TGC CAA TTT TGC GGA AG
hTRBP-ChiPri1	AGC ACC AAC GGT CTT GCC TGG GTT GG
hTRBP-ChiPri2	GGC AAG ACC GTT GGT GCT CTG CAG GAG

### 3.1.10.3. Plasmide

Im folgenden Abschnitt werden sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet:

#### **pET41b(+)-TEVThroligo-GST-hAgo2**

**Quelle:** Dr. A. Deerberg (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck), Vektor pET41b+ (Merck)

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, modifizierte *MCS*, kodiert für hAgo2 mit einem GST *tag* und Spaltstelle für eine TEV Protease am N-Terminus

#### **pIRESneo-Flag/HA-hAgo2-PAZ9**

**Quelle:** Dr. Sven Diederichs, (DKFZ, Heidelberg), Vektor pIRESneo (Takara Clontech)

**Kennzeichen:** Ampicillin-Resistenz, kodiert für hAgo2 mit verschiedenen Punktmutationen in der PAZ Domäne (R277A, K278A, Y279A, F294A, Y311A, F312G, T337A, Y338A, L339A)

#### **pET41b(+)-TEVThroligo-GST-hAgo2-PAZ9**

**Quelle:** im Rahmen dieser Arbeit generiert

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, modifizierte *MCS*, kodiert für hAgo2 mit verschiedenen Punktmutationen in der PAZ Domäne (R277A, K278A, Y279A, F294A, Y311A, F312G, T337A, Y338A, L339A)

#### **pET41b(+)-TEVThroligo-GST-hAgo2-Mid3**

**Quelle:** im Rahmen dieser Arbeit generiert

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, modifizierte *MCS*, kodiert für hAgo2 mit verschiedenen Punktmutationen in der Mid Domäne (Y529A, K533A, Q545A)

#### **pCLIP-hAgo2-D669A**

**Quelle:** Dr. A. Mescalchin (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck), Vektor pCLIPf (NEB)

**Kennzeichen:** Ampicillin-Resistenz, kodiert für hAgo2 mit der Mutation D669A

#### **pET41b(+)-TEVThroligo-GST-hAgo2-XY**

**Quelle:** im Rahmen dieser Arbeit generiert

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, modifizierte *MCS*, kodiert für hAgo2 mit verschiedenen Punktmutationen, die jeweils statt XY an den Namen angehängt werden (I365A, K525A, D358A, D669A, E637A, E637A-D669A, D597A, D597A-E637A-D669A)

#### **pET41b(+)-hTRBP**

**Quelle:** Dr. R. Kretschmer Kazemi-Far (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck)

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, kodiert für hTRBP (Isoform 1) mit einem C-terminalen His *tag*

#### **pET41b(+)-hTRBP-D12**

**Quelle:** im Rahmen dieser Arbeit generiert

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, kodiert für hTRBP mit einem C-terminalen His *tag*, dem die dsRBD3 fehlt. Punktmutationen außerhalb der dsRBDs: G9C, A351M, A352S

#### **pET41b(+)-hTRBP-D23**

**Quelle:** im Rahmen dieser Arbeit generiert

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, kodiert für hTRBP mit einem C-terminalen His *tag*, dem die dsRBD1 fehlt.

#### **pET41b(+)-hPACT**

**Quelle:** Dr. R. Kretschmer Kazemi-Far (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck)

**Kennzeichen:** Kanamycin-Resistenz, kodiert für hPACT mit einem C-terminalen His *tag*

#### **pG-si2b (+)**

**Quelle:** C. Geist (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck), Vektor pGEM-T (Promega)

**Kennzeichen:** Ampicillin-Resistenz, kodiert für den Teil des ICAM-1 Gens, der eine *target* Sequenz für as2b enthält.

**pUC-GL3TS**

**Quelle:** C. Geist (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck), Vektor pUC19 (NEB)

**Kennzeichen:** Ampicillin-Resistenz, kodiert für den Teil des GL3 Gens, der eine *target* Sequenz für asR206 und asGL3 enthält.

**pCRII-Topo-ICAM1**

**Quelle:** Dr. R. Kretschmer Kazemi-Far (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck)  
Vektor pCRII (Life technologies)

**Kennzeichen:** Ampicillin-Resistenz, kodiert für ICAM-1-IVT *reverse* mit einem C-terminalen His *tag*

**3.1.10.4. In vitro Transkripte**

**Tabelle 3.11.: Primer.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>template Plasmid</b>
ICAM-1-IVT	ggg cga auu ggg ccc gac guc gca ugc ucc cgg ccg cca ugg ccg cgg gau uag ccg cag uca uaa ugg gca cug cag gcc uca gca cg acc ucu aua acc gcc agc gga aga uca aga aa uaaa uca cua gug cgg cc	pGEM-si2b(+)
ICAM-1-IVT <i>reverse</i>	ggg cga auu ggg ccc ucu aga ugc aug cuc gag cgg ccg cca gug uga ugg aua ucu gca gaa uuc gcc cuu uau uuc uug auc uuc cgc ugg cgg uua uag agg uac gug cug agg ccu gca gug ccc auu aug acu gcg gcu aag ggc gaa uuc cag cac acu ggc ggc cg uac uag ugg auc cga gcu	pCRII-Topo-ICAM1
GL3-IVT	ggg cga ggc uau gaa gag aua cgc ccu ggu ggu ucc ugg aac aat ugc uuu uac aga ugc aca uau cga ggu gga cau cac uua cgc uuga gua cuu cga aa u gtc cgu ugc guu ggc aga agc uau gaa aa u aug ggc uga a u caa auc aaa gcu	pUC-GL3TS



### 3.1.11. Bakterienkultur

#### 3.1.11.1. Kulturmedien

**Tabelle 3.12.: Kulturmedien für Bakterien.** Für die Zubereitung der Medien wurde Millipore Wasser verwendet. Die Puffer wurden vor Gebrauch für 20 min bei 120 °C autoklaviert. \* = wird direkt vor Gebrauch frisch zugesetzt.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
LB-Medium (1x, pH 7,4)	0,5 % Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl
SOB-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub>
SOC-Medium (1x)	SOB Medium, 20 mM Glukose
TFB-Medium (1x pH 7,4)	0,4 % (w/v) Glycerin, 2,4 % Hefeextrakt, 1,2 % (w/v) Trypton, 1x Phosphatpuffer*

#### 3.1.11.2. Bakterienstämme

**Tabelle 3.13.: Bakterienstämme.**

Bezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup>

### 3.1.12. Computerprogramme

**Tabelle 3.14.: Verwendete Computerprogramme.**

Bezeichnung	Firma
Chimera 1.9	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics

fortgesetzt auf der folgenden Seite

### 3. Material und Methoden

Tabelle 3.14 – *fortgesetzt von der vorangegangenen Seite*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Clone Manager 7.04	SciEd Central
DataMax 2.20	Horiba Jobin Yvon
DynaPro Dynamics 6.7.3	Wyatt Technology
GATC Viewer	GATC
GraFit 5.0.6	Erithacus Software
Image Quant 5.2	Molecular Dynamics
ProData SX 2.0.3	AppliedPhotophysics
ProData Viewer 4.0.17	AppliedPhotophysics
Scientist	Micromath
Swiss PDB Viewer v4.0.1	Swiss Institute of Bioinformatics

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* Lysaten

#### 3.2.1.1. Mini-Präparation

Um Plasmid DNA aus *E. coli* zu gewinnen, wurde zunächst mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie des entsprechenden Stamms von einer Agarplatte gepickt. Diese Kolonie wurde in 5 ml LB Medium, welches zur Selektion ein Antibiotikum enthielt, über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Lyse der Bakterienzellen und die anschließende Präparation von Plasmid DNA wurde mit Hilfe des GeneElute Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 3.2.13.1 beschrieben mit Hilfe des NanoDrop 2000. Die Identität des Plasmids wurde mittels PCR (siehe Abschnitt 3.2.2.1) oder Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 3.2.6) überprüft.

#### 3.2.1.2. Maxi-Präparation

Um Plasmid in einem größeren Maßstab zu gewinnen, wurde die sogenannte Maxi-Präparation durchgeführt. Dazu wurde eine Kolonie mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von einer entsprechenden Agarplatte gepickt und in 5 ml LB-Medium überführt, welches ein Antibiotikum zur Selektion der Plasmid-haltigen Bakterien enthält. Diese Vorkultur wurde über etwa 7 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 500 µl dieser Vorkultur wurden eingesetzt, um die Hauptkultur zu inokulieren. Diese bestand aus 300 ml LB-Medium und einem adäquaten Selektionsantibiotikum und wird für 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterienlyse sowie die anschließende Präparation der Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Prep Kit nach Angaben des Herstellers. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 3.2.13.1 beschrieben mit Hilfe des NanoDrop 2000. Die Identität des Plasmids wurde mittels PCR (siehe Abschnitt 3.2.2.1) oder Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 3.2.6) überprüft.

### 3.2.2. PCR

#### 3.2.2.1. Standard PCR

Die Standard PCR mit der Taq Polymerase wurde verwendet, um das Vorhandensein eines Inserts in Plasmiden nachzuweisen. Dazu wurden Primer (siehe Tabelle 3.1.10.4) verwendet, die sich *upstream* und *downstream* der zu untersuchenden Sequenz befinden. Es wurde überprüft, ob ein Fragment der gewünschten Länge gebildet wird. Für diese

**Tabelle 3.15.: Komponenten für die PCR. 50 µl Ansatz.**

Komponente	Konzentration
<i>template</i> Plasmid	10 ng
<i>forward</i> Primer	200 nM
<i>reverse</i> Primer	200 nM
dNTPs	je 200 µM
Standard Taq Puffer	1x
Taq Polymerase	1,25 u

**Tabelle 3.16.: PCR Programm für die Standard PCR.**

	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	
Initiale Denaturierung	30 s	95°C	
Denaturierung	30 s	95°C	
Annealing	30 s	Primer abhängige Temperatur	
Extension	1 min 30 s	68°C	30 Zyklen
Finale Extension	10 min	68°C	

**Tabelle 3.17.: Komponenten für die PCR zur Amplifikation der ligierten Fragmente.** Ligierte Fragmente der *site-directed mutagenesis* PCR (siehe Abschnitt 3.2.7) wurden in diesem 50 µl Ansatz amplifiziert.

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
ligiertes Plasmid	10 µl
<i>forward</i> Primer	25 pmol
<i>reverse</i> Primer	25 pmol
dNTPs	je 10 nMol
GC Phusion Puffer	1x
Phusion Polymerase	1 u
DMSO (100 %)	1,5 µl

PCR wurde die Taq Polymerase eingesetzt, welche keinerlei *proofreading* Aktivität aufweist. Da die Standard PCR für den Nachweis der Länge eines Sequenzabschnittes verwendet wurde, ist die damit verbundene erhöhte Fehlerrate hinnehmbar. Die Proben wurden nach der PCR über ein Agarosegel (siehe Abschnitt 3.2.3.1) aufgetrennt, mittels Ethidiumbromid (siehe Abschnitt 3.2.4.3) visualisiert und auf das Vorhandensein der erwarteten Fragmentgröße überprüft. Die für die Standard PCR verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 3.15 und 3.16 dargestellt. Sollten dagegen die mit Hilfe von *site-directed mutagenesis* PCR (siehe Abschnitt 3.2.2.2) hergestellten ligierten Fragmente (siehe Abschnitt 3.2.7) vervielfältigt werden, wurde die Phusion Polymerase eingesetzt, da diese Fragmente für die Klonierung weiterverwendet wurden und somit eine hohe Genauigkeit der Polymerase erforderlich ist. Die Fehlerrate wird durch die 3'-5' *proofreading* Aktivität der Polymerase signifikant erniedrigt. Weiterhin ist das Enzym mit einer Domäne fusioniert, welche die Prozessivität der Polymerase erhöht und somit zu wesentlich besseren Ausbeuten führt. Die hierbei verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 3.17 und 3.18 dargestellt.

**Tabelle 3.18.: PCR Programm für die Standard PCR mit der Phusion Polymerase.**

	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	
Initiale Denaturierung	3 min	98°C	
Denaturierung	10 s	98°C	
Annealing & Extension	2 min 30 s	72°C	25 Zyklen
Finale Extension	7,5 min	72°C	

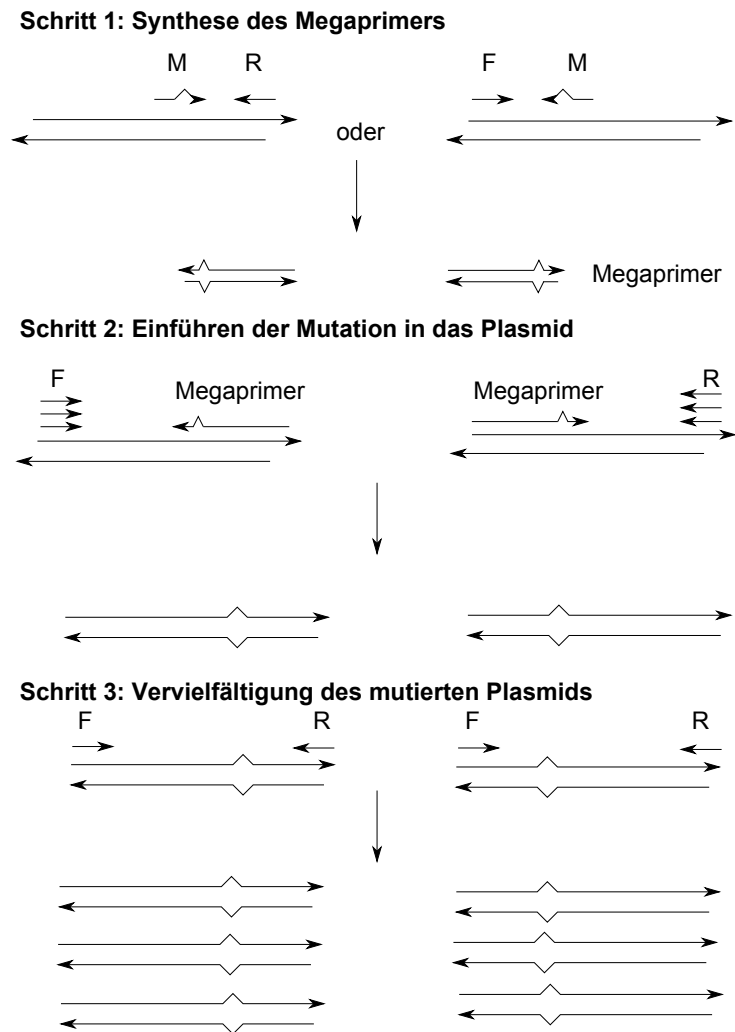
### 3.2.2.2. Site-directed mutagenesis PCR

Um einzelne Aminosäuren eines Proteins auszutauschen, wurde die sogenannte *site-directed mutagenesis* PCR durchgeführt. Das verwendete Protokoll wurde nach Picard et al. modifiziert<sup>(213)</sup>. Zur Vermeidung unerwünschter Mutationen wurde die Phusion Polymerase (siehe Tabelle 3.1.8) verwendet, die eine sehr hohe Genauigkeit bietet.

Die PCR zum Einfügen von Mutationen erfolgte in drei Schritten. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 3.1 zu finden. Im ersten Schritt wurden die sogenannten Megaprimer synthetisiert. Die besten Resultate wurden von Picard et al. dabei erzielt, wenn sie Megaprimer mit einer maximalen Länge von 400 Basenpaaren verwendeten<sup>(213)</sup>. Dies wurde bei der Auswahl der Primer beachtet: Je nachdem in welcher Stelle der Sequenz die Mutation eingefügt werden sollte, wurde nach den Gesichtspunkten der Megaprimer

Länge entschieden, ob der Mutagenese Primer mit dem *forward* oder *reverse* Primer kombiniert wurde. In manchen Fällen war es notwendig einen Adapterprimer zu verwenden, um die Megaprimer Länge zu beschränken. Die Adapterprimer wurden an einer Stelle in der gewünschten Sequenz positioniert, die eine Restriktionsschnittstelle enthält, sodass über Restriktion (siehe Abschnitt 3.2.6) und Ligation (siehe Abschnitt 3.2.7) die komplette Sequenz erhalten werden konnte. Es wurde das in Tabelle 3.20 beschriebene Programm durchgeführt.

Im zweiten Schritt wurde mittels Megaprimer und dem noch nicht verwendeten *forward* bzw. *reverse* Primer das Produkt mit der neu inserierten Mutation in voller Länge synthetisiert. Nach Zugabe von *forward* bzw. *reverse* Primer wurde erneut das in Tabelle 3.20 beschriebene Programm durchgeführt.



**Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung der site-directed mutagenesis PCR Methode.** F = forward Primer, R = reverse Primer, M = Mutagenese Primer

**Tabelle 3.19.: Komponenten für die *site-directed mutagenesis* PCR.** Die PCR wird in einem 90 µl Ansatz gestartet. Durch die schrittweise Zugabe von *forward* bzw. *reverse* Primer nach den ersten (+) und zweiten (\*) 12 Zyklen wird ein Endvolumen von 100 µl erreicht.

Komponente	Menge
<i>template</i> Plasmid	20 ng
Mutagenese Primer	10 pmol
<i>reverse</i> oder <i>forward</i> Primer	10 pmol
dNTPs	je 10 nMol
GC Phusion Puffer	1x
DMSO (100 %)	3 µl
Phusion Polymerase	2 u
+ <i>forward</i> bzw. <i>reverse</i> Primer	50 pmol
* <i>reverse</i> bzw. <i>forward</i> Primer	50 pmol

Durch Zugabe des für die Megaprimer-Synthese verwendeten *reverse* bzw. *forward* Primers wurde das mutierte Produkt mit Hilfe des in Tabelle 3.20 beschriebenen Programms schließlich vervielfältigt.

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten PCR Komponenten und deren Konzentrationen sind in Tabelle 3.19 zusammengefasst. Der Mutagenese Primer wurde so gewählt, dass er an seinem 3'-Ende möglichst GC reich war. Außerdem wurden maximal 2 Basen zur gleichen Zeit ausgetauscht. Die zu mutierende Position liegt dabei in der Mitte des Primers. Die voll komplementären Überhänge betragen mindestens 9 Basen. Dementsprechend sind die Mutagenese Primer relativ lang und weisen eine hohe Schmelztemperatur auf. Aus diesem Grund wurde die maximal mögliche Annealing Temperatur von 72 °C gewählt und eine 2-Schritt PCR durchgeführt, in der Annealing und Extension zusammengefasst werden (siehe Tabelle 3.20).

**Tabelle 3.20.: PCR Programm für die *site-directed mutagenesis* PCR.**

	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung	3 min	98 °C	
Denaturierung	30 s	98 °C	
Annealing/Extension	1 min 30 s	72 °C	12 Zyklen
Finale Extension	7 min 30 s	72 °C	

### 3.2.2.3. *Overlap extension* PCR

Die *overlap extension* PCR wurde verwendet, um einen Teil der Proteinsequenz zu deletieren. Das verwendete Protokoll wurde nach Lee et al. modifiziert<sup>(214)</sup> und ebenso wie im Fall der *site-directed mutagenesis* PCR wurde die Phusion Polymerase eingesetzt (siehe Abschnitt 3.2.2.2).

Dazu wurden 27 nt lange Primer verwendet, die aus einer 18 nt *annealing* Sequenz und einer 9 nt Ankersequenz bestanden. Die Ankersequenz ist dabei komplementär zu der Region, die die neue Nachbarsequenz darstellen soll. Die PCR wird in zwei Schritten durchgeführt.

**Tabelle 3.21.: Komponenten für den ersten Schritt der *overlap extension* PCR.** Es wurde ein 50 µl Ansatz verwendet.

Komponente	Konzentration
<i>template</i> Plasmid	0,2 ng/µl
<i>forward</i> Primer bzw. Chimärer <i>forward</i> Primer	500 nM
Chimärer <i>reverse</i> Primer bzw. <i>reverse</i> Primer	500 nM
dNTPs	200 µM
HF Phusion Puffer	1x
Phusion Polymerase	1 u/50 µl

**Tabelle 3.22.: PCR Programm für den ersten Schritt der *overlap extension* PCR.**

	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung	30 s	98 °C	
Denaturierung	10 s	98 °C	
Annealing/Extension	30 s	72 °C	30 Zyklen
Finale Extension	10 min	72 °C	

Zunächst werden in einem ersten Schritt in zwei unabhängigen PCRs die zwei Sequenzen, die zusammengefügt werden sollen, amplifiziert. Die zu deletierende Region wird dabei ausgespart.

**Tabelle 3.23.: Komponenten für den zweiten Schritt der *overlap extension* PCR.** Es wurde ein 50 µl Ansatz verwendet.

Komponente	Konzentration
gereinigte Fragmente	je 1 ng/µl
<i>forward</i> Primer bzw. Chimärer <i>forward</i> Primer	500 nM
Chimärer <i>reverse</i> Primer bzw. <i>reverse</i> Primer	500 nM
dNTPs	je 200 µM
HF Phusion Puffer	1x
Phusion Polymerase	1 u/50 µl

**Tabelle 3.24.: PCR Programm für den zweiten Schritt der *overlap extension* PCR.**

	Zeit	Temperatur	
Annealing ohne Polymerase und Primer	8 min	55 °C	
Zugabe von Polymerase und Primern			
Initiale Denaturierung	3 min	98 °C	
Denaturierung	10 s	98 °C	
Annealing/Extension	45 s	72 °C	30 Zyklen
Finale Extension	10 min	72 °C	

Dann erfolgt ein *annealing* Schritt. In diesem Schritt werden die beiden unabhängig amplifizierte Sequenzen mit Hilfe der angefügten Ankersequenzen zusammengefügt. Über eine weitere PCR wird dann diese neu zusammengefügte *template* Sequenz amplifiziert. Die verwendeten Parameter sind in den Tabellen 3.21, 3.22, 3.23 und 3.24 zusammengefasst.

### 3.2.3. Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um DNA Fragmente aufzutrennen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE (siehe Tabelle 3.1.6) und als Ladepuffer 1x DNA Ladepuffer (siehe Tabelle 3.1.6) verwendet. Für die nach dem Gellauf erforderliche Detektion wurden die Gele wie unter Abschnitt 3.2.4.3 beschrieben mit Ethidiumbromid versetzt. Als Nachweis für die Bandengröße wurden in Abhängigkeit von der Fragmentgröße passende DNA Marker ausgewählt (siehe Tabelle 3.1.9)

Die Prozentigkeit des Gels wurde mit 1x TAE abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA eingestellt. Für Fragmente über 1000 Bp wurde ein 0,5 %-iges Gel gewählt, für Fragmente zwischen 500 - 1000 Bp ein 1 %-iges Gel, zwischen 200 und 500 Bp ein 1,5 %-iges Gel und für alle Fragmente, die kleiner als 200 Bp waren, wurden 3 %-ige Gele hergestellt.

Es wurde eine horizontale Gelkammer verwendet und die Spannung auf 10 V/cm eingestellt. Der Gellauf dauerte je nach Größe der Fragmente und erforderlicher Auftrennung 60 - 120 min. Die Detektion erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.4.3 beschrieben. Im Fall einer präparativen Elektrophorese wurden die Banden ausgeschnitten und wie unter Abschnitt 3.2.5 beschrieben aufgereinigt.

#### 3.2.3.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde vor allem zur Auftrennung von kürzeren Nukleinsäuren eingesetzt. Als Laufpuffer wurde für dieses Gelsystem 1 x TBE (siehe Tabelle 3.1.6) eingesetzt, welches auch zur Herstellung der Polyacrylamid-Gellösungen verwendet wurde. Die Polyacrylamid-Gellösungen wurden vor Gebrauch mit Hilfe eines 0,2 µm Filters filtriert und anschließend im Ultraschallbad für etwa 20 min entgast.

Auch die Prozentigkeit der Acrylamid/Bisacrylamid-Gellösung (Vernetzungsgrad 19:1) wurde in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren ausgewählt. Für Nukleinsäuren < 20 Bp wurden 20 %-ige Gele verwendet, für Nukleinsäuren von 20 bis 150 Bp wurden 15 %-ige Gele benutzt und Nukleinsäuren zwischen 50 und 400 Bp wurden über 8 %-ige Gele aufgetrennt. Sollte die PAGE unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, wurde die Gellösung mit 7 M Harnstoff versetzt. Nicht-denaturierende PAGE wurde nur für die Analyse von doppelsträngigen Nukleinsäuren eingesetzt. Die Polymerisation wurde durch 0,1 % (w/v) APS und 0,1 % (v/v) TEMED induziert.

Zum Laden auf die Gele wurden die Proben mit einem adäquaten Ladepuffer versetzt (siehe Tabelle 3.1.6). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem vertikalen System bei 0,7 mA/cm für 2 - 4 h im Fall der nicht-denaturierenden PAGE. Im Gegensatz zur PAGE unter



denaturierenden Bedingungen wurde sie bei 4°C durchgeführt. Für die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte PAGE wurde das Gel durch Vorlauf vor Probenauftrag auf 50°C vorgewärmt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann ebenfalls bei 0,7 mA/cm für etwa eine Stunde. Für eine Auftrennung mit Hilfe von denaturierender PAGE, die die Unterscheidung zwischen Nukleinsäuren ermöglicht, die sich nur um ein Nukleotid in der Länge unterscheiden, wurden die sogenannten Sequenziergele verwendet. Als Marker zur Identifikation der Bandengrößen in Proben aus dem Standard Spalttest wurden mit RNase T1 verdaute radioaktiv markierte Nukleinsäuren eingesetzt (siehe Abschnitt 3.2.21). Auch in diesem System wurden die Gele vor Probenauftrag auf 50°C vorgewärmt. Die verwendete Sequenziergelapparatur ermöglichte Gelgrößen von 20 cm x 40 cm x 4 mm. Die Platte für diese sehr dünnen Gele wurden vor dem Präparieren der Gele mit einem Silan (Sigmacote®) beschichtet, um eine Beschädigungs-freie Ablösung der Gele nach Gellauf zu ermöglichen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 50°C und 70 W. Die Dauer wurde abhängig von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren gewählt (50 - 150 nt = 1 h; 1 - 40 nt = 2 h). Für beide Systeme der denaturierenden PAGE ist es notwendig die Taschen der Gele vor dem Probenauftrag gut zu spülen, um den Harnstoff zu entfernen, der den Probenauftrag behindert. Die Polyacrylamid-Gele wurde entweder mit Hilfe von Stains-All (siehe Abschnitt 3.2.4.2) angefärbt, oder, wenn die Nukleinsäuren radioaktiv markiert vorlagen, über Autoradiographie (siehe Abschnitt 3.2.4.1) detektiert.

### 3.2.4. Detektion von Nukleinsäuren nach der Gelelektrophorese

#### 3.2.4.1. Autoradiographie

Das Verfahren der Autoradiographie wurde verwendet, um Banden radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamid-Gelen sichtbar zu machen. Autoradiographie bezeichnet dabei die Visualisierung einer chemischen Komponente durch die Einwirkung radioaktiver Strahlung.

In dieser Arbeit wurden Polyacrylamid-Gele, mit denen <sup>32</sup>P-markierte Nukleinsäuren aufgetrennt wurden, auf einen *storage phosphor screen* aufgelegt. Die Expositionszeit variierte dabei abhängig von der aufgetragenen Menge an Radioaktivität.

Der *storage phosphor screen* besteht aus einer Photo-stimulierbaren Schicht, die gleichmäßig mit Spuren des divalenten Kations Europium bedeckt ist. Trifft nun radioaktive Strahlung auf den *storage phosphor screen*, verlieren die divalenten Kationen ein weiteres Elektron, das nun stabil im Kristallgitter der Photo-stimulierbaren Schicht gebunden wird. Wird nun der *storage phosphor screen* mit Hilfe des PhosphorImager Typhoon™ 8600 ausgelesen, erfolgt ein Abtasten durch einen Laser. Die Anregung der Photo-stimulierbaren Schicht führt zu einer Freisetzung dieser Elektronen. Treffen diese nun auf die trivalenten Europium Kationen, kommt es zur Freisetzung von Lumineszenz. Diese kann mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert und in ein digitales Bild des Polyacrylamid-Gels umgewandelt werden, welches dann mit Hilfe des Programms Image Quant 5.2 quantitativ ausgewertet werden kann.

### 3.2.4.2. Färbung mit Stains-All

Unmarkierte Nucleinsäuren wurden in Polyacrylamid-Gelen mit Hilfe von Stains-All visualisiert. Dieser Farbstoff färbt DNA (blau), RNA (violett), Proteine (rot) und auch Polysaccharide (verschieden, violett bis blau). Da diese Farben Bromphenolblau und Xylencyanol sehr ähneln, wurden die Nucleinsäuren in einem farblosen Ladepuffer aufgetragen. Abhängig von der Menge der aufgetragenen Nucleinsäure (Nachweisgrenze für Nucleinsäuren 10 ng/Bande) wurde das Polyacrylamid-Gel für 1 - 16 h in der Färbelösung inkubiert. Das Gel wurde zu Dokumentationszwecken am Computer eingescannt.

### 3.2.4.3. Färbung mit Ethidiumbromid

In Agarosegelen erfolgte die Detektion von Nucleinsäuren mittels Ethidiumbromid. Dafür wurden die Agarosegele mit 0,0004 % Ethidiumbromid angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert im Abstand von etwa 10 Basenpaaren in DNA oder RNA und verändert dadurch sein Anregungsspektrum. Wird dieser Farbstoff nun mit Hilfe von ultraviolettem Licht der Wellenlänge 312 nm angeregt, kommt es zur Fluoreszenz der Substanz. Die Lichtintensität ist dabei ungefähr proportional zur eingesetzten Menge an Nucleinsäure. Zu Dokumentationszwecken wird das Gel fotografiert.

### 3.2.5. Isolierung von Nucleinsäuren aus Agarosegelen

Für die weitere Verwendung von Nucleinsäuren für die Klonierung wurden Nucleinsäuren aus Agarosegelen aufgereinigt. Die Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die Nucleinsäure mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up Kits (siehe Tabelle 3.1.9) nach Angaben des Herstellers präpariert.

### 3.2.6. Restriktionsverdau von DNA

#### 3.2.6.1. Analytischer Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA Fragmente bzw. Plasmide Sequenzspezifisch zu spalten. Der analytische Restriktionsverdau wurde angewendet, um mittels der Fragmentgrößen zu überprüfen, ob das gewünschte Plasmid vorliegt. Dabei wurden Doppelverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden jeweils anhand des Plasmids und des Inserts ausgewählt. Es wurden Restriktionsenzyme präferiert, die jeweils nur eine mögliche Spaltstelle im Plasmid aufweisen. Um die Fragmente des Plasmids im Agarosegel nach dem Restriktionsverdau deutlich detektieren zu können, wurde 800 ng der Plasmid DNA eingesetzt. Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Proben wurden nach dem Verdau direkt mit DNA Ladepuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) versetzt und über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.2.3.1).

### 3.2.6.2. Präparativer Restriktionsverdau

Für die Klonierung von Inserts in Vektoren wurden größere Mengen verdauter DNA benötigt. Daher wurde in diesem Fall ein präparativer Restriktionsverdau mit 4 µg Vektor DNA bzw. Insert DNA durchgeführt. Um den gerichteten Einbau des Inserts an der richtigen Position in den Vektor zu gewährleisten, wurden für die beiden Enden des Inserts und die entsprechenden Enden des Plasmids zwei verschiedenen Restriktionsenzyme eingesetzt. Die entstehenden freien Enden der Vektor DNA wurden anschließend dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors, die eine Inkorporation des Inserts verhindert, zu vermeiden. Dazu wurden dem Restriktionsansatz, welcher die Vektor DNA enthält 10 u Alkalische Phosphatase zugesetzt (siehe Tabelle 3.1.8). Die Restriktionsenzyme wurden anhand der *multiple cloning site* des Plasmids ausgewählt; das Insert wurde über PCR mit dem für das jeweilige Restriktionsenzym benötigten Überhang versehen. Es wurden ausschließlich Restriktionsenzyme ausgewählt, die sogenannte *sticky ends* produzieren, um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen. Die Inkubation und Auswahl der Restriktionspuffer erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Der Restriktionsverdau wurde quantitativ mit DNA Ladepuffer versetzt (siehe Abschnitt 3.1.6) und über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.2.3.1). Für die weitere Verwendung wurden die Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.5). Dies ermöglicht die Ligation (siehe Abschnitt 3.2.7) der Fragmente, um ein intaktes Plasmid mit der gewünschten Insert DNA zu erhalten.

### 3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde eingesetzt, um mit Hilfe von Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 3.2.6.2) vorbereitete Insert und Vektor DNA Fragmente mit zueinander passenden durch Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 3.2.6.2) vorbereiteten Enden zu einem intakten Plasmid zusammenzusetzen.

Es wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1: 5 oder 1: 3 mit 1x T4 DNA Ligase Puffer versetzt. Die Vektormenge betrug dabei 65 - 100 ng. Dieser Ansatz wurde durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und bei 22°C inkubiert. Die Ligation mit Varianten der hTRBP Sequenz wurde für eine Stunde inkubiert, während die Ligationsansätze mit Varianten der hAgo2 Sequenz für mindestens 16 h inkubiert wurden. Die Hitzeinaktivierung der Ligase erfolgte für 10 min bei 70°C. Die Ligationsansätze wurden direkt für die Transformation (siehe Abschnitt 3.2.9) in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt.

Eine zweite Anwendung der Ligation im Kontext dieser Promotionsarbeit bestand darin, mit Hilfe von Adapterprimern hergestellte Produkte der *site-directed mutagenesis* PCR (siehe Abschnitt 3.2.2.2) zur kompletten für ein Protein kodierenden Sequenz zusammenzusetzen. Dazu wurden jeweils 100 ng der vorher mit Hilfe von präparativer Restriktion (siehe Abschnitt 3.2.6.2) vorbereiteten Fragmente mit 1 x T4 DNA Ligasepuffer und 2 u T4 DNA Ligase (siehe Tabelle 3.1.8) für 1 h bei 22°C inkubiert. Die anschließende Hitzeinaktivierung erfolgte für 5 min bei 70°C. Die ligierten Fragmente wurden anschließend über die Standard Phusion PCR (siehe Abschnitt 3.2.2.1) amplifiziert.

### 3.2.8. Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Um chemisch kompetente Zellen herzustellen, d.h. die Durchlässigkeit der Zellmembran für Plasmid DNA zu erhöhen, wurden die Zellen mit einem Calciumchlorid-haltigen Puffer behandelt. Dadurch gewinnen die Zellen die Fähigkeit exogene Plasmid DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Die Salzbehandlung reduziert dabei die abstoßenden Kräfte zwischen negativ geladener Zellmembran und der ebenfalls negativ geladenen Nukleinsäure. Möglicherweise kommt es auch zur Porenbildung in der Zellmembran. Die hier beschriebene Methode wurde gleichermaßen für *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* BL21(DE3) Zellen angewendet und wurde ursprünglich von der Gruppe um Hanahan eingeführt<sup>(215)</sup>.

Zunächst wurden sogenannte *seed stocks* hergestellt. Dazu wurden die gewünschten Zellen auf einer SOB-Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, bis einzelne Kolonien auf der Platte erkennbar waren. Eine einzelne Kolonie wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 2 ml SOB Medium (siehe Tabelle 3.1.11.1) überführt und über Nacht schüttelnd bei 23 - 27°C inkubiert. Die über Nacht angewachsene Kultur wurde mit 15 % Glycerol versetzt und in 1 ml Aliquots (*seed stocks*) bei -80°C aufbewahrt.

Einer dieser *seed stocks* wurde mit 250 ml SOB-Medium versetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 schüttelnd bei 23 - 27°C inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 2.500 x g und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 ml des Kompetenzpuffers CCMB80 (siehe Tabelle 3.1.6) in Rundboden-Gefäßen vorsichtig resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert und dann bei 2.000 x g und 4°C für weitere 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen vorsichtig in 10 ml CCMB80 Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde die OD<sub>600</sub> einer in SOC-Medium (siehe Tabelle 3.1.11.1) verdünnten Probe gemessen. Mit Hilfe von CCMB80 Puffer wurde die Zell-Suspension auf eine OD<sub>600</sub> von 1 - 1,5 eingestellt. Diese wurde dann in Aliquots von 60  $\mu$ l bei -80°C eingefroren. Die Kompetenz der Zellen wurde wie unter Abschnitt 3.2.9 beschrieben getestet.

### 3.2.9. Transformation von Plasmid DNA in chemisch kompetente Zellen

Um Plasmide in *E. coli* Zellen einzubringen, wurde die Plasmid DNA mit den chemisch kompetenten Zellen auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock unterzogen, um die Effizienz der DNA Aufnahme zu erhöhen. Dabei musste beachtet werden, dass frisch ligierte Plasmid sehr schlecht in BL21(DE3) Zellen aufgenommen wurden. Diese wurden daher zunächst in DH5 $\alpha$  transformiert, in diesen Zellen vermehrt, wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben isoliert und nach Kontrolle des Plasmids durch Restriktionsanalyse, PCR oder gegebenenfalls Sequenzierung in BL21(DE3) transformiert.

1  $\mu$ l einer 50 - 100  $\mu$ M Plasmid-Lösung oder 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 3.2.7) wurden in vorgekühlte Rundboden-Gefäße (10 ml) vorgelegt. Diese wurden mit 50  $\mu$ l chemisch kompetenten Zellen (siehe Abschnitt 3.2.8) versetzt und durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Dann erfolgte eine halbstündige Inkubation auf Eis. Darauf wurden die Rundboden-Gefäße mit den Plasmid-Zell-Suspensionen für 50 s bei 42°C in ein Wasserbad getaucht und

anschließend direkt für 3 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 250 µl auf 37°C temperiertes SOB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert, um eine Regeneration der Zellen zu ermöglichen. Der gesamte Ansatz wurde im Anschluss an die Regenerationsphase auf eine LB-Agarplatte mit einem adäquaten Selektionsantibiotikum ausgestrichen.

### **3.2.10. Kontrolle von Klonierung und Transformation**

#### **3.2.10.1. Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Für die Sequenzierung wurden die Plasmide gemischt mit adäquaten Sequenzier-Primern zu GATC Biotech geschickt, wo die Sequenzierung im sogenannten *LIGHTrun* Modus durchgeführt wurde.

### **3.2.11. Herstellung von Glycerinkulturen zur Kryokonservierung von Bakterienstämmen**

Um Bakterienkulturen für die spätere Verwendung aufzubewahren, wurden sogenannte Glycerinkulturen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden aus einer Übernachtskultur (siehe Abschnitt 3.2.1.1) 500 µl Zell-Suspension entnommen und 1: 1 mit 87 % Glycerol (steril) versetzt und dann bei -80°C gelagert.

### **3.2.12. Expression von rekombinanten Proteinen**

Als Expressionsstamm wurde für alle im Rahmen dieser Promotionsarbeit rekombinant exprimierten Proteine *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Das für GST-hAgo2 kodierende Plasmid pET41b-hAgo2, ebenso wie die für hPACT und hTRBP kodierenden Plasmide pET41b-hTRBP und pET41b-hPACT, tragen eine Kanamycin-Resistenz, um eine Selektion der Plasmid-tragenden Bakterien zu ermöglichen. Für eine Expression des jeweiligen Proteins im präparativen Maßstab wurde zunächst ein Drei-Ösen-Ausstrich der entsprechenden Glycerinkultur (siehe Abschnitt 3.2.11) auf LB-Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin angefertigt. Daraus wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie in 5 ml TFB-Medium (siehe Abschnitt 2.1.4) mit 1x Phosphatpuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) und 30 µg/ml Kanamycin überführt und über etwa 8 h bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Diese Kultur wurde nach 8 h in 50 ml TFB-Medium mit 1x Phosphatpuffer und 30 µg/ml Kanamycin gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die OD<sub>600</sub> dieser Kultur bestimmt. Die Hauptkultur mit einem Volumen von 2 l, ebenfalls bestehend aus TFB-Medium mit 1x Phosphatpuffer und 30 µg/ml Kanamycin, wurde mit Hilfe dieser Übernachtskultur auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,1 - 0,2 eingestellt. Diese wurde bei 200 rpm und 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von etwa 1 erreicht wurde. Dann erfolgte die Induktion der Expression des jeweiligen Proteins mit Hilfe von 1 mM IPTG. Die Hauptkultur wurde im Fall von GST-hAgo2 für weitere 2 h und im Fall von hTRBP-His und hPACT-His für 1 h bei 200 rpm und 37°C inkubiert, bevor die Zellen geerntet wurden. Zum Zeitpunkt der Induktion und zum Ende der Induktionszeit wurde je 1 ml Probe für die Kontrolle der Expression entnommen. Die Zellsuspension wurde für die Zellernte bei 4°C und 5000 x g

### 3. Material und Methoden

für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für die spätere Reinigung gewogen und bei -20 °C verwahrt.

#### 3.2.12.1. Kontrolle der Expression

Der Erfolg der Expression wurde vor Start der Reinigung im analytischen Maßstab überprüft. Dazu wurde zunächst die  $OD_{600}$  der zu Beginn und Ende der Induktionszeit entnommenen Proben (siehe Abschnitt 3.2.12) bestimmt. Daraus wurde das Volumen des einzusetzenden Lysepuffers (siehe Abschnitt 3.1.6) bestimmt, um eine vergleichbare Bandenintensität auf dem Gel zu ermöglichen. Dazu wurde die  $OD_{600}$  mit dem Faktor 200 multipliziert. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 15000 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet in dem Lysepuffer resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Es erfolgten zwei Ultraschallbehandlungen für 30 s bei 60 % Power und 60 % Zyklus unterbrochen von 30 s Pause auf Eis. Aus dieser sonifizierten Zellsuspension wurde die erste Probe (Totalzell-Protein) entnommen. Danach wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Aus dem die löslichen Proteine enthaltenden Überstand wurde die zweite Probe (Überstand) entnommen. Das Pellet wurde mit einem dem Überstand entsprechenden Volumen 50 mM Tris (pH 6,8) und 1 % SDS versetzt und für 10 min bei 55 °C inkubiert. Daraus wurde die dritte Probe (Pellet) entnommen, die einen Überblick über die Menge unlöslicher Proteine gibt.

#### 3.2.13. Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen

##### 3.2.13.1. Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde photometrisch mit Hilfe des Nanodrop 2000 oder des Spektrophotometers DU-640 bestimmt. Der Nanodrop 2000 wurde gewählt, wenn nur sehr geringe Mengen der Nukleinsäuren vorlagen, oder die exakte Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren für die weiteren Anwendungen nicht essentiell war. Die Genauigkeit der Messung mit dem Spektrophotometers DU-640 ist höher als mit dem Nanodrop 2000. Die photometrische Messung diente neben der Konzentrationsbestimmung auch der Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung. Die zusätzliche Bestimmung der  $A_{280}$  ermöglichte die Berechnung des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$ , welcher Auskunft über die Verunreinigung mit Proteinen gibt. Eine gute Qualität wird bei RNA mit einem Quotienten von 1,9 bis 2,1 erwartet, während dies bei DNA schon bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 der Fall ist. Die  $A_{230}$  gibt Auskunft über mögliche organische Kontaminationen der Nukleinsäurepräparation. Auch hier wurde ein Quotient der beiden Werte  $A_{260}/A_{230}$  gebildet. Bei einem Quotienten von 2,0 bis 2,2 wird die Nukleinsäure als rein erachtet.

Der Extinktionskoeffizient wurde für alle verwendeten Nukleinsäuren mit Hilfe des Oligo Extinktionskoeffizienten Rechners (The Scripps Research Institute, La Jolla (CA), USA) an Hand der Sequenz berechnet. Über den Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) der Nukleinsäure und die Schicht-

dicke ( $d$ ) konnte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration über die Absorption bei 260 nM die Konzentration ( $c$ ) bestimmt werden.

$$c = \frac{A_{260}}{\epsilon \times d} \quad (3.1)$$

( $A_{260}$  = Absorption bei 260 nM,  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient ( $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ),  $d$  = Schichtdicke der Küvette (cm))

War die Sequenz unbekannt oder handelte es sich um ein Plasmid, wurde die Konzentration näherungsweise bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass eine  $A_{260}$  von 1 entweder 50  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA, 33  $\mu\text{g/ml}$  ssDNA oder 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA entspricht.

### 3.2.13.2. Proteine

Die Konzentration der Proteine wurde anhand ihres Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  photometrisch bestimmt. Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des Programms ProtParam. Dieses Programm beruht auf Studien, die zeigen, dass es möglich ist, über die Aminosäurekomposition eines Proteins dessen Extinktionskoeffizienten zu bestimmen<sup>(216)</sup>. Dazu werden die Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystin, welche bei etwa 280 nM ihr Absorptionsmaximum besitzen, in die Berechnung mit einbezogen.

$$\epsilon(P) = Nr(Tyr) * \epsilon(Tyr) + Nr(Trp) * \epsilon(Trp) + Nr(Cystin) * \epsilon(Cystin) \quad (3.2)$$

P = Protein

Nr = Anzahl

Die Absorption der Proteinlösung wurde bei 280 nM mit Hilfe des Spektralphotometers gemessen und dann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration berechnet (siehe Gleichung 3.1).

Weiterhin wurde in einigen Fällen die Überprüfung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Bradford Tests durchgeführt. Dabei wird der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 eingesetzt. Dieser bildet in saurer Lösung Komplexe mit kationischen und unpolaren Seitenketten eines Proteins. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf 595 nM verschoben, da er in seiner anionischen Sulfonatform stabilisiert wird. Das Bradford Assay Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet und für die Erstellung einer Kalibriergeraden BSA eingesetzt. Die Messung der Absorption wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers durchgeführt.

### 3.2.14. Hybridisierung von Nukleinsäuren

Um siRNAs bzw. doppelsträngige DNAs zu erhalten, wurden äquimolare Mengen von *guide* und *target* Strang in 1x Hybridisierungspuffer (siehe Tabelle 3.1.6) gemischt. Dieses Nukleinsäuregemisch wurde für 3 min auf 95 °C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur herunterge-

kühlt. Die Erfolgskontrolle der Hybridisierung erfolgte mittels PAGE unter nativen Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.3.2).

#### 3.2.15. *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit zuvor linearisierten Plasmiden mit Hilfe des RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems nach Angaben des Herstellers.

#### 3.2.16. Phenol-Chloroform Extraktion zur Isolierung von Nukleinsäuren

Die Phenol-Chloroform Extraktion wird verwendet, um eine Nukleinsäure aus einer Protein-Nukleinsäure-Mischung zu extrahieren. Dazu wird ein 1:1 Gemisch aus Phenol und Chloroform verwendet. Diesem Gemisch ist außerdem Isoamylalkohol zugesetzt, um ein Aufschäumen der organischen Phase zu verhindern, was das Abpipettieren erschwert. Wird Phenol mit einem niedrigen pH-Wert (4,5 - 5,0) gewählt, kann eine DNA-freie Isolation von RNA durchgeführt werden. Für die Isolation von DNA wurde Phenol mit einem pH-Wert von 7,5 - 8,0 eingesetzt.

Das Protein-Nukleinsäure-Gemisch wurde 1: 1 (v/v) mit dem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25: 24: 1 (v/v)) versetzt, gemischt und dann 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lagen zwei Phasen vor. In der oberen wässrigen Phase befand sich die Nukleinsäure. Die Proteine lagern sich entweder in der Interphase oder der organischen unteren Phase ab. Anschließend wurde die Nukleinsäure durch eine Ethanolpräzipitation aufkonzentriert (siehe Abschnitt 3.2.17).

#### 3.2.17. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Hauptsächlich zur Konzentrierung, aber auch zur Entfernung von Salzen, wird die Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren durchgeführt. Dazu wird zunächst 1/10 Volumen 3 M NaCH<sub>3</sub>COOH mit einem pH-Wert von 4,8 bis 5,2 zugesetzt und gemischt. Dadurch wird ein Teil der Hydrathülle der Nukleinsäure entfernt und die Löslichkeit gesenkt. Dann wurde das 2,5-fache Volumen 100 % Ethanol zugegeben, sodass die Nukleinsäure ein unlösliches Präzipitat bildet. Bei sehr geringen Mengen Nukleinsäure wurde zusätzlich als Präzipitationshilfe 0,05 mg/ml Glykogen verwendet.

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei -80 °C inkubiert und dann 1 h bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70 % eiskalten Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in einem adäquaten Volumen Wasser oder 10 mM Tris (pH 7,5) resuspendiert.

#### 3.2.18. Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Nach der *in vitro* Transkription wurde, wenn eine radioaktive Markierung des 5'-Endes der *in vitro* Transkripte geplant war, eine Dephosphorylierung des 5'-Endes durchgeführt. Für die Hy-



drolyse der 5'-Phosphatgruppe wurde dabei die *Calf Intestine* Alkalische Phosphatase (CIP) eingesetzt.

Dazu wurden 20 pmol des *in vitro* Transkripts mit 0,4 u/μl RiboLock und 2 μl CIP in 1x Restriktionspuffer für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde danach zunächst über eine Nick Säule (siehe Tabelle 3.1.3) und dann über Phenol-Chloroform Extraktion (siehe Abschnitt 3.2.16) und Ethanolpräzipitation (siehe Abschnitt 3.2.17) gereinigt.

### 3.2.19. 5'-Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Um Phosphatgruppen an die 5'-Enden von Nukleinsäuren zu transferieren, wurde die T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) verwendet. Diese katalysiert die Kopplung des  $\gamma$ -Phosphats von ATP an die freien 5'-OH Enden einer Nukleinsäure.

Dazu wurden in einem 100 μl Ansatz 50 μM der Nukleinsäure mit 1 mM ATP, 0,4 u/μl RiboLock und 1 u/μl T4 PNK in 1x PNK Puffer A für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die T4 PNK wird durch eine zehnmütige Inkubation bei 75 °C durch Hitze inaktiviert. Anschließend erfolgt eine Abtrennung von ATP und ADP über eine Nick-Säule (siehe Tabelle 3.1.3) gemäß Herstelleranweisung und eine Reinigung des 5'-phosphorylierten Nukleinsäuresubstrats über Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 3.2.16) und Ethanol-Präzipitation (siehe Abschnitt 3.2.17).

#### 3.2.19.1. 5'-Phosphorylierung mit radioaktivem $^{32}\text{P}$

Für die Markierung einer Nukleinsäure mit einem radioaktiven Phosphat wurde  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  eingesetzt. Die radioaktive Markierung erfolgte entsprechend der 5'-Phosphorylierung mit unmarkierten ATP (siehe Abschnitt 3.2.19). 10 pmol der zu markierenden Nukleinsäure wurden dazu in einem 20 μl Ansatz mit 11 pmol  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , 1x T4 PNK Puffer A und 1 u T4 PNK versetzt. Handelte es sich um RNA wurde zusätzlich 1 u/μl Ribolock zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert; die Hitzeinaktivierung der T4 PNK erfolgte bei 75 °C für weitere 10 min. Der Ansatz wurde über eine Nick Säule (siehe Tabelle 3.1.3) gemäß Herstelleranweisung von überschüssigen Nukleotiden getrennt, der Erfolg der Markierung über Szintillationsmessung (siehe Abschnitt 3.2.20) kontrolliert und dann direkt für die Spaltexperimente (siehe Abschnitt 3.3.4) verwendet. Die radioaktive Markierung ermöglicht die Detektion des Oligonukleotids über Autoradiographie (siehe Abschnitt 3.2.4.1).

### 3.2.20. Szintillationsmessung als Erfolgskontrolle der radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden

Die Szintillationsmessung wurde durchgeführt, um den Erfolg der radioaktiven Markierung zu überprüfen. Dazu wurde 1 μl der Lösung mit dem markierten Oligonukleotid (siehe Abschnitt 3.2.19.1) in einen Szintillationscocktail (siehe Tabelle 3.1.2) gegeben. Die geladenen Teilchen induzieren Stöße in diesem Cocktail, die zu einer Anregung der in dem Szintillationscocktail enthaltenen Partikel führt. Diese Energie wird in Form von Licht wieder abgegeben, was mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert wird. Die Szintillationen pro Zeit werden gezählt und ermöglichen so eine Korrelation mit dem Markierungserfolg.

### **3.2.21. T1-Verdau zur Herstellung radioaktiver Größenmarker**

Um die Größe der Spaltprodukte ermitteln zu können, wurde ein radioaktiver Größenmarker hergestellt. Dazu wurde ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit Hilfe der RNase T1 verdaut. Die RNase T1 spaltet spezifisch einzelsträngige RNAs am 3'-Ende von Guanin. Dadurch können die erzeugten Spaltprodukte exakt zugeordnet werden.

Für den T1 Verdau wurden zunächst 8 µl der markierten RNA zusammen mit 1 µg unmarkierter Kompetitor RNA lyophilisiert und anschließend in 9 µl 1x RNase T1 Puffer (siehe Tabelle 3.1.6) resuspendiert. Zusammen mit 1 u RNase T1 wurde die RNA für 15 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe von 1x Ladebuffer für denaturierende PAGE (siehe Tabelle 3.1.6) gestoppt.

## **3.3. Biochemische Methoden**

### **3.3.1. Bakterienlyse als Voraussetzung für die Aufreinigung rekombinanter Proteine**

#### **3.3.1.1. Lyse des Bakterienpellets mit rekombinant exprimierten hAgo2**

Das Pellet wurde gewogen und pro Gramm mit 5 ml Lysisbuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) versetzt und resuspendiert. Dabei wurde auf Eis gearbeitet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Es erfolgten 5 Ultraschallbehandlungen bei 80 % Power und 60 % Zyklus. Zwischen den Behandlungen wurde die Zellsuspension jeweils eine Minute auf Eis inkubiert. Um die Zellreste und größere Aggregate von den gelösten Proteinen abzutrennen, wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 30.000 x g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die Aufreinigung verwendet.

#### **3.3.1.2. Lyse des Bakterienpellets mit rekombinant exprimierten hTRBP oder hPACT**

Das Bakterienpellet wurde in 30 ml Lysisbuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) pro Gramm resuspendiert. Dabei wurde ebenfalls auf Eis gearbeitet. Zunächst erfolgten 5 Ultraschallbehandlungen für 20 s bei 70 % Power und 100 % Zyklus. Zwischen den Behandlungen wurde die Zellsuspension für 30 s auf Eis inkubiert. Dann erfolgte eine enzymatische Behandlung mit 100 µg/ml Lysozym für 15 min bei 4 °C. Nach einer erneuten Ultraschallbehandlung (10 x 20 s bei 70 % Power und 100 % Zyklus mit 30 s Pause auf Eis zwischen den einzelnen Behandlungen), wurden Zellbestandteile und größere Aggregate 4 °C und 18.000 x g für 30 min abzentrifugiert und der Überstand direkt für die Reinigung verwendet.

### **3.3.2. Aufreinigung rekombinanter Proteine**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mit Hilfe der FPLC Advanced Protein Purification System 650E von Waters über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Diese ist auf 4 °C temperiert.

### 3.3.2.1. Aufreinigung von rekombinantem hAgo2

Zunächst wurden 5 ml Glutathion High Performance Säulenmaterial in eine XK 16/20 Säule gefüllt. Dann erfolgte die Äquilibration der Säule mit etwa 10 Säulenvolumina Bindungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Der Überstand mit den gelösten Proteinen (siehe Abschnitt 3.3.1.1) wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit einer Flussrate von 0,1 ml pro min über die Säule gepumpt. Dies erfolgte für mindestens 16 h bei 4 °C, sodass die Proteinlösung die Säule mehrfach durchlief. Vor dem Start der Elution wurden unspezifisch gebundene Proteine mit etwa 10 Säulenvolumina Bindungspuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min von der Säule gewaschen und dabei über einen Detektor und einen Chromatogrammschreiber die Änderung der  $A_{280}$  aufgenommen. Sobald keine weitere Änderung der Absorption detektiert werden konnte, wurde die Elution gestartet. Mit einer Flussrate von 0,1 ml/min wurde der Glutathion-haltige Elutionspuffer über das Säulenbett gepumpt und Fraktionen von jeweils 500 µl gesammelt. Anhand des Chromatogramms wurden anschließend die Protein-haltigen Proben ermittelt und über SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.3.3.1) mit Hilfe eines 8 % SDS-Gels auf Reinheit überprüft. Fraktionen mit ähnlicher Reinheit und Konzentration wurden vereinigt.

Nach der Elution erfolgte eine erneute Äquilibration mit Bindungspuffer (siehe oben), sodass der Überstand erneut auf die Säule geladen werden konnte. Je nach Ausbeute wurde dieser Vorgang bis zu 5 x wiederholt.

### 3.3.2.2. Aufreinigung von rekombinantem hTRBP oder hPACT

Beide Proteine wurden nach demselben Protokoll gereinigt.

10 ml Talon Superflow wurden in die Superformance 50-10 Säule von Merck gefüllt und mit mindestens 10 Säulenvolumina Bindungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) äquilibriert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen und konnte während der Inkubation für mindestens 16 h die Säule mehrfach durchlaufen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Hilfe von etwa 10 Säulenvolumina Bindungspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min von der Säule gewaschen. Dies wurde über die Kontrolle der  $A_{280}$  mit Hilfe eines Detektors und eines Chromatogrammschreibers überprüft. Die Elution erfolgte mittels Imidazol-haltigen Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurden Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt und über SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.3.3.1) mit Hilfe eines 10 % SDS-Gels auf ihre Reinheit überprüft. Fraktionen mit ähnlicher Reinheit und Konzentration wurden vereinigt.

### 3.3.2.3. Dialyse

Nach der Reinigung wurden hTRBP und hPACT durch Dialyse in einen Glycerol-haltigen Lagerpuffer überführt. Die Dialyse erfolgte 2 x gegen 2 l Lagerpuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) mit Hilfe von SpectraPor Dialyse-Schläuchen mit 12 - 14 kDa MWCO.

### 3.3.3. SDS-PAGE

Die SDS-Polysacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode, um Proteine anhand ihrer Größe mit Hilfe von Elektrophorese aufzutrennen. Dabei dient ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel als Matrix<sup>(217)</sup>. Die in Ladepuffer vorliegenden Proteine werden vor Auftrag auf das Gel mit Hilfe von Hitze (3 min bei 95°C) und DTT denaturiert, was die Anlagerung von SDS ermöglicht. Es bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins, sodass statt einer Eigenladung alle Proteine negativ geladen sind. Durch die Denaturierung und die Anlagerung des SDS liegen die Proteine linear vor, sodass die Auftrennung auf Grund der Länge stattfinden kann. Die Prozentigkeit des Trenngels wird dabei entsprechend der Größe des untersuchten Proteins gewählt. Das Sammelgel wies immer eine Polyacrylamid Konzentration von 4 % auf.

**Tabelle 3.25.: Komponenten von Sammel- und Trenngelen für SDS PAGE.** Puffer siehe Abschnitt 3.1.6.

	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer	SDS	APS	TEMED
<b>Trenngel</b>	125 mM	—	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	0,1 % (v/v)
<b>Sammelgel</b>	—	375 mM	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	0,1 % (v/v)

Die mit Ladepuffer versetzten Protein Proben wurden in die Taschen des in eine vertikale Gelkammer gespannten Gels (85 x 100 x 0,75 mm) geladen. Gleichzeitig wurde ein adäquater Proteinstandard geladen, um eine spätere Zuordnung der Proteinbanden zu ermöglichen. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1x Elektrophoresepuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) verwendet. Bei 1,7 mA/cm Gellänge erfolgte die Auftrennung für 90 - 120 min.

#### 3.3.3.1. Detektion von Proteinen nach SDS-PAGE

##### Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die Nachweisgrenze von Coomassie Brilliant Blue liegt bei etwa 0,1 µg Protein pro Bande im Gel. Es handelt sich um eine unspezifische Färbemethode, da sich der Triphenylmethan-Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert.

Die Färbung erfolgte für eine Stunde oder über Nacht, indem die Gele schwenkend bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert wurden. Die Proteinbanden wurden dabei durch die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure fixiert. Um den Hintergrund wieder zu entfärben, erfolgte eine Inkubation schwenkend bei Raumtemperatur in Coomassie Entfärbelösung (siehe Abschnitt 3.1.6). Bei Blaufärbung dieser Entfärbelösung erfolgte ein Austausch gegen frischen Entfärber. Die Entfärbelösung wurde über einen Kohlefilter regeneriert. Sobald die Banden klar vom Hintergrund zu unterscheiden war, wurde das Gel eingescannt.

### Färbung mit Sypro® Ruby

Der Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby bindet selektiv an basische Aminosäuren und weist eine wesentlich höhere Sensitivität auf als Coomassie Brilliant Blue. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 ng Protein pro Bande im Gel. Die Anregungswellenlänge beträgt 450 nM, während die emittierte Fluoreszenz bei 610 nM detektiert werden kann.

Für die Färbung mit Sypro Ruby wird das SDS Gel zunächst mit Fixierlösung (50 % Methanol, 7 % Essigsäure) für 30 min inkubiert. Dann erfolgt die Inkubation mit Sypro Ruby vor Licht geschützt über Nacht. Das Gel wird 2 x 30 min schwenkend in Waschlösung (10 % Methanol, 7 % Essigsäure) inkubiert und vor der Detektion mit Millipore Wasser gespült. Die Detektion erfolgt mit Hilfe des Typhoon Scanners.

### 3.3.4. Spaltexperiment zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität von hAgo2

Das Spaltexperiment wurde eingesetzt, um zum Einen die Spaltaktivität verschiedener Ago Chargen zu ermitteln und zum Anderen zu überprüfen, ob sich die Spaltaktivität von Ago Proteinen mit unterschiedlichen *guide-target* Strang Kombinationen verändert. Außerdem diente das Spaltexperiment als Grundlage, den Effekt von dsRNA bindenden Proteinen auf die Ago-vermittelte Spaltung von *target* RNAs zu überprüfen.

Die Komponenten des Standardspalttests mit hAgo2 sind in Tabelle 3.26 dargestellt. Alle Komponenten bis auf die radioaktiv markierte *target* RNA wurden präinkubiert. Durch Zugabe der *target* RNA wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte über 2 h bei 37°C. In diesem Zeitraum wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Diese Zeitpunkte sind den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe von 1x Ladepuffer für denaturierende PAGE (siehe Tabelle 3.1.6) und Inkubation auf Eis gestoppt. Sollte der Effekt von dsRNA-bindenden Proteinen auf die Spaltung analysiert werden, wurde dem Spalttest dieses Protein zugesetzt. Die Konzentrationen sind jeweils den Abbildungsunterschriften im Ergebnisteil zu entnehmen.

Komponente	Konzentration
hAgo2	2,5 µM
Spaltpuffer	1x
RiboLock	1 µl
<i>guide</i> RNA oder siRNA	100 nM
radioaktive <i>target</i> RNA	2,5 nM

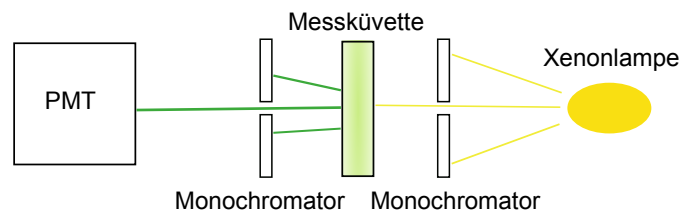
**Tabelle 3.26: Komponenten des Standard Spalttests mit hAgo2.** Variationen dieser Komponenten bzw. Konzentrationen sind den jeweiligen Abbildungsunterschriften im Ergebnisteil zu entnehmen.

Leicht abgewandelt wurde der Standard Spalttest auch mit MjAgo durchgeführt. Die veränderten Bedingungen sind den Abbildungsunterschriften im Ergebnisteil zu entnehmen. Das bakterielle Ago Protein verwendet im Gegensatz zu seinem humanen Gegenstück statt RNA sowohl als *guide* als auch als *target* Strang DNA. Dementsprechend wurden im Spalttest mit MjAgo DNA Substrate eingesetzt. Weiterhin befindet sich der Lebensraum des Bakteriums *M. jannaschii*, welchem das MjAgo entstammt, in heißen Quellen. Die für die Spalttests mit MjAgo gewählte Temperatur beträgt daher 85°C statt 37°C.

### 3.3.5. Fluoreszenzspektroskopische Messungen zur Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten

Die Gleichgewichtsfluoreszenztitration stellt eine Methode zur Bestimmung der Affinität zweier Bindungspartner dar, von denen einer einen Fluorophor trägt, welcher die Intensität bei der Bindung an den unmarkierten Bindungspartner verändert.

Der fluoreszierende Bindungspartner wird zunächst in einem adäquaten Bindungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) in einer 700  $\mu\text{l}$  Fluoreszenzküvette vorgelegt. In dieser Arbeit war der fluoreszierende Bindungspartner immer eine Nukleinsäure, die in einer Konzentration von 20 - 50 nM eingesetzt wurde. Die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Bindungspartner wird mit Hilfe des Programms DataMax 2.20 aufgenommen und der Mittelwert dokumentiert. Nun wird schrittweise der unmarkierte Bindungspartner dazu titriert. In den hier vorgestellten Experimenten handelt es sich bei diesem entweder um ein Nukleinsäure-bindendes Protein oder eine andere Nukleinsäure, die jeweils in 5 - 20 nM Schritten titriert wurden. Sollte die Bindung eines binären Komplexes aus Ago Protein und *guide* Strang an einen *target* Strang untersucht werden, wurde zunächst der binäre Komplex aus Ago Protein und einem fluoreszierenden *guide* Strang präassembliert. Dies wurde über den Abfall der Fluoreszenzintensität bei Bindung des *guide* Stranges an das Ago Protein kontrolliert. Der unmarkierte *target* Strang wurde dann schrittweise zugegeben.



**Abbildung 3.2.: Aufbau des Fluoreszenzspektrometers Fluoromax-3.** In einer über ein Wasserbad temperierten Fluoreszenzküvette wird der Fluorophor-tragende Bindungspartner vorgelegt. Der nicht-markierte Bindungspartner wird langsam hinzu titriert. Angeregt wird die Fluoreszenz mit Hilfe einer Xenon-Lampe, deren Licht mittels Monochromator auf die Exzitationswellenlänge des Fluorophors eingegrenzt wird. Das emittierte Licht, wird über einen weiteren Monochromator auf das Emissionsmaximum des Fluorophors begrenzt und über einen Photomultiplier (PMT) detektiert.

In allen Fällen muss darauf geachtet werden, dass bis zum Erreichen eines stabilen Signals gut gemischt wird und sich keine Luftblasen oder Aggregate bilden. Bindet der unmarkierte Bindungspartner an den Fluoreszenz-markierten Bindungspartner, verändert sich die chemische Umgebung des Fluorophors und die Intensität erniedrigt oder erhöht sich. Das Signal wird nach Erreichen des stabilen Signals über einen Zeitraum von etwa 2 - 3 min mit Hilfe des Programms DataMax 2.20 aufgenommen und der Mittelwert abgelesen. Diese relative Fluoreszenzintensität wird gegen die Konzentration des unmarkierten Bindungspartners aufgetragen. Dabei muss der entstehende Verdünnungseffekt in Betracht gezogen werden. Je nach Volumen des zugegebenen Bindungspartners verändert sich die Fluoreszenz schon durch Verdünnung, was durch eine mathematische Korrektur der Messwerte ausgeglichen werden muss. Da die Dissoziationskonstante  $K_D$  abhängig von der Temperatur ist, wurde ein Einfluss der Temperatur auf die Messwerte durch die konstante Temperierung der Küvette auf 25°C mittels eines Wasserbades ausgeschlossen.

Die Datenpunkte können mittels einer quadratischen Bindungsgleichung (siehe Anhang A) im Programm GraFit 5.0.6 mathematisch ausgewertet werden, sodass die Dissoziationskonstante für die Interaktion zweier Bindungspartner berechnet werden kann.

### 3.3.6. Transiente Fluoreszenzmessungen mit Hilfe der *stopped flow* Methode

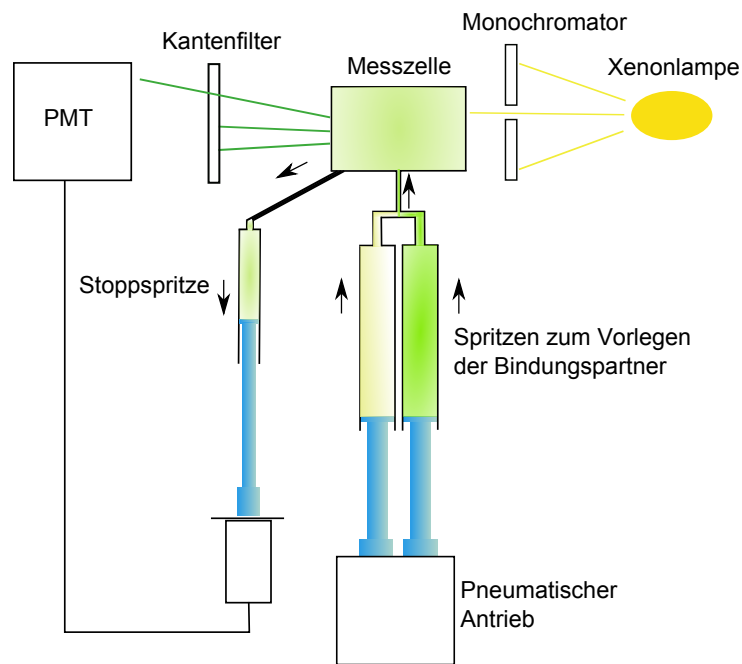
Die *stopped flow* Technik ist eine spektroskopische Methode, die die Untersuchung schneller Kinetiken vor Einstellung des Reaktionsgleichgewichts ermöglicht. In dieser Arbeit wird sie verwendet, um die Bindung von Proteinen an Fluoreszenz-markierte Nukleinsäuren zu untersuchen. Mit Hilfe der *stopped flow* SX20 Apparatur (schematischer Aufbau siehe Abbildung 3.3) werden die Bindungspartner sehr schnell gemischt. Bindet die Fluoreszenz-markierte Nukleinsäure an einen Bindungspartner (Protein oder eine andere unmarkierte Nukleinsäure), verursacht dies eine Änderung der Fluoreszenz. Die Bindungsreaktion kann somit aufgezeichnet und diese experimentellen Daten mathematisch ausgewertet werden. Analog dazu kann die Dissoziation zweier Bindungspartner detektiert werden, indem die Reassoziationsreaktion durch das Mischen mit einem Überschuss an Kompetitor verhindert wird. Alle hier vorgestellten Experimente wurden bei 25°C durchgeführt. Diese Temperatur wurde über ein Wasserbad konstant gehalten, um einen Einfluss der Temperatur auf die Messwerte auszuschließen.

Die Bindungspartner wurden in einer Konzentration getrennt voneinander in den Spritzen vorgelegt, die das Doppelte der gewünschten Endkonzentration beträgt. Die fluoreszierende Nukleinsäure wurde dabei üblicherweise auf eine finale Konzentration von 20 - 50 nM eingestellt. Die Proteine und unmarkierten Nukleinsäuren wurden in Konzentrationen von 300 - 800 nM bzw. 20 - 60 nM eingesetzt. Der Messpuffer wurde dabei passend zum Protein ausgewählt (siehe Abschnitt 3.1.6). Sollte die Assoziation eines binären Komplexes aus Ago Protein und *guide* Strang mit einem *target* Strang untersucht werden, so wurde zunächst der binäre Komplex präassembliert. Erst nach vollständiger Assoziation von binären Komplexen wurde schnell mit dem *target* Strang gemischt.

Um die Dissoziation von Komplexen zu untersuchen, wurde zunächst der Komplex aus fluoreszierender Nukleinsäure und Protein präassembliert. Dieser wurde in einer Spritze vorgelegt, während sich in der anderen Spritze ein 100x molarer Überschuss eines unmarkierten Kompetitors befand, der die Reassoziationsreaktion des Komplexes nach dessen Zerfall verhindert. Dabei wurde der Kompetitor so ausgewählt, dass keine Assoziation mit der fluoreszierenden Nukleinsäure stattfinden kann, die wiederum das Fluoreszenzsignal beeinflusst.

Die Durchführung von abweichenden Experimenten sind der Beschreibung im Ergebnisteil zu entnehmen.

Für jedes Experiment wurde eine adäquate Pufferkontrolle durchgeführt. Diese wurde von den im Assoziations- bzw. Dissoziationsexperiment gewonnenen Daten abgezogen, so dass ein Einfluss des Puffers auf die Fluoreszenz ausgeschlossen und das *quenching* des Fluorophors während der Zeit der Messung berücksichtigt werden konnte. Um weitere Messartefakte zu minimieren, wurde jede Messung in Mehrfachbestimmung durchgeführt und für die Auswertung eine Mittelung von mindestens 3 Messungen verwendet.



**Abbildung 3.3.: Aufbau der stopped flow Apparatur.** Die Bindungspartner sind in zwei verschiedenen Spritzen getrennt voneinander vorgelegt. Die Betätigung des pneumatischen Antriebs führt dazu, dass die Kolben der Spritzen hoch gedrückt werden, sodass jeweils ein definiertes Volumen (ca 50  $\mu\text{l}$ ) aus den Spritzen in die Messzelle gelangt. Der Inhalt der Messzelle wird dadurch in die Stoppspritze gepresst, was zu einer Bewegung des Kolbens der Stoppspritze führt. Dieser betätigt in der Folge den Auslöser, der Fluss aus den Spritzen wird gestoppt und die Detektion der Fluoreszenz durch den Photomultiplier (PMT) beginnt. Bis zu diesem Zeitpunkt kann keine Detektion der Bindungsreaktion erfolgen und somit bestimmt die Zeit bis zur Betätigung des Auslösers die Totzeit des Geräts. Diese beträgt für das verwendete Modell (*stopped flow SX20*, Applied Photophysics) 2 ms. Die Fluoreszenz wird angeregt durch das Licht einer Xenon-Lampe, welches mit Hilfe eines Monochromators auf die gewünschte Exzitationswellenlänge eingegrenzt werden kann. Die Detektion der Fluoreszenz wird durch einen Kantenfilter auf die Emissionswellenlänge begrenzt.

Die Daten wurden mit Hilfe der Programme Pro-Data SX und Pro-Data Viewer aufgezeichnet. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm GraFit 5.0.6 eingesetzt, welches bei der Auswahl einer adäquaten exponentiellen Gleichung assistiert. Mit Hilfe von GraFit 5 wird die gewählte exponentielle Gleichung (siehe Anhang A) an die gemessenen Datenpunkte angepasst, wodurch die Geschwindigkeitsratenkonstanten der verschiedenen Phasen der Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion (siehe Gleichung 4.1) berechnet werden können.

#### 3.3.7. Dynamische Lichtstreuung (DLS) zur Untersuchung der Aggregat-Bildung in Proteinlösungen

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann die relative Größe von Aggregaten in Lösung bestimmt werden. Die Methode basiert darauf, dass Laserstrahlen, die auf Teilchen treffen, welche im Vergleich zur Wellenlänge klein sind, zur Abgabe von Streulicht in alle Richtungen führen (Rayleigh Strahlung). Die elektromagnetische Welle induziert dabei ein Dipolmoment, indem sie die Elektronen des Moleküls anregt. Das Dipolmoment schwingt mit der elektromagnetischen Welle und sendet dadurch Licht mit der Wellenlänge des einfallenden Lichts aus. Dabei kommt es zur Interferenz des Streulichts verschiedener Moleküle. Weil monochro-



matisches kohärentes Licht verwendet wird, können durch diese Interferenzen Fluktuationen in der Streulichtintensität entstehen, da sich die Distanzen zwischen den Molekülen auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung ständig verändern. Eine Analyse der Fluktuationen über die Zeit erlaubt die Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten. Dieser wiederum wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung mit dem hydrodynamischen Radius verknüpft (siehe Anhang A). Mit Hilfe des hydrodynamischen Radius können Rückschlüsse auf das Aggregationsverhalten von Molekülen gezogen werden. Dabei ist der hydrodynamische Radius nicht mit dem realen Radius des Moleküls gleichzusetzen. Der reale Radius ist meist kleiner.

Die DLS Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des DynaPro MS/X Instruments durchgeführt. Die DLS-Quarzküvette wurde dabei konstant auf 25°C temperiert. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms DynaPro Dynamics 6.7.3. Die Verdünnung der Probe erfolgte im jeweils für das Protein geeigneten Bindungspuffer. Die Konzentrationsangaben für jede Messung finden sich im Ergebnisteil. Um vor der Messung größere Aggregate aus der Lösung zu entfernen, wurde die Probe bei 20.000 x g für 45 min bei 4°C abzentrifugiert.

### 3.3.8. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der *pulldown* Methode

Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen können mit Hilfe der *pulldown* Methode nachgewiesen werden. Diese basiert darauf, dass eines der Proteine an einen *tag* gekoppelt ist, der spezifisch an ein immobilisiertes *target* bindet und so die Aufreinigung des Proteins aus einer Lösung ermöglicht. Ebenso aufgereinigt werden mögliche Bindungspartner des Proteins. Durch eine Analyse der aufgereinigten Fraktion über SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.3.3.1) kann so nachgewiesen werden, welche Proteine miteinander interagieren können.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde hAgo2 mit einem GST *tag* verwendet, um eine Aufreinigung aller an hAgo2 gebundenen Proteine zu ermöglichen. Die Aufreinigung der an hAgo2 mit GST *tag* gebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe von Glutathion High Performance Sepharose (siehe Tabelle 3.1.3). Es sollte überprüft werden, ob die dsRNA bindenden Proteine hTRBP und hPACT mit hAgo2 ohne Zugabe von Nukleinsäure interagieren können. Dazu wurden in einem 30 µl Ansatz 8 µM hAgo2 und 8 µM hTRBP bzw. hPACT in 1 x Ago Bindungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.6) für 2 h bei 4°C drehend mit Glutathion High Performance Sepharose inkubiert. Die Glutathion High Performance Sepharose *beads* wurden zuvor durch dreimaliges Waschen mit 1x Ago Bindungspuffer äquilibriert. Nach der zweistündigen Inkubation mit den Proteinen wurden die *beads* 3 x vorsichtig mit 100 µl 1 x Ago Bindungspuffer gewaschen, 10 s anzentrifugiert und der Überstand verworfen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die *beads* wurden dann mit 20 µl hAgo2 Elutionspuffer (siehe Tabelle 3.1.6) versetzt und für 10 min bei 4°C drehend inkubiert, um die spezifisch über den GST *tag* gebundenen Proteine zu eluieren. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und die Proben mit 1x SDS Ladepuffer versetzt und für 3 min bei 95°C erhitzt. Abschließend wurde die Probe mit Hilfe von SDS-PAGE und Sypro Ruby Färbung (siehe Abschnitt 3.3.3.1) analysiert.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vorbemerkung

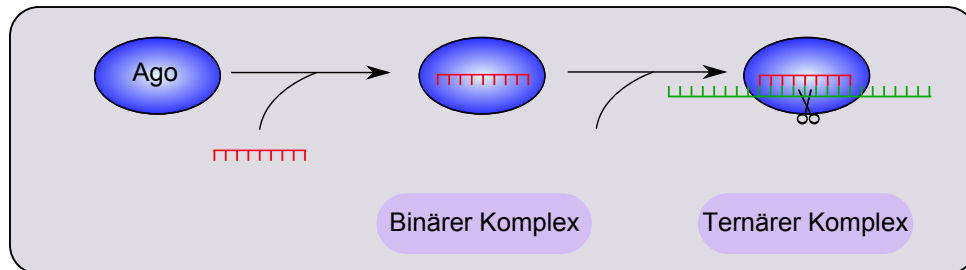
Die im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit verwendeten Expressionsplasmide für die Wildtyp Proteine hAgo2 bzw. hTRBP und hPACT (siehe Abschnitt 3.1.10.3) wurden freundlicherweise von Dr. A. Deerberg bzw. Dr. R. Kretschmer Kazemi-Far zur Verfügung gestellt. Das verwendete rekombinante hTRBP stammt aus Arbeiten von Dr. A. Deerberg. Die Sequenz für hAgo2-PAZ9 wurde freundlicherweise von Dr. S. Diedrichs (DKFZ Heidelberg) bereitgestellt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in das Expressionsplasmid pET41b-TEVThrologo kloniert. Alle anderen in dieser Arbeit vorgestellten Mutationen der Wildtyp Proteine wurden mit Hilfe von *site-directed mutagenesis* und *overlap extension* PCR in die Wildtyp Sequenzen eingebracht. Die zugehörigen Expressions- und Reinigungsprozeduren, die auch für die verschiedenen Mutanten eingesetzt wurden, wurden im Kontext der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg entwickelt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht entscheidend verändert. Der Fokus der vorliegenden Promotionsarbeit ist auf die biochemische Charakterisierung dieser Proteine und ihre Interaktionen miteinander gerichtet. Aus diesem Grund wurden sowohl die Expression als auch die Reinigung der Proteine nicht im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben. Die Daten dazu sind im Anhang der Arbeit (siehe Abschnitt B) zu finden.

### 4.2. Biochemische Charakterisierung der *guide* Strang-abhängigen Ago-vermittelten Bindung und Spaltung von *target* Strängen

Im folgenden Abschnitt wird die biochemische Charakterisierung der Ago-vermittelten Bindung von *guide* und *target* Strängen und die nachfolgende Ago-abhängige Spaltung der *target* Stränge beschrieben. Dafür werden zwei verschiedene Argonate Proteine verwendet. Dabei handelt es sich zum Einen um das humane Protein hAgo2 (siehe Abschnitt 2.3.1) und zum Anderen um das aus dem archaeeellen Organismus *M. jannaschii* stammende MjAgo (siehe Abschnitt 2.3.6). Das humane Protein nutzt RNA sowohl als *guide* als auch als *target* Substrat<sup>(125)</sup>, während MjAgo in beiden Fällen DNA verwendet<sup>(139)</sup>. Die beiden Proteine sollen hinsichtlich ihrer Fähigkeiten, an verschiedene *guide* und *target* Substrate zu binden, verglichen werden. Dies baut zunächst auf dem minimal mechanistischen Modell der siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung auf, mit dessen Entwicklung bereits Dr. A. Deerberg in ihrer Promotionsarbeit begonnen hat. In diesem Modell wird mit Hilfe einer definierten siRNA (si2b) die Kinetik der Bildung von binären und ternären Komplexen sowie die darauf folgende Spal-

#### 4. Ergebnisse

tung der *target* RNAs (siehe Abbildung 4.1) untersucht. Einige Analysen dazu sind bereits von Dr. A. Deerberg durchgeführt worden und werden in den folgenden Abschnitten der Vollständigkeit halber mit aufgelistet und zitiert. Die Charakterisierung des archaeellen MjAgo wird in Kooperation mit MSc A. Zander aus der Gruppe von Dr. D. Grohmann durchgeführt. Dieser stellt freundlicherweise das für die Analysen benötigte gereinigte Protein zur Verfügung.



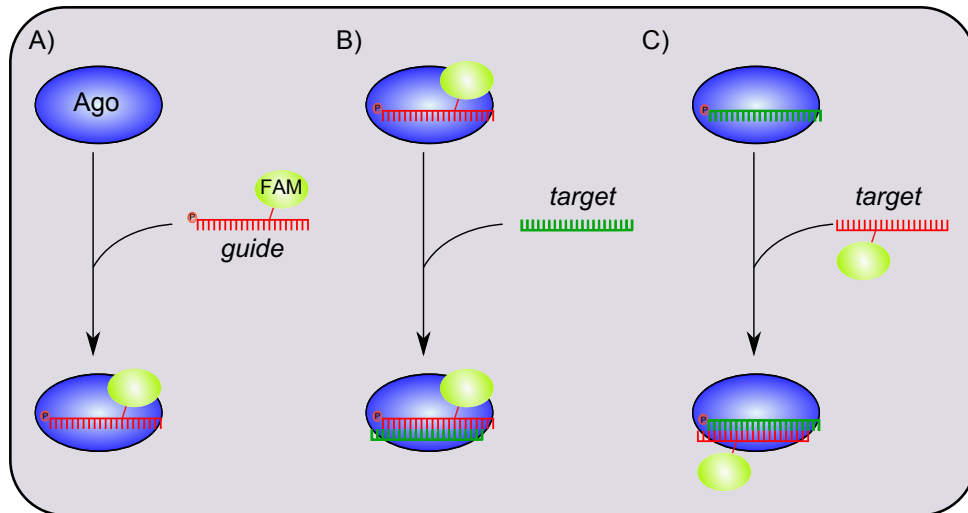
**Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung binärer und ternärer Komplexe.** Als binärer Komplex wird ein Komplex aus Ago und einzelsträngigem oder doppelsträngigem *guide* Strang bezeichnet. Dieser Komplex ist in der Lage, an ein *target* Substrat zu binden. Der entstehende Komplex aus Ago, *guide* und *target* Strang wird ternärer Komplex genannt.

Bisher wird vermutet, dass die Phosphatgruppe am 5'-Ende des *guide* Stranges essentiell für die Genauigkeit und Effizienz der Spaltung ist<sup>(58,123)</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle für die Affinität von hAgo2 für die *guide* RNA spielt<sup>(93,123)</sup>. Der Identität des 5'-Nukleotids des *guide* Stranges wird ebenfalls eine große Bedeutung für eine feste und akkurate Bindung des *guide* Stranges zugeordnet. Der NSL der Mid Domäne in Ago Proteinen eukaryotischen Ursprungs hilft bei der Unterscheidung zwischen den vier möglichen 5'-Nukleotiden<sup>(144)</sup> (siehe Abschnitt 2.3.4). Bislang wird angenommen, dass bis auf das 5'-Nukleotid die Sequenz der *guide* Stränge keinen Einfluss auf die Bindung von *guide* bzw. *target* Strang und die sich anschließende endonukleolytische Spaltung hat<sup>(146)</sup>.

Die vergleichende Analyse der beiden Ago Proteine anhand des minimalen Modells bildet in dieser Arbeit die Grundlage für die genauere Untersuchung der Bedeutung des 5'-Nukleotids und der Sequenz des *guide* Stranges für die Bildung binärer und ternärer Komplexe und die nachfolgende Spaltung eines *target* Stranges. In diesem Zusammenhang wird auch der Einfluss der *target* Strang Länge näher beleuchtet, welcher in der bestehenden Literatur kaum Bedeutung zugemessen wird.

##### 4.2.1. Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen hAgo2 und *guide* bzw. *target* RNAs

Die Bildung binärer und ternärer Komplexe mit hAgo2 wird mit Hilfe eines Fluoreszenz-basierten Systems untersucht. Dazu wurde eine RNA gewählt, welche an Position 14 mit einer FAM-Markierung versehen ist (as2b<sup>FAM</sup>). Diese Position wurde bereits im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg für eine Fluoreszenzmarkierung ausgewählt, da auf Grund von Röntgenkristallstrukturen eubakterieller Ago Proteine zu vermuten steht, dass keine Interferenz des Fluorophors mit Domänenbewegungen stattfindet<sup>(89,166)</sup>. Für die Analyse der Bildung ternärer



**Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung des für die Bindungsstudien genutzten Fluoreszenzsystems.** (A) Für die Untersuchung des binären Komplexes wurde ein 21 nt *guide* Strang mit einer Fluoreszenzmarkierung an Position 14 verwendet. Untersuchungen des ternären Komplexes wurden ebenfalls mit dieser Nukleinsäure durchgeführt. Zusätzlich wurde für die ternären Komplexe ein unmarkierter komplementärer *target* Strang eingesetzt. Dabei wurde der fluoreszenzmarkierte Strang jeweils entweder als *guide* (B) oder als *target* (C) Substrat eingesetzt.

Komplexe wurde die FAM-markierte RNA sowohl als *guide* als auch als *target* RNA eingesetzt (siehe Abbildung 4.2).

#### 4.2.1.1. Kinetische Untersuchung der *guide* RNA Bindung durch hAgo2

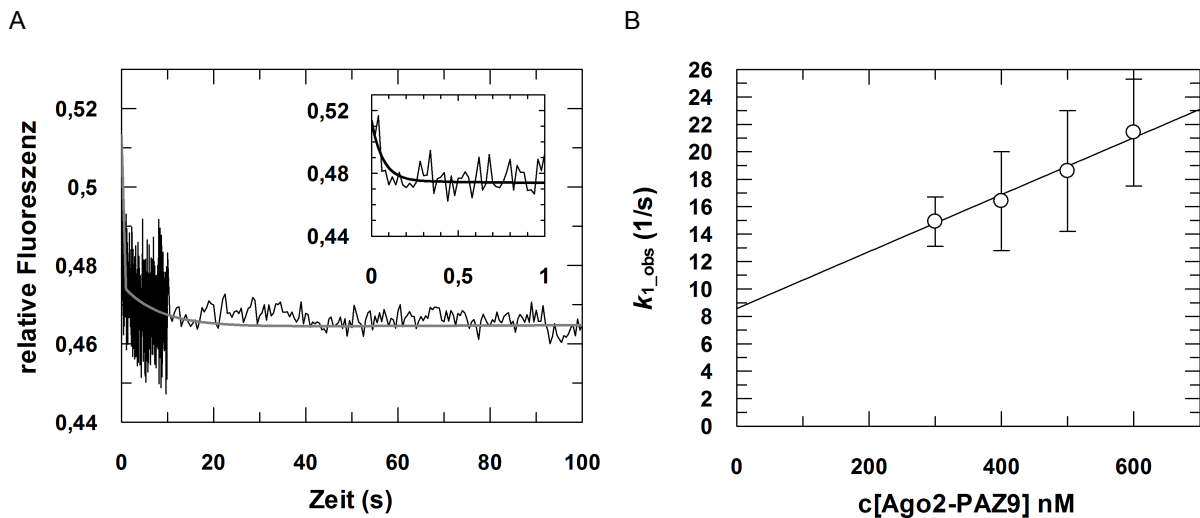
Im folgenden Abschnitt sollen die transientenkinetischen Analysen der Bildung binärer Komplexe mit verschiedenen Mutanten des hAgo2 Proteins vorgestellt werden. Im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg wurden bereits Untersuchungen zum binären Komplex mit dem Wildtyp hAgo2 Protein durchgeführt. Dabei erwies sich, dass die Bildung des binären Komplexes ein dreiphasiger Prozess ist. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der ersten Phase um die Bildung eines Kollisionskomplexes zwischen hAgo2 und *guide* RNA handelt. Dieser Schritt wird vermutlich gefolgt von der Bindung des *guide* 5'-Endes an die Mid Domäne und der konsekutiven Positionierung des *guide* Stranges in der Nukleinsäurebindungsfurche, die von der Assoziation des *guide* 3'-Endes mit der PAZ Domäne begleitet ist<sup>(218)</sup>. Um eine zweifelsfreie Zuordnung der drei Phasen zu konformationellen Änderungen, die im Rahmen der Komplexbildung stattfinden, zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit Mutanten des hAgo2 Proteins hergestellt, in denen entweder die Bindung der *guide* RNA an die Mid Domäne (hAgo2-Mid3)<sup>(123,144,151)</sup> oder die PAZ Domäne (hAgo2-PAZ9)<sup>(133,162)</sup> gestört ist.

#### Untersuchung der Bildung binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 und einzelsträngiger *guide* RNA

Mit Hilfe der *stopped flow* Methode wurde die Assoziation von hAgo2-PAZ9 und einzelsträngiger *guide* RNA untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von hAgo2-PAZ9 mit 20 nM *guide* RNA gemischt, die Fluoreszenzänderung protokolliert und mit Hilfe einer expo-

#### 4. Ergebnisse

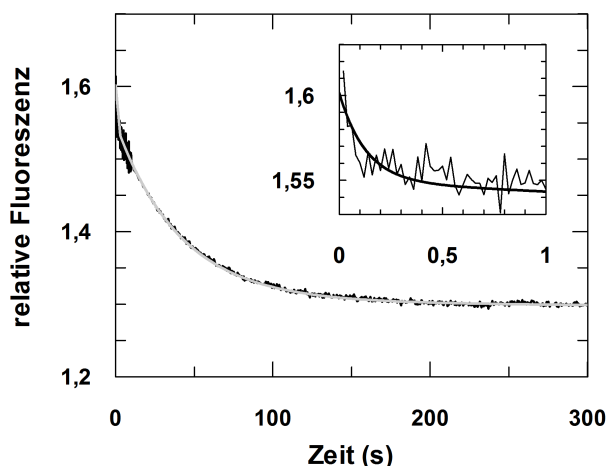
entiellen Gleichung ausgewertet. Dies ist exemplarisch in Abbildung 4.3 A dargestellt. Die Auswertung der Assoziation binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 ergab im Gegensatz zur Assoziation binärer Komplexe mit Wildtyp-hAgo2<sup>(218)</sup> einen zweiphasigen Prozess.



**Abbildung 4.3.: Pre-steady state Kinetik der Bildung binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9.** (A) Darstellung eines typischen Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 300 nM hAgo2-PAZ9 wurden schnell mit *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) gemischt. Die Daten konnten mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1$ :  $15,0 \pm 1,8 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2$ :  $0,12 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$ . (B) Lineare Abhängigkeit der in Assoziationsexperimenten beobachteten Ratenkonstanten  $k_{1\_obs}$  von der hAgo2-PAZ9-Konzentration. Es ergibt sich für  $k_1$ :  $0,2 (\pm 0,002) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{-1}$ :  $8,6 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$ .

Die Analyse der Assoziation binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 ergibt eine schnelle erste Phase, die gegen die Proteinkonzentration aufgetragen einen linearen Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Proteinkonzentration zeigt (siehe Abbildung 4.3 B). Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass diese erste Phase eine unspezifische Kollision zwischen Protein und Nukleinsäure repräsentiert. Die Steigung der Geraden ergibt dabei die Ratenkonstante zweiter Ordnung für die erste Phase der Assoziation zwischen *guide* RNA und hAgo2-PAZ9 und beträgt  $0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Eine Bestimmung der korrespondierenden Dissoziationsratenkonstante erfolgt durch den Y-Achsenabschnitt der ermittelten Gerade, welcher mit  $8,6 \text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass schon kleine Abweichungen der Assoziationsratenkonstante  $k_1$  zu einem starken Fehler in der Dissoziationsratenkonstante  $k_{-1}$  führen können. Solche Fehler werden zum Beispiel durch verstärktes Aggregationsverhalten verursacht. Die auf diese schnelle Phase folgende zweite Phase ist wesentlich langsamer und unabhängig von der Proteinkonzentration. Eine Mittelung aller Messungen der Assoziationsratenkonstante ergibt einen Wert für  $k_2$  von  $0,18 \text{ s}^{-1}$ .

Um die Dissoziation binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 zu messen, wurden zunächst binäre Komplexe aus hAgo2-PAZ9 und FAM-markierter *guide* RNA präassembliert. Diese wurden schnell mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA gemischt, um die Reassoziationsdissoziierter *guide* Stränge zu verhindern. Auch diese Daten wurden mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet (siehe Abbildung 4.4). Es ergibt sich für die Ratenkonstante  $k_{-1}$  ein Wert von  $7,8 \text{ s}^{-1}$  und für  $k_2$  ein Wert von  $0,024 \text{ s}^{-1}$ .



**Abbildung 4.4: Pre-steady state Kinetik der Dissoziation binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9.** Darstellung eines typischen Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. hAgo2-PAZ9 (500 nM) wurde mit *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) präinkubiert. Diese binären Komplexe wurden schnell mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA (as2b; 2  $\mu$ M) gemischt. Die mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewerteten Daten ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_{-1}$ :  $7,8 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-2}$ :  $0,02 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ .

Es fällt auf, dass die Signaländerung, die während der Dissoziationsexperimente gemessen wurde, wesentlich stärker ist als die Signaländerung in den Assoziationsexperimenten (siehe Abbildung 4.3 A und 4.4). Anhand der Assoziationsexperimente wurde deutlich, dass *guide* RNAs durch das mutierte hAgo2-PAZ9 nicht korrekt gebunden werden können. Im Gegensatz zur Assemblierung binärer Komplexe mit Wildtyp hAgo2 sind nur zwei an Stelle von drei Phasen der Assoziation erkennbar. Eine *guide* RNA kann somit nicht korrekt in den Nukleinsäure-Bindungskanal inkorporiert werden und lagert sich vermutlich auf der Proteinoberfläche an. Dies könnte zu einer erhöhten Aggregationsneigung binärer Komplexe führen. Die für die Verdrängungsexperimente präassemblierten binären Komplexe aus hAgo2-PAZ9 und *guide* RNAs liegen offenbar aggregiert vor. Diese Aggregate bieten der FAM-Markierung am *guide* Strang eine hydrophobe Umgebung, in der generell das Fluoreszenzsignal auf Grund der hydrophoben Eigenschaften des Fluorophors stärker ist. Im Dissoziationsexperiment wurden diese aggregiert vorliegenden binären Komplexe mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA kompetiert und so die Fluoreszenz-markierten *guide* RNAs aus dem Komplex mit hAgo2-PAZ9 verdrängt. Die Fluoreszenz-markierte *guide* RNA gelangte so in die hydrophile Pufferumgebung, was einen starken Abfall der Fluoreszenzintensität verursacht. Dies erklärt außerdem, warum sowohl für die Assoziation als auch für die Dissoziation der *guide* RNA eine Signalabnahme beobachtet werden konnte.

**Tabelle 4.1.: Zusammenfassung der pre-steady state Ratenkonstanten binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 im Vergleich zum Wildtyp hAgo2 Protein.** Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  wurde aus den gezeigten Ratenkonstanten mit Hilfe der Gleichung 4.1 bestimmt. \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

Protein	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{D\_cal}$ (nM)
hAgo2-PAZ9	$0,2 \times 10^8$	7,8	0,18	0,024	—	—	49,5
hAgo2*	$0,6 \times 10^8$	6,2	0,26	0,17	0,012	0,007	37

Im direkten Vergleich mit dem Wildtyp hAgo2 zeigt sich, dass die dritte Phase der Bildung binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 fehlt (siehe Tabelle 4.1) und die Geschwindigkeitsratenkonstante  $k_2$  für Wildtyp und Mutante nahezu identisch ist. Somit kann die dritte Phase der binären Komplexbildung zweifelsfrei der Assoziation des 3'-Endes der *guide* RNA mit der PAZ Domäne

#### 4. Ergebnisse

zugeordnet werden. Es fällt jedoch auf, dass die Rückreaktion der zweiten Phase im Fall von hAgo2-PAZ9 im Vergleich zur korrespondierenden Phase mit dem Wildtyp hAgo2 um Faktor 7 verlangsamt ist. Es steht zu vermuten, dass die Phasen der *guide* Bindung und Freisetzung jeweils konsekutiv ablaufen. Ist der *guide* Strang auf Grund der fehlenden Bindung an die PAZ Domäne anderweitig mit der basischen Oberfläche des Proteins assoziiert, wird die Dissoziation von der Mid Domäne verlangsamt.

Mit Hilfe der für die Bildung binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 bestimmten Ratenkonstanten kann mit der folgenden Formel die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) bestimmt werden:

$$K_D = \prod \frac{k_{-n}}{k_n} \quad (4.1)$$

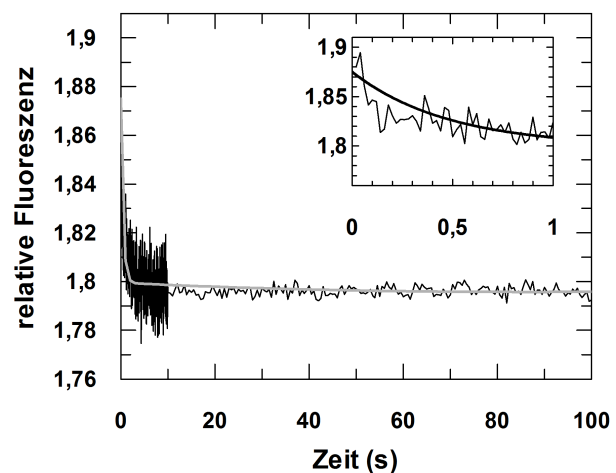
Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ist ebenfalls in Tabelle 4.1 angegeben. Es fällt auf, dass die Affinität von hAgo2-PAZ9 für *guide* RNA sich nicht signifikant von der Affinität des Wildtyp hAgo2 für *guide* RNA unterscheidet. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Daten aus der Literatur, die bereits mit *A. aeolicus* Ago gewonnen werden konnten. Rashid et al.<sup>(92)</sup> postulierten 2007, dass der *guide* Strang nur lose mit der PAZ Domäne assoziiert ist und die Bindungsenergie in der Hauptsache auf der Assoziation mit der Mid und der PIWI Domäne beruht.

#### Untersuchung der Bildung binärer Komplexe mit hAgo2-Mid3 und einzelsträngiger *guide* RNA

Auch hAgo2-Mid3 wurde mit Hilfe der *stopped flow* Methode auf die Fähigkeit, einzelsträngige *guide* RNAs zu binden, untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von hAgo2-Mid3 mit 20 nM *guide* RNA gemischt, die Fluoreszenzänderung aufgezeichnet und mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.5). Die Auswertung der Assoziation binärer Komplexe mit hAgo2-Mid3 ergab wie im Fall von hAgo2-PAZ9 im Gegensatz zur Assoziation der *guide* RNA mit Wildtyp-hAgo2<sup>(218)</sup> einen zweiphasigen Prozess.

#### Abbildung 4.5: Pre-steady state Kinetik der Bildung binärer Komplexe mit hAgo2-Mid3.

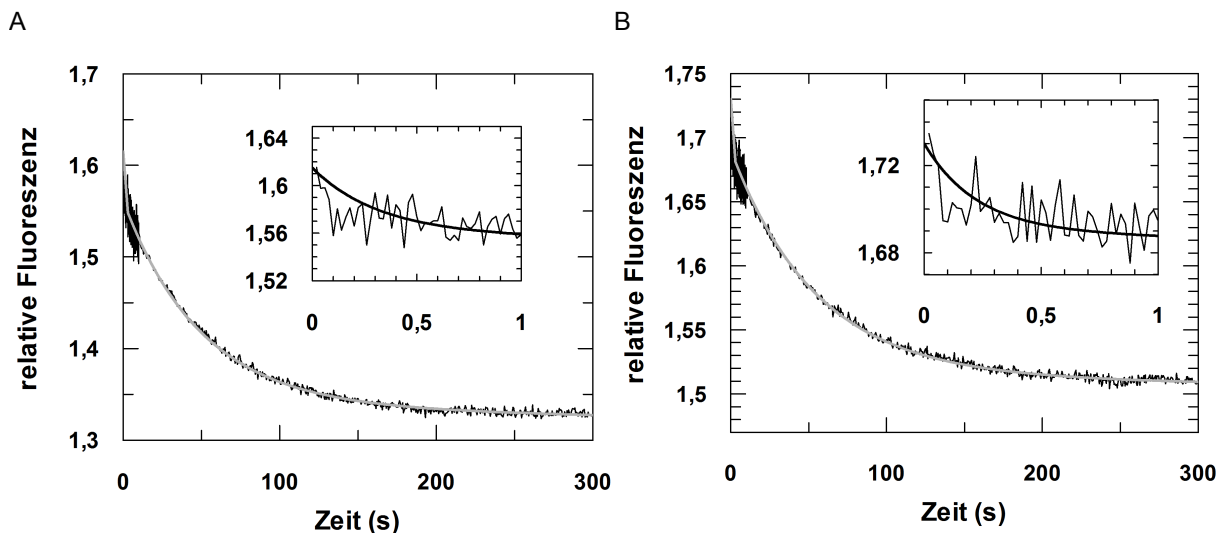
Darstellung eines typischen Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 400 nM hAgo2-Mid3 wurden schnell mit *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) gemischt. Die Daten konnten mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1$ :  $7,6 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2$ :  $0,36 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ .





Die zweifach exponentielle Auswertung der Assoziation ergab eine schnelle erste Phase. Es wurden mehrere Konzentrationen gemessen, jedoch war auf Grund starker Aggregationsprobleme eine lineare Auswertung nicht möglich. Es wird jedoch trotzdem davon ausgegangen, dass es sich bei dieser Phase um die diffusionskontrollierte Bildung von Kollisionskomplexen handelt, da die gemessenen Werte für die Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  gut mit den im Fall von hAgo2-PAZ9 bestimmten Ratenkonstanten übereinstimmen.

Überraschenderweise konnte auch eine zweite Geschwindigkeitsratenkonstante bestimmt werden (siehe Abbildung 4.5). Zunächst wurde vermutet, dass, da die Bindung an die Mid-Domäne und die PAZ-Domäne konsekutiv ablaufende Prozesse sind, keine zweite Phase zu beobachten sein dürfte. Dies ist offensichtlich nicht der Fall, was auch durch die Analyse von Dissoziationsexperimenten bestätigt wurde. Analog zu hAgo2-PAZ9 wurden Verdrängungsexperimente mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA durchgeführt. Die daraus resultierende Fluoreszenzänderung konnte ebenfalls mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden. Die aus Assoziation und Dissoziation ermittelten Ratenkonstanten sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.



**Abbildung 4.6.: Pre-steady state Kinetik der Dissoziation binärer Komplexe mit hAgo2-Mid3.** Darstellung typischer Graphen. Die Inserts zeigen jeweils einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. hAgo2-Mid3 (500 nM) wurde mit *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup> (A) bzw. OH-as2b<sup>FAM</sup> (B); 20 nM) präinkubiert. Diese binären Komplexe wurde schnell mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA (as2b; 2  $\mu$ M) gemischt. Die mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewerteten Daten ergaben folgende Ratenkonstanten: (A)  $k_{1}$ :  $3,2 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{2}$ :  $0,02 \pm 0,0005 \text{ s}^{-1}$  und (B)  $k_{1}$ :  $4,5 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{2}$ :  $0,02 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ .

Der direkte Vergleich der Bildung binärer Komplexe mit Wildtyp hAgo2 und hAgo2-Mid3 lässt erkennen, dass die zweite Phase, die mit hAgo2-Mid3 zu beobachten ist, vermutlich mit der dritten Phase der *guide* RNA-Bindung des Wildtyp Proteins korrespondiert, welche die Assoziation der *guide* RNA mit der PAZ Domäne repräsentiert.

Dissoziationsexperimente zeigen, dass auch im Falle von hAgo2-Mid3 die Signaländerung im Verlauf der Dissoziation wesentlich größer ist, als es in den Assoziationsexperimenten beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 4.6 und 4.5). Auch hier wird angenommen, dass ein verstärktes Aggregationsverhalten zu diesem Effekt führt (siehe Abschnitt 4.2.1.1).

#### 4. Ergebnisse

Die mathematische Auswertung der Dissoziation der *guide* RNA von hAgo2-Mid3 lässt erkennen, dass die zweite Phase im Vergleich zur Dissoziation des 3'-Endes von der PAZ Domäne im Wildtyp Protein beschleunigt ist. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass der *guide* Strang im mutierten Protein in einer anderen Position als im Wildtyp hAgo2 und nur an die PAZ Domäne assoziiert vorliegt, so dass eine schnellere Dissoziation ermöglicht wird.

In einem zweiten Schritt wurde ein weiteres Verdrängungsexperiment durchgeführt, um sicherzugehen, dass mit der hAgo2-Mid3 Mutante tatsächlich keine Bindung an die Mid Domäne detektiert wird. Dazu wurden binäre Komplexe präassembliert, deren *guide* RNA kein Phosphat am 5'-Ende besitzt. In Experimenten mit Wildtyp hAgo2 konnte gezeigt werden, dass die zweite Phase der Dissoziation, welche die Freisetzung des *guide* 5'-Endes aus der Mid Domäne repräsentiert, mit einem *guide* Strang ohne 5'-terminales Phosphat um Faktor 10 beschleunigt wird<sup>(218)</sup>. Die Verdrängungsexperimente mit hAgo2-Mid3 zeigen jedoch eindeutig, dass auch ohne 5'-Phosphat die zweite Phase der Dissoziation unverändert abläuft (siehe Abbildung 4.6 A und B und Tabelle 4.2). Dies lässt den Rückschluss zu, dass tatsächlich im Fall von hAgo2-Mid3 eine Assoziation der *guide* RNA mit der PAZ Domäne beobachtet werden kann. Diese Theorie wird bekräftigt durch Befunde, die mit Hilfe einer kurzen 12-mer *guide* RNA mit einer FAM Markierung an Position 12 erhoben wurden. Die Untersuchung der Assemblierung binärer Komplexe mit hAgo2 ergab mit der kurzen *guide* RNA ebenfalls einen zweiphasigen an Stelle eines dreiphasigen Prozesses. Die erste Ratenkonstante repräsentiert dabei die Kollisionskomplexbildung zwischen hAgo2 und dem kurzen *guide* Strang, während die zweite langsamere Phase in ihrer Geschwindigkeit der dritten Phase der binären Komplexbildung mit hAgo2 und einer 21-mer *guide* RNA entspricht. Die zweite Phase korrespondiert somit vermutlich wie im Fall von hAgo2-Mid3 mit der Bindung des *guide* Stranges an die PAZ Domäne (Daten nicht gezeigt). Strukturelle Bestätigung dieser Befunde erfolgt durch Röntgenkristallstrukturen des TtAgo Proteins im Komplex mit einer kurzen *guide* DNA, die zeigen, dass ein kurzer *guide* Strang an die PAZ Domäne und nicht an die Mid Domäne gebunden wird<sup>(166)</sup>. Die PAZ Domäne weist eine OB-Faltung auf, die auch unabhängig vom Nukleinsäure-Bindungskanal an RNA binden kann<sup>(159,160)</sup> (siehe Abschnitt 2.3.3).

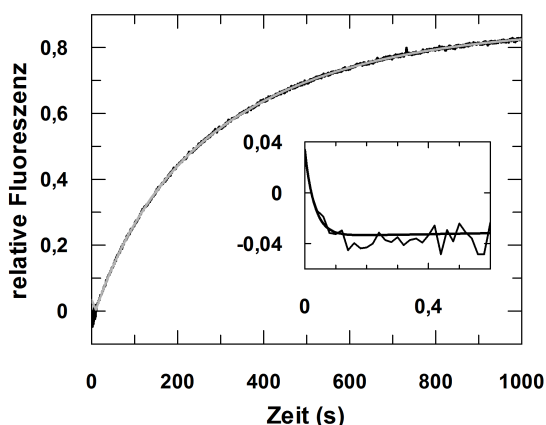
**Tabelle 4.2.: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten binärer Komplexe mit hAgo2-Mid3 im Vergleich zum Wildtyp hAgo2 Protein.** n.b. = nicht bestimmt. \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

Protein	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $s^{-1}$ )
hAgo2-Mid3	n.b.	3,2	—	—	0,004	0,02
hAgo2-Mid3 OH- <i>guide</i>	n.b.	4,5	—	—	0,004	0,02
hAgo2*	$0,6 \times 10^8$	6,2	0,26	0,17	0,012	0,007
hAgo2 OH- <i>guide</i> *	$0,6 \times 10^8$	5,5	0,16	1,7	0,01	0,009

#### 4.2.1.2. Kinetische Untersuchung der *target* RNA Erkennung und Bindung durch binäre hAgo2-*guide* RNA Komplexe

Im folgenden Abschnitt soll die *pre-steady state* Analyse der Bindung von *target* RNA an binäre Komplexe aus hAgo2 und *guide* RNA beschrieben werden. Auch hierzu wurden initiale Experimente bereits im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich bei der Assemblierung ternärer Komplexe um einen dreiphasigen Prozess handelt. Es konnte gezeigt werden, dass die erste Phase die Bildung von Kollisionskomplexen zwischen binären Komplexen und *target* RNA repräsentiert. Auf Grund der Kristallstrukturen von TtAgo wurde postuliert, dass es sich bei der zweiten Phase um die initiale Basenpaarung zwischen *guide* und *target* RNA im Bereich der *seed* Region handelt, während die dritte Phase der Freisetzung des 3'-Endes der *guide* RNA aus der PAZ Domäne und erweiterter Basenpaarung zwischen *guide* und *target* RNA entspricht<sup>(218)</sup>.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wird der Fokus insbesondere auf die eindeutige Korrelation dieser Phasen mit konformationellen Änderungen, die während der *target* RNA Bindung stattfinden, gerichtet. Dazu werden verschiedene *target* RNAs sowie eine Mutante des hAgo2 Proteins eingesetzt. Weiterhin wird die Dissoziation von *target* RNAs und Spaltprodukten näher untersucht und der Einfluss der Art des Kompetitors auf die Affinität binärer hAgo2-*guide* RNA Komplexe für *target* RNAs analysiert.

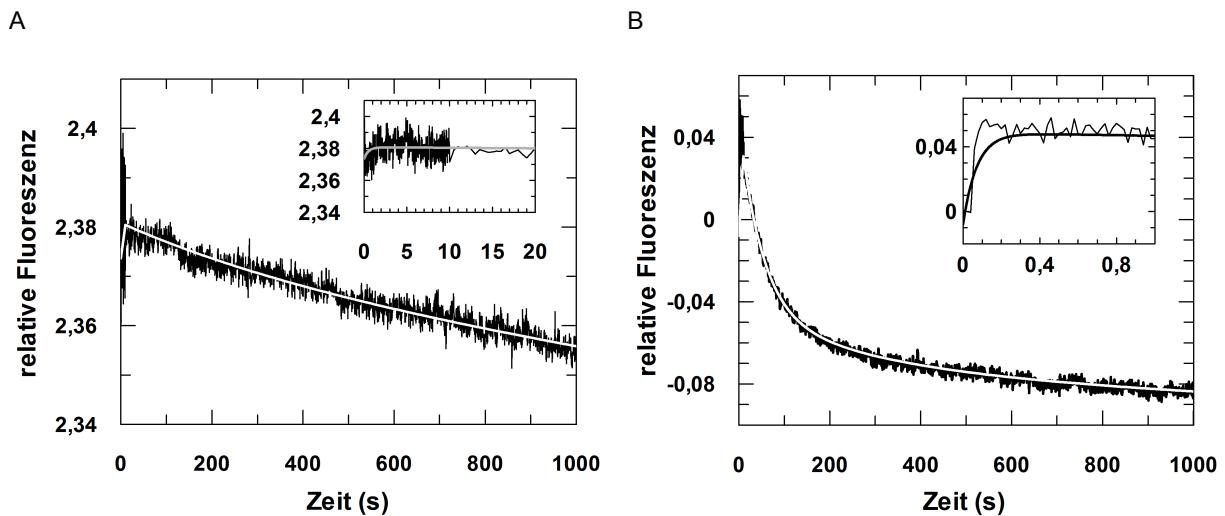


**Abbildung 4.7: Pre-steady state Assoziationskinetik der Bildung ternärer Komplexe mit hAgo2.** Darstellung eines typischen Graphen. Das Inset zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM hAgo2 wurden mit *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) präinkubiert und dann schnell mit *target* RNA (OH-s2b; 20 nM) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet und ergaben die folgenden Ratenkonstanten:  $k_1$ :  $32,3 \pm 7,5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2$ :  $0,01 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3$ :  $0,003 \pm 0,00003 \text{ s}^{-1}$ .

Für die Untersuchungen wurde die *stopped flow* Technik (siehe Abschnitt 3.3.6) eingesetzt. Alle Experimente wurden dazu bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen durchgeführt, um die Spaltung von *target* RNA zu verhindern<sup>(218)</sup>. Zunächst wurde die Assemblierung ternärer Komplexe mit Hilfe des Wildtyp hAgo2 untersucht. Die binären Komplexe wurden 10 min bei 25°C präinkubiert, um eine vollständige Assoziation von hAgo2 und *guide* RNA sicherzustellen. Um die Assoziation ternärer Komplexe zu untersuchen, wurden die binären Komplexe schnell mit *target* RNA gemischt. Die daraus resultierenden Daten konnten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.7). Die erste Phase ist sehr schnell und abhängig von der Konzentration der *target* RNA. Die Analyse der linearen Abhängigkeit von der Konzentration wurde von Dr. A. Deerberg durchgeführt und ergibt eine Ratenkonstante  $k_1 = 3,2 (\pm 0,47) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>(218)</sup>. Die darauf folgenden Phasen sind langsamer und nicht von der Konzentration abhängig. Die Assemblierung ternärer Komplexe wurde mit

#### 4. Ergebnisse

unterschiedlichen Orientierungen von *guide* und *target* RNA durchgeführt (siehe Abbildung 4.2 B und C). Dabei kommt es nicht zu Unterschieden in den Ratenkonstanten, wenn die FAM markierte RNA  $as2b^{FAM}$  statt als *guide* RNA als *target* RNA eingesetzt wird<sup>(218)</sup>.



**Abbildung 4.8.: Pre-steady state Dissoziationskinetik ternärer Komplexe mit hAgo2.** Darstellung typischer Graphen. Das Insert zeigt jeweils einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. Präassemblierte ternäre Komplexe aus 600 nM hAgo2, 20 nM *guide* RNA und 40 nM *target* RNA wurden mit 2  $\mu$ M unmarkierter *guide* (A) bzw. *target* (B) RNA kompetiert. Die Daten konnten jeweils mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden und ergaben die folgenden Ratenkonstanten: (A)  $k_{-1}$ :  $2,0 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-2}$ :  $0,003 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-3}$ :  $0,0003 \pm 0,00006 \text{ s}^{-1}$ ; (B)  $k_{-1}$ :  $13,8 \pm 6,0 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-2}$ :  $0,02 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-3}$ :  $0,004 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$ .

Die *pre-steady state* Analysen der Dissoziation ternärer Komplexe ergaben für die Freisetzung von *target* RNAs ebenfalls einen dreiphasigen Verlauf. Dazu wurden binäre Komplexe mit *target* RNA für 10 min bei 25 °C präinkubiert, um die Assoziation von ternären Komplexen sicherzustellen, und dann schnell mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* bzw. *target* RNA gemischt. Die resultierenden Daten konnten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.8). Die ermittelten Ratenkonstanten der Dissoziation in Anwesenheit eines Überschusses an unmarkierter *guide* RNA sind dabei jeweils signifikant langsamer als die für die Assoziation ternärer Komplexe ermittelten Ratenkonstanten. Dabei zeigt sich, dass die Ratenkonstante  $k_3$  den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Bildung ternärer Komplexe repräsentiert (siehe Tabelle 4.3). Mittels der Gleichung 4.1 kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für ternäre Komplexe berechnet werden. Mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 0,19 nM liegt dabei die Affinität für *target* RNAs im selben Bereich wie es auch für die Nukleinsäuren in Abwesenheit von Protein beobachtet werden konnte<sup>(218)</sup>. Somit wird offenbar die Interaktion zwischen binären Komplexen und *target* RNAs zumindestens bei kurzen *target* RNAs einzig über Watson-Crick Basenpaarung vermittelt.

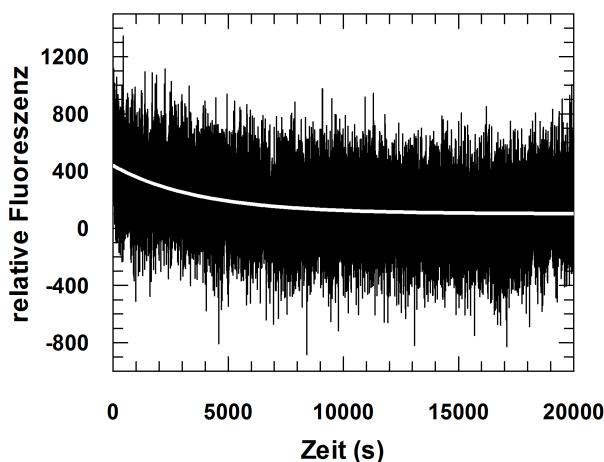
Interessanterweise zeigte sich, dass es zu einer starken Beschleunigung der Dissoziationsratenkonstanten kommt, wenn *target* RNA statt *guide* RNA als Kompetitor eingesetzt wird. Dies führt dementsprechend zu einer starken Reduktion der Affinität des ternären Komplexes für die *target* RNA (siehe Tabelle 4.3).

Die *guide* RNA kann als Kompetitor eingesetzt an *target* RNAs binden, die aus dem ternären Komplex freigesetzt werden, und somit eine Reassoziaton verhindern. Die *target* RNA als Kompetitor dagegen bindet an binäre Komplexe, die eine *target* RNA freigesetzt haben. Außerdem kann die *target* RNA möglicherweise auch mit ternären Komplexen interagieren und in einer Art „Strang-Invasions“-Mechanismus die Freisetzung von *target* RNAs beschleunigen. Die hier vorgestellten Ergebnisse, die zeigen, dass es zu einer substantiellen Beschleunigung der Dissoziation von *target* RNAs kommt, wenn ein *target* Strang als Kompetitor eingesetzt wird, deuten darauf hin, dass ein solcher „Strang-Invasions“-Mechanismus existiert. Die Affinität der ternären Komplexe für ihre *target* RNA wird signifikant erniedrigt, sodass ein erhöhter Umsatz von *target* RNA möglich ist.

**Tabelle 4.3.: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten der Assemblierung ternärer Komplexe.** Zusammenfassung der Ratenkonstanten der Assoziation und Dissoziation ternärer Komplexe bestehend aus hAgo2, *guide* RNA und *target* RNA. Entweder *guide* oder *target* RNA waren mit einem Fluorophor markiert. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wurden mit Hilfe von Gleichung 4.1 bestimmt. \* = Ratenkonstante wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

Kompetitor	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
<i>guide</i> RNA	$3,2 \times 10^8^*$	2,0	0,01	0,003	0,003	0,0003	0,19
<i>target</i> RNA		13,8		0,02		0,004	—

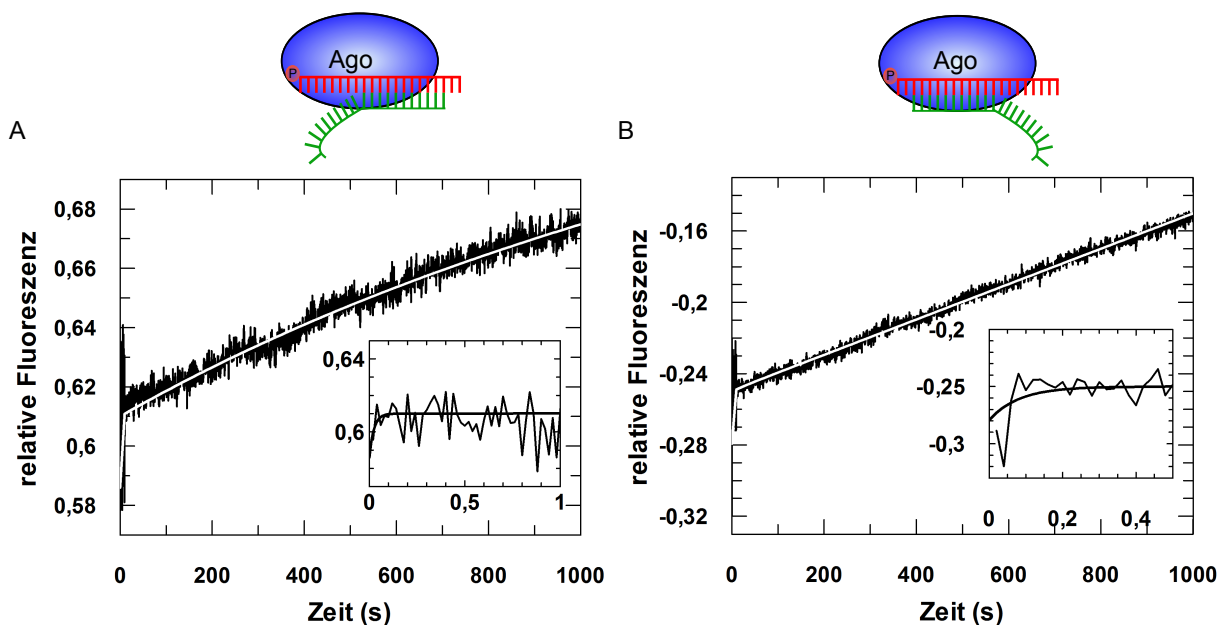
In einem weiteren Experiment wurde die Freisetzung der Spaltprodukte aus ternären Komplexen untersucht. Dazu wurden zunächst *guide* und *target* RNA prähybridisiert, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass sich auf diese Art und Weise ein möglichst hoher Anteil an Spaltprodukt mit einer ausreichenden Konzentration erzielen lässt. Der Duplex aus *guide* und *target* RNA wurde mit hAgo2 für 2 h bei 37°C mit 2 mM  $Mg^{2+}$  inkubiert, um die Bildung ternärer Komplexe und die Akkumulation von Spaltprodukten zu ermöglichen. Dieser Ansatz wurde in einer Fluoreszenzküvette mit einem 100-fachen Überschuss an unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die Änderung der Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers detektiert und mittels einer exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9: Kinetische Analyse der Produktfreisetzung aus ternären Komplexen.** Zunächst wurden *guide* RNA ( $s2b^{FAM}$ ; 40 nM) und *target* RNA ( $as2b$ ; 40 nM) prähybridisiert und 2 h mit hAgo2 ( $3\mu M$ ) bei 37°C in Spaltpuffer mit 2 mM  $Mg^{2+}$  inkubiert, um die Bildung von ternären Komplexen und die Akkumulation von Spaltprodukten zu ermöglichen. Dieser Ansatz wurde dann mit einem 100-fachen Überschuss an unmarkierter *guide* RNA ( $s2b$ ) gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben eine Ratenkonstante  $k = 0,0003 (\pm 1,7 \times 10^{-5}) s^{-1}$ .

#### 4. Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die hierdurch bestimmte Ratenkonstante von  $0,0003 (\pm 1,7 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  nahezu identisch mit der dritten Phase der Freisetzung von intakten *target* RNAs ist. Diese Phase stellt die langsamste Ratenkonstante der Dissoziation ternärer Komplexe dar. Desweiteren sind auch die anderen Phasen der Dissoziation wesentlich langsamer als die der Assoziation ternärer Komplexe (siehe Tabelle 4.3), was klar zeigt, dass es sich bei der Freisetzung der Spaltprodukte um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung handelt, wie es schon von Haley et al. <sup>(61)</sup> und Rivas et al. <sup>(58)</sup> vermutet wurde und im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg <sup>(218)</sup> diskutiert wurde. Ein identisch durchgeführtes Experiment in Abwesenheit von Protein, in welchem keinerlei Änderung des Fluoreszenzsignals beobachtet werden konnte, beweist, dass in diesem experimentellen Aufbau tatsächlich die Freisetzung von Spaltprodukten vom Protein detektiert wurde.



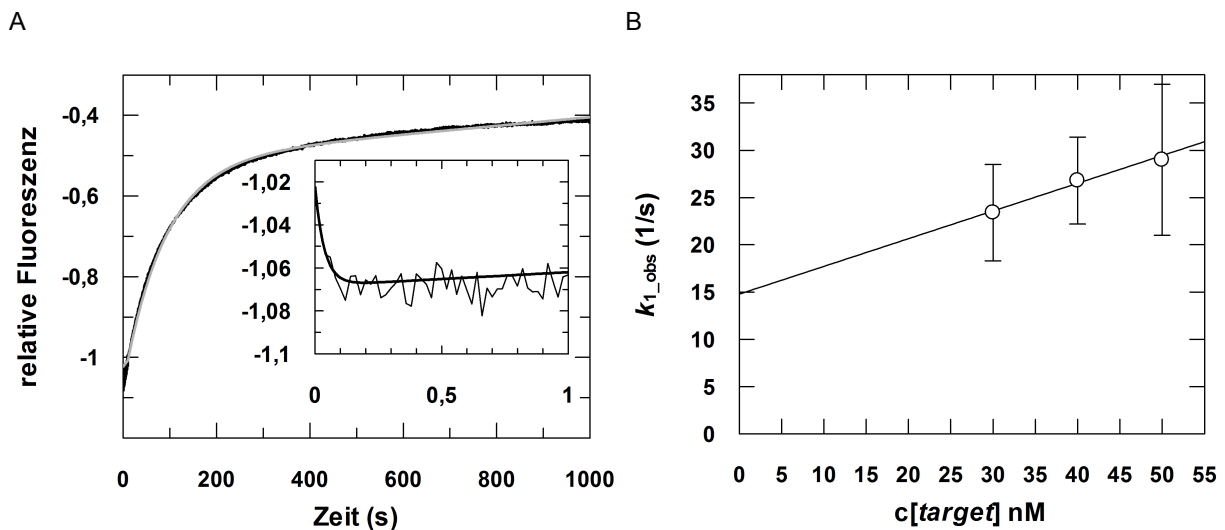
**Abbildung 4.10.: Pre-steady state Assoziationskinetik der Bildung ternärer Komplexe mit partiell fehlgepaarten *target* RNAs.** Präassemblierte binäre Komplexe aus 600nM hAgo2 und *guide* (as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) wurden schnell mit 40 nM *target* RNA gemischt, die entweder in der *seed* Region (A) oder in der 3'-Region der *guide* RNA (B) Fehlpaarungen aufweist. Die Daten konnten jeweils mit einer zweifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet werden, woraus sich folgende Ratenkonstanten ergaben: (A)  $k_1$ :  $42,6 \pm 15,4 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2$ :  $0,001 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  und (B)  $k_1$ :  $12,2 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2$ :  $0,03 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ .

Um die verschiedenen Phasen der Assoziation von *target* RNA an binäre Komplexe strukturellen Transitionen zuordnen zu können, die während der Bindung stattfinden, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. In einem ersten Experiment wurde die Assoziation der Nukleinsäuren in Abwesenheit von Protein unter *pre-steady state* Bedingungen untersucht. Daraus ergaben sich zwei Phasen, von denen die erste die Bildung eines Kollisionskomplexes zwischen *guide* und *target* repräsentiert. Die zweite Phase mit einer Ratenkonstante  $k_2 = 0,006 (\pm 1 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  beschreibt die Watson-Crick Basenpaarung zwischen *guide* und *target* RNA. Sie ist um etwa einen Faktor 2 langsamer als die zweite Phase der Assoziation ternärer Komplexe, von der vermutet wird, dass sie die Protein vermittelte Basenpaarung



zwischen *guide* und *target* RNA im Bereich der *seed* Region darstellt (siehe Tabelle 4.4). Da die *seed* Region von hAgo2 für die Interaktion mit *target* RNAs präarrangiert ist<sup>(123,151)</sup>, ist eine etwas schnellere Assoziation erwartbar. Somit ist dieses Experiment ein Hinweis darauf, dass die zweite Phase der *target* Bindung tatsächlich die Basenpaarung in der *seed* Region repräsentiert.

Um diese Hypothese in Anwesenheit von hAgo2 zu überprüfen, wurden zwei verschiedene *target* RNAs eingesetzt, von denen die eine im *seed* Bereich 10 Fehlpaarungen zur *guide* RNA aufweist, und die andere in den letzten 11 Nukleotiden der 3'-Region der *guide* RNA ungepaart ist (jeweils ohne 3'-Überhang gezählt). Beide *target* RNAs wurden jeweils schnell mit binären Komplexen gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.10). Im Vergleich zur perfekt komplementären *target* RNA fehlt also jeweils eine Phase. Dabei ist in beiden Fällen die erste Phase konzentrationsabhängig, repräsentiert also die Bildung von Kollisionskomplexen. Die Fehlpaarungen im Bereich der *seed* Region führen dazu, dass die zweite Phase der Bildung ternärer Komplexe mit vollständig komplementärer *target* RNA nicht mehr beobachtet werden kann. Eine ungepaarte 3'-Region dagegen verursacht einen Verlust der dritten Phase (siehe Tabelle 4.4). Dies deutet stark darauf hin, dass die zweite Phase mit der Basenpaarung zwischen *guide* und *target* RNA in der *seed* Region korrespondiert und die dritte Phase durch erweiterte Basenpaarung zwischen den beiden Nukleinsäuren und die dadurch notwendige Freisetzung des 3'-Endes der *guide* RNA von der PAZ Domäne verursacht wird.



**Abbildung 4.11.: Pre-steady state Kinetik der Assoziation ternärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9.**

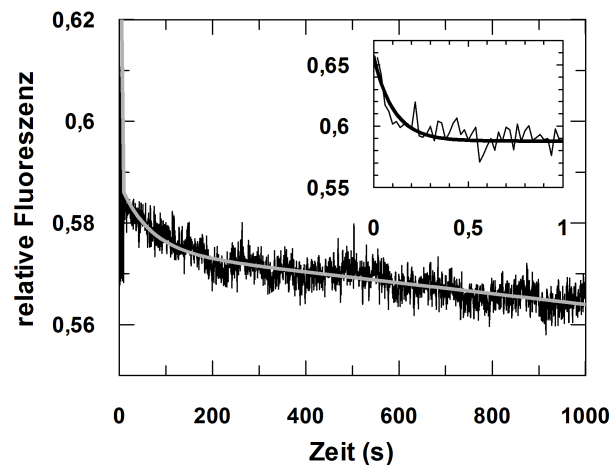
(A) Darstellung eines typischen Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. Präassemblierte binäre Komplexe aus 600 nM hAgo2-PAZ9 und *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) wurden schnell mit *target* RNA (s2b; 20 nM) gemischt. Die Daten wurden mittels einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet. Es ergab sich:  $k_1$ :  $26,9 \pm 4,6 \text{ s}^{-1}$  und für  $k_2$ :  $0,01 \pm 0,00003 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die lineare Abhängigkeit der Ratenkonstante  $k_{1,obs}$  von der Konzentration der *target* RNA ergab für  $k_1$ :  $0,3 (\pm 0,04) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{-1}$ :  $14,8 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$ .

Unterstützt werden diese Daten durch die *pre-steady state* Analysen der Bildung ternärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9. Präassemblierte binäre Komplexe aus hAgo2-PAZ9 und *guide* RNA wurden schnell mit *target* RNA gemischt. Diese Kinetik lässt sich am Besten durch eine

#### 4. Ergebnisse

zweifach exponentielle Gleichung charakterisieren (siehe Abbildung 4.11). Wieder repräsentiert die erste Phase die Bildung von Kollisionskomplexen zwischen binären Komplexen und *target* RNA. Die nachfolgende zweite Phase ist langsamer und identisch zur mit dem Wildtyp Protein beobachteten zweiten Phase. Die dritte Phase, welche mit dem Wildtyp Protein beobachtet werden kann, fehlt mit hAgo2-PAZ9. Auf Grund der Mutationen in der PAZ Domäne ist hAgo2-PAZ9 nicht befähigt, das 3'-Ende der *guide* RNA zu binden (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Diese Experimente liefern somit ein weiteres starkes Indiz dafür, dass die dritte Phase der ternären Komplexbildung der Freisetzung des *guide* 3'-Endes aus der PAZ Domäne entspricht. Es fällt auf, dass die Rückreaktion der zweiten Phase mit hAgo2-PAZ9 wesentlich schneller abläuft als die korrespondierende Phase mit dem Wildtyp hAgo2 (siehe Abbildung 4.12 und Tabelle 4.4). Dies liegt vermutlich darin begründet, dass der falsch positionierte *guide* Strang nicht in der Lage ist, korrekt an das *target* zu binden. Dies führt dazu, dass es wesentlich leichter aus dem ternären Komplex abdissoziieren kann.

**Abbildung 4.12: Pre-steady state Kinetik der Dissoziation ternärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. Präassemblierte ternäre Komplexe aus hAgo2-PAZ9 (600 nM), *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) und *target* RNA (s2b; 40 nM) wurden mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA (as2b; 2  $\mu$ M) kompetiert. Die zweifach exponentielle Auswertung der Daten ergab folgende Ratenkonstanten:  $k_{-1}$ :  $9,4 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{-2}$ :  $0,016 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ .

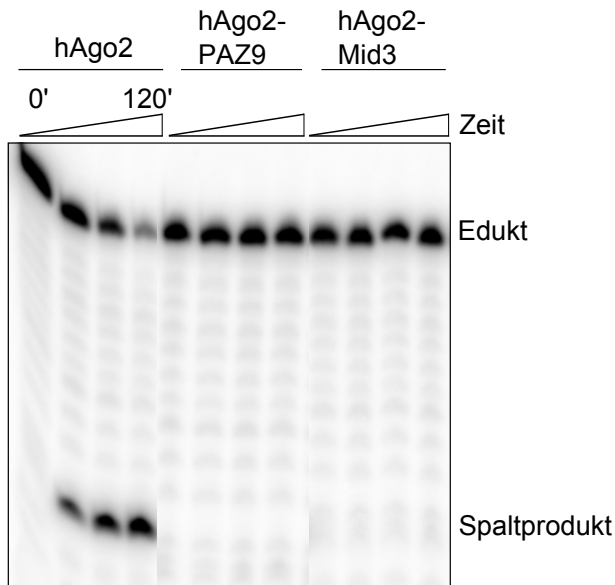


Sowohl mit hAgo2-PAZ9 als auch mit hAgo2-Mid3 wurden Spalttests durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Positionierung der Nukleinsäuren im Protein noch Spaltung zulässt (siehe Abbildung 4.13). Oben beschriebene Bindungsexperimente konnten zeigen, dass die *guide* RNA in hAgo2-Mid3 lediglich mit der PAZ Domäne assoziiert ist, während in hAgo2-PAZ9 der 5'-Bereich der *guide* bzw. *target* RNA an der richtigen Position bindet. Es konnte weder mit hAgo2-PAZ9 noch mit hAgo2-Mid3 Spaltung von *target* RNAs detektiert werden, was die in den Bindungsexperimenten getroffene Annahme unterstützt, dass *guide* und *target* RNA in keiner der beiden Mutanten vollständig korrekt positioniert sind. Für eine korrekte Positionierung der *guide* RNA und folglich auch der *target* RNA ist somit sowohl die Assoziation des 5'-Endes mit der Mid-Bindungstasche als auch die Bindung des 3'-Endes der *guide* RNA durch die PAZ Domäne essentiell. Ist der *guide* Strang nicht richtig positioniert, wird auch die *target* RNA falsch inkorporiert, was dazu führt, dass das aktive Zentrum von hAgo2 nicht in räumliche Nähe des spaltbaren Phosphats kommt. Die Ergebnisse von Bindungs- und Spaltexperimenten sind somit kongruent.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente liefern die Grundlage für die Zuordnung der durch kinetische Analysen bestimmten Phasen zu konformationellen Änderungen, die während der Bindung von *target* Strängen an binäre Komplexe ablaufen. Die biochemischen



#### 4.2. Guide Strang-abhängige Ago-vermittelte Bindung und Spaltung von target Strängen



**Abbildung 4.13: Überprüfung der katalytischen Aktivität von hAgo2-PAZ9 und hAgo2-Mid3.** Die beiden Mutanten hAgo2-PAZ9 und hAgo2-Mid3 (siehe Abschnitt 4.2.1.1 und 4.2.1.1) wurden zusammen mit hAgo2 im Standard-Spalttest getestet. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer 21 nt radioaktiv markierten *target* RNA (s2b) gestartet. Es wurden Proben nach 0', 30', 60' und 120' entnommen und anschließend mit 20% denaturierender PAGE und Detektion über Autoradiographie überprüft.

Daten werden dabei unterstützt von strukturellen Daten des humanen und des TtAgo Proteins. Kristallstrukturen des TtAgo gebunden an eine *guide* DNA zeigen, dass der *target* Strang zunächst Basenpaarungen mit der *seed* Region ausbildet. Dies ist mit kleineren konformationellen Änderungen verbunden, damit in der Nukleinsäure-Bindungsfurche genug Platz für den Duplex geschaffen wird. Das 3'-Ende des *guide* Stranges bleibt dabei mit der PAZ Domäne assoziiert<sup>(59,89,90)</sup>. Dies korreliert mit der Erkenntnis, dass die *seed* Region eine übergeordnete Rolle in der Erkennung von *target* RNAs spielt<sup>(176)</sup>. Um diese Funktion auszuführen, sind die Basen der *seed* Region sowohl in den prokaryotischen als auch in den humanen Ago Proteinen für die optimale Bindung eines *target* Stranges präorganisiert<sup>(123,151,166)</sup>. Im kinetischen Modell wird der Schritt der *seed* Basenpaarung repräsentiert durch die Ratenkonstanten  $k_2$  bzw.  $k_{-2}$ . Erst die erweiterte Basenpaarung zwischen *guide* und *target* Strang führt dazu, dass große konformationelle Änderungen im Protein stattfinden, die zu einer Freisetzung des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne führen<sup>(59,90)</sup>. Dieser Schritt entspricht im kinetischen Modell den Ratenkonstanten  $k_3$  bzw.  $k_{-3}$ .

**Tabelle 4.4.: Zusammenfassung der Analysen für die Zuordnung der Phasen ternärer Komplexbildung.** n.b. = nicht bestimmt. Fehlpa. = Fehlpaarung. \* = Ratenkonstante wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $s^{-1}$ )
hAgo2/ <i>guide</i> / <i>target</i>	$3,2 \times 10^8^*$	2,0	0,01	0,003	0,003	0,0003
<i>guide</i> / <i>target</i>	n.b.	—	0,006	—	—	—
hAgo2/ <i>guide</i> / <i>target</i> 5'-Fehlpa.	n.b.	—	—	—	0,001	—
hAgo2/ <i>guide</i> / <i>target</i> 3'-Fehlpa.	n.b.	—	0,03	—	—	—
hAgo2-PAZ9/ <i>guide</i> / <i>target</i>	$0,3 \times 10^8$	9,4	0,01	0,02	—	—

#### 4.2.1.3. Zusammenfassung der kinetischen Parameter für die Bildung binärer und ternärer Komplexe

**Tabelle 4.5.: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten der Bildung binärer und ternärer Komplexe.** Binäre Komplexe wurden aus hAgo2 und as2b<sup>FAM</sup> *guide* RNA assembliert. Für die Assemblierung ternärer Komplexe wurden diese binären Komplexe mit s2b *target* RNA assoziiert. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wurden mit Hilfe von Gleichung 4.1 bestimmt ( $K_{D\_cal}$ ) oder mit Hilfe von Gleichgewichts-Fluoreszenztitration gemessen ( $K_{D\_FT}$ ). Die Unterschiede zwischen diesen  $K_D$ 's resultieren vermutlich aus leichter Proteinaggregation, welche reduzierte Diffusionsraten verursacht und so zu einer Unterschätzung von  $k_1$  und daraus folgend höheren  $K_D$ 's führt. \* = Werte wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

$k_1$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{-2}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{-3}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{D\_cal}$ (nM)	$K_{D\_FT}$ (nM)
<b>binäre Komplexe</b>							
0,6 x 10 <sup>8*</sup>	6,2*	0,26*	0,17*	0,012*	0,007*	37*	7*
<b>ternäre Komplexe</b>							
3,2 x 10 <sup>8*</sup>	2,0	0,01	0,003	0,003	0,0003	0,19	0,2*

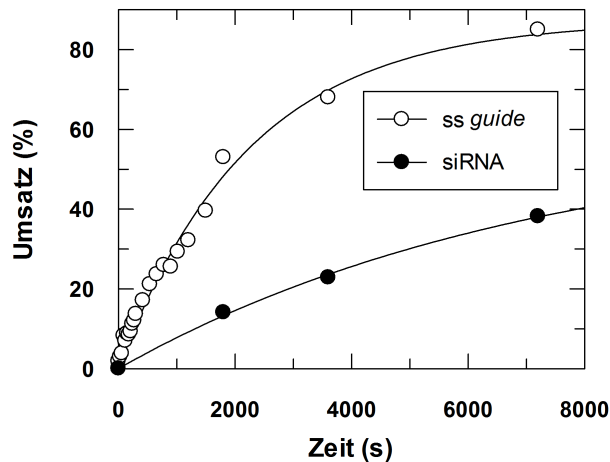
#### 4.2.1.4. Charakterisierung der hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung

Im folgenden Abschnitt soll die Charakterisierung der katalytischen Aktivität von hAgo2 beschrieben werden. Im Zuge des siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten *silencing* kommt es zur endonukleolytischen Spaltung der *target* RNAs. Diese Spaltung ist sequenzspezifisch und erfolgt immer an derselben Position gegenüber von Nukleotid 10 und 11 des *guide* Stranges<sup>(41)</sup>. Im Zellkontext bindet hAgo2 dabei an eine doppelsträngige siRNA. Der sogenannte *passenger* Strang muss also vor der Bindung an eine *target* RNA entlassen werden und wird dazu vermutlich gespalten<sup>(55,219)</sup>.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde zum Einen eine kinetische Charakterisierung der hAgo2-vermittelten Spaltung durchgeführt und zum Anderen überprüft, ob unter den gewählten Bedingungen *single turnover* oder *multiple turnover* stattfindet. Außerdem wurde die Spaltung sowohl mit einzelsträngiger als auch mit doppelsträngiger *guide* RNA untersucht und in diesem Kontext analysiert, ob die *passenger* RNA vor der Freisetzung aus dem binären Komplex gespalten wird.

Zunächst wurden die Ratenkonstanten für die hAgo2-katalysierte Spaltung von *target* RNAs nach Programmierung mit einzelsträngiger und doppelsträngiger siRNA ermittelt. Dazu wurde der Standard Spalttest durchgeführt und hAgo2 entweder mit einzelsträngiger *guide* RNA oder doppelsträngiger siRNA inkubiert, bevor die Reaktion durch die Zugabe der *target* RNA gestartet wurde. Es zeigte sich, dass entgegen anderer Befunde<sup>(58,93,104,107)</sup> rekombinantes hAgo2 mit doppelsträngiger siRNA für die *target* Spaltung programmiert werden kann. Kürzlich konnte auch eine weitere Gruppe zeigen, dass dieses möglich ist<sup>(54)</sup>. Die im Standard Spalttest erzielten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.14). Dabei zeigte sich, dass die Ratenkonstanten für die hAgo2-vermittelte Spaltung von *target* RNAs mit einzelsträngiger und doppelsträngiger RNA in der gleichen Größenordnung liegen ( $k_{cleavage} = 0,0004 \text{ s}^{-1}$  vs.  $k_{cleavage} = 0,0001 \text{ s}^{-1}$ ). Mit

#### 4.2. Guide Strang-abhängige Ago-vermittelte Bindung und Spaltung von target Strängen



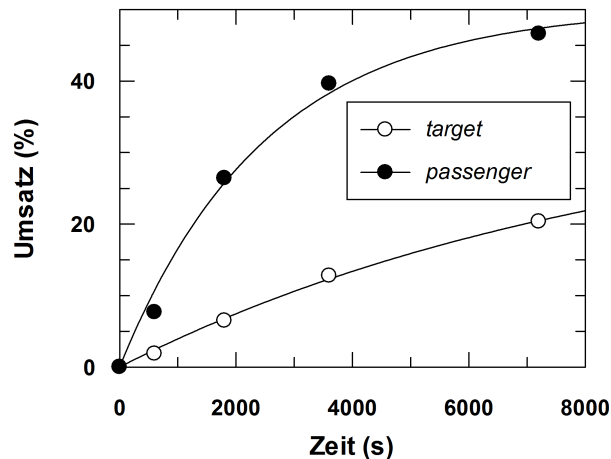
**Abbildung 4.14.: Kinetische Analyse der Spaltaktivität mit einzelsträngiger *guide* RNA und doppelsträngiger siRNA.** Im Standard Spalttest wurde entweder einzelsträngige *guide* RNA oder doppelsträngige siRNA eingesetzt, um hAgo2 für die Spaltung der 140 nt *target* RNA (ICAM IVT) zu programmieren. Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen, über 8% denaturierende PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. Für hAgo2, programmiert mit einzelsträngiger *guide* RNA, ergab sich ein maximaler Umsatz der *target* RNA von  $87,3 \pm 3,3$  % bei einer Ratenkonstante  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0004 (\pm 3 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$ . Die entsprechenden Werte für die Programmierung mit doppelsträngiger siRNA betragen  $60,4 \pm 6,7$  % und  $k_{\text{Spaltung}} = 0,0001 (\pm 2 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$ .

einzelsträngiger *guide* RNA wird etwa 30% mehr *target* RNA umgesetzt als mit doppelsträngiger siRNA. Dies hängt damit zusammen, dass beide Stränge der siRNA mit der gleichen Wahrscheinlichkeit als *guide* RNA durch hAgo2 gebunden werden können. Nur einer der beiden Stränge besitzt jedoch eine komplementäre Bindungsstelle in der *target* RNA. Wird der Strang gebunden, der keine Komplementarität zur *target* RNA aufweist, kann diese nicht gespalten werden, was den niedrigeren Umsatz mit hAgo2, welches mit doppelsträngiger siRNA programmiert wurde, erklärt.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die *passenger* RNA vor Entlassen aus dem binären Komplex gespalten wird. Dazu wurde eine siRNA hybridisiert, in der die *passenger* RNA radioaktiv markiert wurde. Auch die *target* RNA liegt radioaktiv markiert vor. In einem Spalttest wurde hAgo2 dann mit der radioaktiv markierten siRNA und *target* RNA inkubiert. Auf diese Weise konnte die Spaltung von *target* und *passenger* RNA simultan detektiert werden. Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mittels einer exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.15). Die dabei berechneten Ratenkonstanten liegen jeweils in einer ähnlichen Größenordnung. Die Spaltung der *passenger* RNA weist eine um 13 % höhere Amplitude als die Spaltung der *target* RNA auf. Die erhöhte Amplitude der *passenger* Spaltung ist damit zu erklären, dass die Spaltung und Dissoziation der *passenger* RNA die Grundvoraussetzung ist, damit *target* RNAs gebunden und gespalten werden können.

Die Ratenkonstante für die Spaltung von *target* RNAs liegt mit  $k_{\text{Spaltung}} = 0,0004 \text{ s}^{-1}$  in einer ähnlichen Größenordnung wie die oben beschriebene Ratenkonstante für die Dissoziation von Spaltprodukten mit  $k_{\text{Dissoziation}} = 0,0003 \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.9). Damit liegt der Rückschluss nahe, dass die langsame Dissoziation der Spaltprodukte auch die Rate der Spaltung limitiert,

#### 4. Ergebnisse

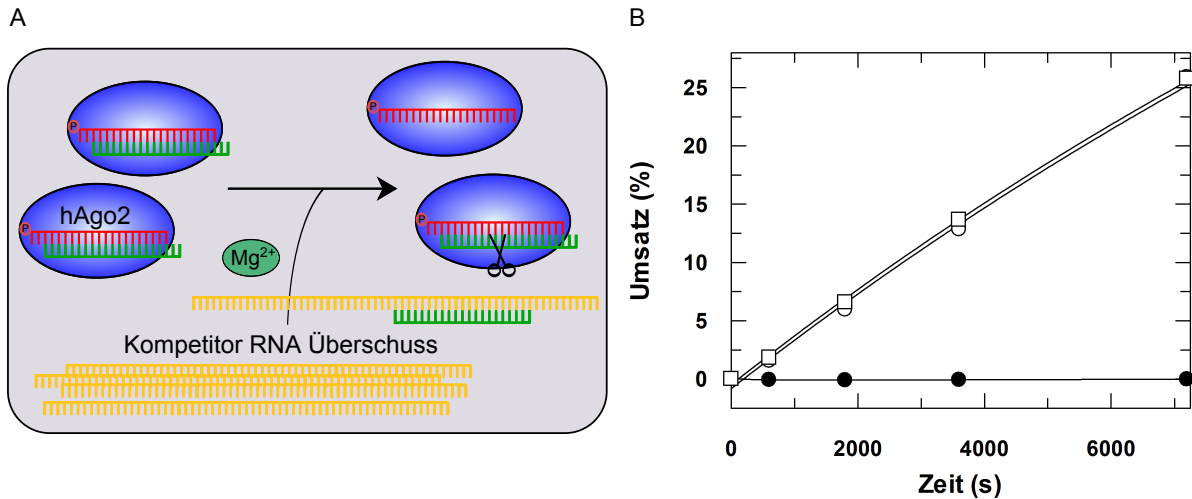


**Abbildung 4.15.: hAgo2 katalysierte Spaltung von *passenger* und *target* RNA.** Es wurde ein Standard Spalttest durchgeführt, in dem hAgo2 mit 30 nM doppelsträngiger siRNA programmiert wurde, deren *passenger* Strang radioaktiv markiert war. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,5 nM radioaktiv markierter 140 nt *target* RNA (ICAM-IVT) gestartet. Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten genommen, über denaturierende PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Autoradiographie visualisiert. Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mittels einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. Die Ratenkonstanten betragen für die Spaltung von *passenger* RNA und *target* RNA  $k_{\text{passenger}} = 0,0004 (\pm 6 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  und  $k_{\text{target}} = 0,0001 (\pm 2 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$ . Die *passenger* RNA wurde dabei zu maximal 50 % umgesetzt, während die *target* RNA zu 37 % umgesetzt wurde.

was wiederum bedeuten würde, dass unter den hier gewählten Bedingungen *multiple turnover* betrachtet wird. Um dies zu überprüfen, wurde ein Konkurrenztest durchgeführt.

Prinzipiell ist hAgo2 ein Enzym, welches befähigt ist, multiple Runden von Spaltung durchzuführen<sup>(58,60,61)</sup>. Für den Konkurrenztest erfolgte zunächst eine Inkubation von hAgo2 und *guide* RNA für 5 min bei niedriger  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration, um die Assemblierung binärer Komplexe zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurden diese binären Komplexe 5 min mit *target* RNA inkubiert. Um die Reaktion zu starten, wurde die  $\text{Mg}^{2+}$  Konzentration auf 2 mM erhöht. Es wurde ein Ansatz ohne Kompetitor RNA gestartet und ein weiterer Ansatz mit der ICAM-1-*reverse* Kompetitor RNA gemischt. Diese weist Komplementarität zur *target* RNA auf und kann somit dissoziierte *target* RNAs abfangen, was *multiple turnover* verhindert (siehe Abbildung 4.16 A). Um zu sicherzustellen, dass mögliche Effekte nicht durch erhöhtes Nukleinsäure-induziertes Aggregationsverhalten verursacht wurden, wurde ein dritter Ansatz mit einer Kompetitor RNA versehen, die keine Komplementarität zu *guide* oder *target* RNA aufweist. Die ermittelten *target* RNA Umsätze wurden mittels einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. Im Ansatz mit der komplementären Kompetitor RNA war keine Spaltung zu beobachten. Die beiden anderen Ansätze jedoch zeigten identische Umsätze (siehe Abbildung 4.16).

Dieses Ergebnis impliziert, dass in diesen Experimenten trotz der im Vergleich zur *target* RNA relativ hohen Konzentration von binären Komplexen *multiple turnover* detektiert wurde. Dies liegt daran, dass nicht alle Moleküle auch enzymatisch aktiv sind, was zum Teil auf leichte Aggregation zurückzuführen ist. Trotzdem sind diese Moleküle noch in der Lage, binäre Komplexe zu bilden, und kompetieren somit um die Substrate. Dadurch wird die Konzentration an aktiven Komplexen signifikant gesenkt, was dazu führt, dass unter den gewählten Bedingungen *multiple turnover* beobachtet wurde.



**Abbildung 4.16.: hAgo2-katalysierte target RNA Spaltung in An- und Abwesenheit einer Kompetitor RNA.** Ternäre Komplexe bestehend aus 2,5  $\mu$ M hAgo2, 100 nM guide RNA und 2,5 nM radioaktiv markierter 21 nt target RNA (s2b) wurden in 1x Ago-Spaltungspuffer mit 0,5 mM  $Mg^{2+}$  präinkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhöhung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf 2 mM in An- (ausgefüllte Kreise) oder in Abwesenheit (leere Kreise) von 1  $\mu$ M Kompetitor RNA (ICAM-1-reverse) gestartet. Eine Kontrollreaktion wurde mit einer nicht-komplementären 150-mer Poly(A)-RNA durchgeführt (leere Quadrate). Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in (A). Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen, über denaturierende PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. (B) Die Umsätze wurden ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und mittels einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. In Anwesenheit der ICAM-1-reverse Kompetitor RNA konnte keine Spaltung beobachtet werden. Die Ratenkonstanten betragen für die Spaltung in Abwesenheit von Kompetitor  $k_{Spaltung} = 0,00005 (\pm 1 \times 10^{-5}) s^{-1}$  und in Anwesenheit von unspezifischer Kompetitor RNA  $k_{Spaltung} = 0,00005 (\pm 6 \times 10^{-6}) s^{-1}$  mit korrespondierenden maximalen Umsätzen von  $90,6 \pm 17,1 \%$  und  $88,3 \pm 8,8 \%$ .

#### 4.2.2. Vergleichende Analysen der Bildung von binären und ternären Komplexen an Hand von MjAgo

Über die eukaryotischen Ago Proteine ist hinsichtlich ihrer Funktion vieles bekannt. Strukturelle Informationen stammen jedoch hauptsächlich von Proteinen aus prokaryotischen Organismen. Für das humane Ago2 Protein existieren lediglich zwei Kristallstrukturen binärer Komplexe, die zeigen, dass der Aufbau und die relative Domänenorganisation zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Ago Proteinen hoch konserviert sind. Kürzlich erschienen auch Strukturen ternärer Komplexe mit hAgo2, jedoch sind die verwendeten target RNAs maximal 11 Nukleotide lang. Einsicht in konformationelle Änderungen beim Übergang vom APO Protein zum binären Komplex und bei der Bindung und Spaltung von target Strängen wird somit bis heute hauptsächlich aus prokaryotischen Strukturen gewonnen. Obwohl über die prokaryotischen Ago Proteine strukturell viel bekannt ist, liegt deren biologische Rolle weitgehend im Dunkeln. Ein wichtiger Unterschied zwischen eukaryotischen und vielen prokaryotischen Ago Proteinen ist die Art der Nukleinsäure, die sie binden. Während die eukaryotischen Ago Proteine RNA binden, präferieren ihre prokaryotischen Gegenstücke häufig DNA.

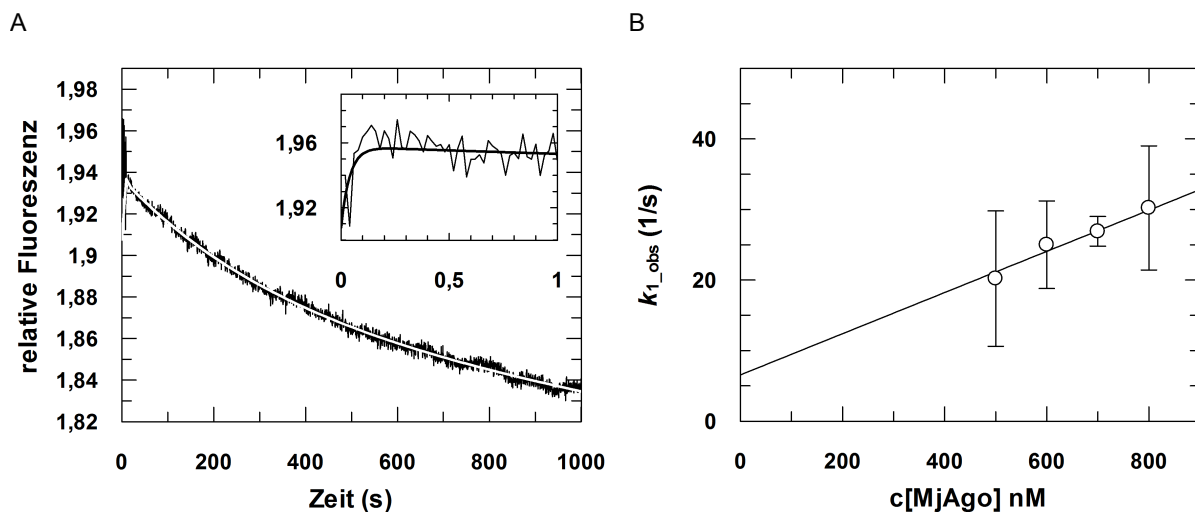
Im folgenden Abschnitt soll das prokaryotische Ago Protein aus dem Organismus *M. jannaschii* hinsichtlich der Fähigkeit, guide und target DNAs zu binden, biochemisch charakterisiert werden. Dazu wird zunächst dieselbe Sequenz verwendet, die für die biochemische Charak-

#### 4. Ergebnisse

terisierung von hAgo2 in Abschnitt 4.2.1 eingesetzt wurde, um eine vergleichende Analyse zu ermöglichen. Die FAM-Markierung ist ebenfalls an Position 14 angebracht, um eine exakte Vergleichbarkeit der Versuche zu ermöglichen (siehe Abbildung 4.2). Obwohl es sich bei *M. jannaschii* um einen thermostabilen Organismus handelt, können die Bindungsexperimente bei 25°C durchgeführt werden. Es wird mit vermehrter Aggregation gerechnet, die sich allerdings in den vorgestellten Experimenten nicht negativ auf die Bindung von Nukleinsäuren auswirkt.

##### 4.2.2.1. Kinetische Untersuchung der MjAgo-vermittelten *guide* DNA Bindung

Zunächst wurde die Bindung von MjAgo an verschiedene *guide* Substrate mit Hilfe der *stopped flow* Methode (siehe Abschnitt 3.3.6) kinetisch charakterisiert. Alle Experimente wurden bei 25°C und einer Magnesiumkonzentration von 1 mM durchgeführt. Bei dem ersten untersuchten Substrat handelte es sich um eine *guide* DNA mit einem Phosphat am 5'-Ende. 20 nM der *guide* DNA wurden mit verschiedenen Konzentrationen von MjAgo gemischt und die Fluoreszenzänderung protokolliert. Die kinetischen Daten wurden am Besten durch eine dreiphasige Gleichung beschrieben (siehe Abbildung 4.17 A). Die Ratenkonstante der ersten Phase ist sehr schnell und abhängig von der Konzentration des Proteins (siehe Abbildung 4.17 B). Die Auswertung der linearen Abhängigkeit ergab  $k_1 = 0,3 (\pm 0,005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 6,5 \pm 3,3 \text{ s}^{-1}$ . Wie bei hAgo2 repräsentiert diese Phase vermutlich die Bildung von Kollisionskomplexen zwischen MjAgo und *guide* DNA, die in ihrer Geschwindigkeit lediglich durch die Diffusion kontrolliert wird.

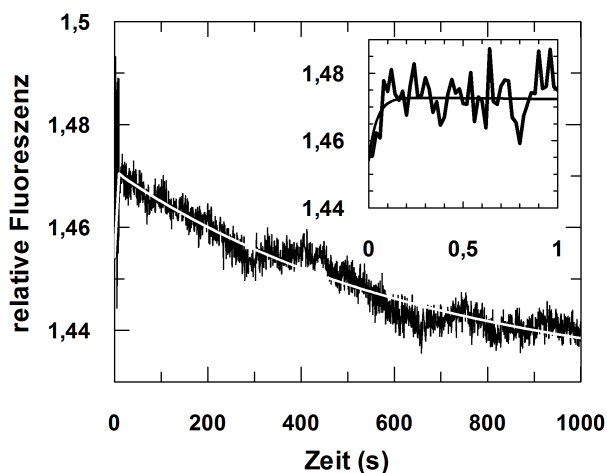


**Abbildung 4.17.: Pre-steady state Kinetik der Bindung von MjAgo an *guide* DNA.** (A) Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden schnell mit *guide* DNA (20 nM; D-as2b<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1$ :  $25,0 \pm 6,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2$ :  $0,23 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3$ :  $0,003 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Auswertung der linearen Abhängigkeit  $k_{1\_obs}$  von der Proteinkonzentration. Es ergab sich für  $k_1 = 0,3 (\pm 0,005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{-1} = 6,5 \pm 3,3 \text{ s}^{-1}$ .

Die zwei Phasen, die auf die Bildung des Kollisionskomplexes folgen, sind langsamer und unabhängig von der Konzentration des Proteins. Analog zur binären Komplexbildung mit hAgo2 sind diese Phasen vermutlich der Assoziation des *guide* 5'-Endes mit der Mid-Bindungstasche

und der nachfolgenden Verankerung des 3'-Endes in der PAZ Domäne zuzuordnen. Es konnte für die zweite Phase eine Ratenkonstante von  $k_2 = 0,23 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden und für die dritte Phase ergab sich  $k_3 = 0,003 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . Ein Vergleich dieser Ratenkonstanten mit denen, die für die Assoziation binärer Komplexe mit hAgo2 bestimmt wurden, zeigt, dass insbesondere  $k_2$  sehr gut übereinstimmt (siehe Tabelle 4.6). Die dritte Ratenkonstante  $k_3$  jedoch ist um einen Faktor 4 langsamer als die korrespondierende Phase mit hAgo2. Dies kann zum Einen daran liegen, dass die PAZ Domäne des MjAgo Proteins im Vergleich zum humanen Gegenstück weiter nach innen gedreht ist und somit eine Rotation der PAZ Domäne verlangsamt ist. Zum Anderen ist denkbar, dass das Substrat eine Rolle spielen könnte. Obgleich MjAgo DNA verwendet und hAgo2 RNA präferiert, so ist doch die Struktur der PAZ Domäne ähnlich, was die langsamere Assoziation mit DNA erklären könnte.

Um zu überprüfen, ob die Tatsache, dass es sich bei dem *guide* Strang um DNA handelt, zur Verlangsamung der dritten Phase, welche die PAZ Assoziation des *guide* Strang 3'-Ende repräsentiert, beiträgt, wurde die Assoziation von hAgo2 und *guide* DNA untersucht. Dazu wurde *guide* DNA mit hAgo2 gemischt und die Signaländerung protokolliert. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.18). Die zweite Phase ist mit einer Ratenkonstante von  $k_2 = 0,25 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$  kongruent mit dem für RNA bestimmten Wert. Die dritte Phase weicht allerdings ab. Mit einer Ratenkonstante von  $k_3 = 0,002 \pm 0,0006 \text{ s}^{-1}$  entspricht sie dem Wert, der für die dritte Phase der Assoziation von *guide* DNA und MjAgo bestimmt wurde und ist somit um Faktor 4 langsamer als die korrespondierende Phase mit hAgo2 und RNA. Nicht die kompaktere Organisation der Domänen, sondern das DNA Substrat führt also zu einer langsameren Assoziation mit der PAZ Domäne. Die Struktur der PAZ Domäne scheint demnach eine schnellere Bindung von RNA Substraten zu ermöglichen, obwohl Interaktionen mit den für RNA spezifischen 2'-OH-Gruppen nur im Bereich der *seed* Region mit der Mid, PIWI und L1 Domäne zu beobachten sind<sup>(111,123)</sup>. Wechselwirkungen zwischen der PAZ Domäne und den 2'-OH-Gruppen finden nicht statt<sup>(145,160)</sup>. Vermutlich ermöglicht die besondere helikale Konformation der RNA eine im Vergleich zur DNA schnellere Assoziation.

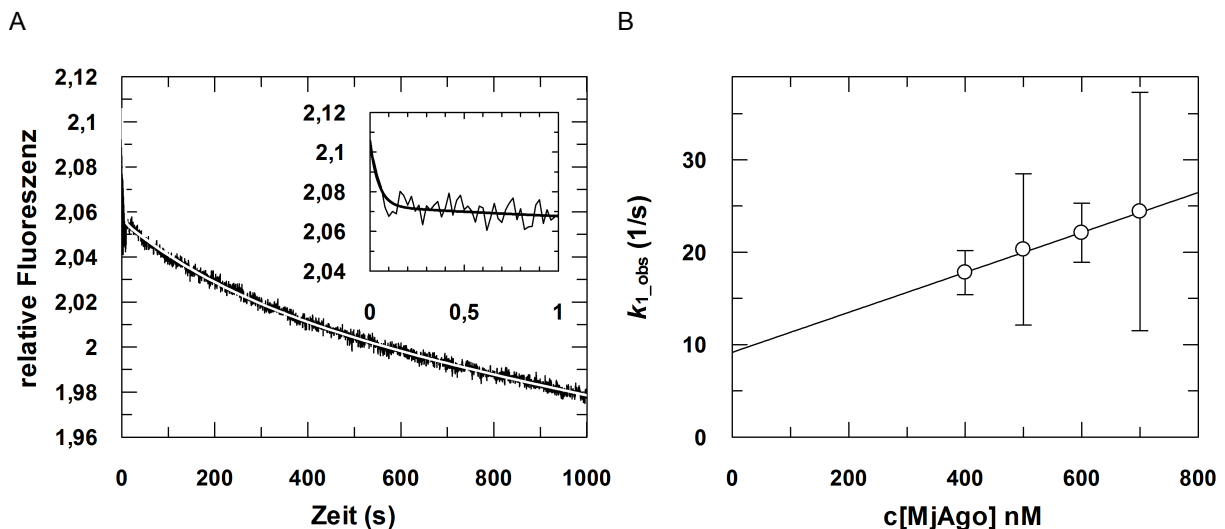


**Abbildung 4.18: Pre-steady state Kinetik der Assoziation von hAgo2 mit *guide* DNA.** Darstellung eines typischen Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 500 nM hAgo2 wurden schnell mit *guide* DNA (D-as2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben die folgenden Ratenkonstanten:  $k_1: 23,5 \pm 3,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2: 0,25 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3: 0,002 \pm 0,0006 \text{ s}^{-1}$ .



#### 4. Ergebnisse

Als nächstes wurde ein Substrat ohne Phosphatgruppe am 5'-Ende eingesetzt. Auch dieses Substrat wurde in einer Konzentration von 20 nM mit verschiedenen Konzentrationen MjAgo gemischt. Die Fluoreszenzänderung wurde protokolliert und die Daten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.19). Die erste Phase ist wieder schnell und konzentrationsabhängig und repräsentiert somit vermutlich die diffusionskontrollierte Bildung von Kollisionskomplexen. Es zeigte sich, dass das fehlende 5'-Phosphat keine Auswirkungen auf die Assoziationsratenkonstanten hat. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen der Assoziation binärer Komplexe mit hAgo2 (siehe Tabelle 4.6). Auch mit dem Substrat, dem das Phosphat am 5'-Ende fehlt, ist die dritte Phase mit MjAgo vergleichsweise langsam (siehe oben).

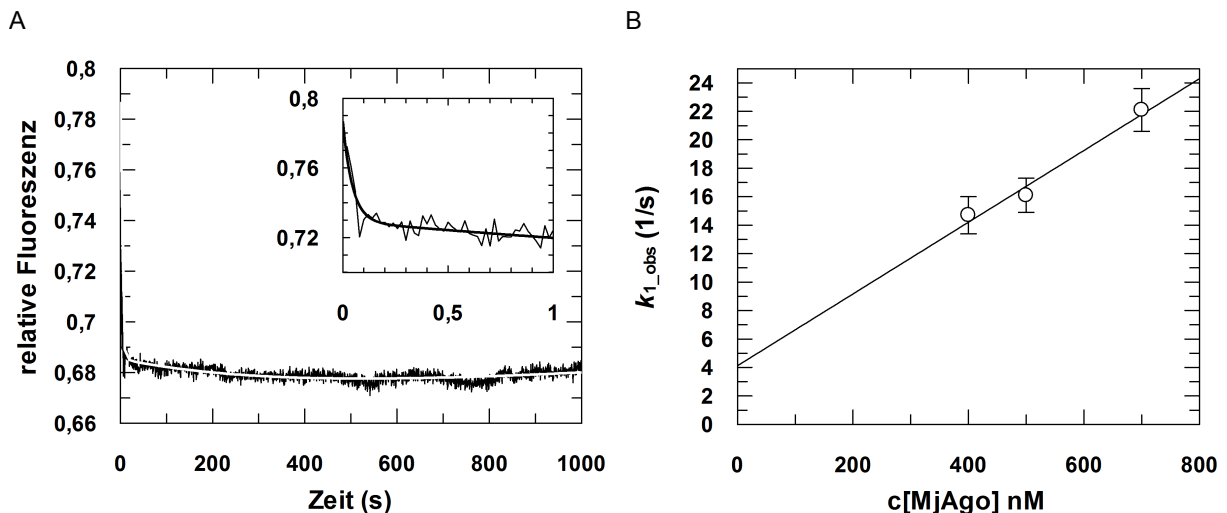


**Abbildung 4.19.: Pre-steady state Kinetik der Bindung von MjAgo an unphosphorylierte guide DNA.** (A) Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion auf einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden schnell mit *guide* DNA (20 nM; OH-D-as2b<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1$ :  $22,1 \pm 3,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2$ :  $0,34 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3$ :  $0,003 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Auswertung der linearen Abhängigkeit  $k_{1\_obs}$  von der Proteinkonzentration. Es ergibt sich für  $k_1 = 0,2 (\pm 0,0006) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{-1} = 9,2 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ .

Die *guide* DNA wurde in einem nächsten Schritt mit einer *passenger* DNA zur siDNA hybridisiert. Der Erfolg der Hybridisierung wurde mittels nativer PAGE überprüft. Für die Assoziationskinetik wurden 20 nM siDNA mit verschiedenen Konzentrationen MjAgo gemischt und die Fluoreszenzänderung protokolliert. Die Daten konnten analog zu den einzelsträngigen Substraten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.20). Die lineare Auswertung der Ratenkonstanten für die erste Phase in Abhängigkeit von der Konzentration ergab eine Ratenkonstante von  $k_1 = 0,3 (\pm 0,005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und ist somit nur wenig schneller als die für einzelsträngige Substrate bestimmte Ratenkonstante. Die zweite und die dritte Ratenkonstante sind ebenfalls nahezu identisch zu den für einzelsträngige Substrate bestimmten korrespondierenden Ratenkonstanten. Hier unterscheidet sich MjAgo von seinem humanen Gegenstück. Mit hAgo2 kommt es bei der Bindung doppelsträngiger Substrate zu einer Verdoppelung der zweiten Ratenkonstante und die dritte Ratenkonstante beschleunigt sich um Faktor 3. Dies könnte wiederum auf das Substrat zurückzuführen sein. Obwohl proka-



ryotische Ago Proteine präferentiell an DNA binden, tun sie dies nicht in der für DNA typischen B-Form Helix. Im Protein liegt der Duplex in einer Helix Form vor, die eher der A-Form Helix, die für RNA typisch ist, entspricht<sup>(59)</sup>. In Lösung liegt der siDNA Duplex in B-Form vor und muss also durch die Assoziation mit Ago in die A-Form gebracht werden. Dies könnte dazu führen, dass die zweite Phase und dritte Phase mit einem DNA Hybrid langsamer sind als mit einem RNA Hybrid und hAgo2. Ein Einfluss auf die Substratauswahl von MjAgo ist dadurch allerdings nicht zu beobachten. Assoziationsexperimente zeigen, dass MjAgo einen RNA *guide* nicht korrekt binden kann. Es ergibt sich ein zweiphasiger Verlauf mit einer schnellen ersten Ratenkonstante und einer langsameren zweiten Ratenkonstante, deren Geschwindigkeit der PAZ Assoziation des *guide* Stranges mit hAgo2 entspricht. Es steht also zu vermuten, dass eine *guide* RNA mit MjAgo kollidiert und mit dessen PAZ Domäne interagieren kann. Im C-terminalen Bereich des Proteins findet jedoch offenbar keine Bindung statt (Daten nicht gezeigt). In dieser Region scheint also die Unterscheidung zwischen DNA und RNA stattzufinden. Die zusätzliche 2'-OH Gruppe der RNA könnte das Ausschlusskriterium darstellen. Obwohl die für RNA typische A-Form präferiert wird, gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass RNA Substrate toleriert werden.



**Abbildung 4.20.: Pre-steady state Kinetik der Bindung von MjAgo an doppelsträngige siDNA.** (A) Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 700 nM MjAgo wurden schnell mit siDNA (20 nM; D-si2b) gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1$ :  $22,1 \pm 1,5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2$ :  $0,24 \pm 0,004 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3$ :  $0,003 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Auswertung der linearen Abhängigkeit  $k_{1,obs}$  von der Proteinkonzentration. Es ergibt sich für  $k_1 = 0,3 (\pm 0,005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{-1} = 4,1 \pm 2,4 \text{ s}^{-1}$ .

Ein Vergleich der Assoziationsratenkonstanten binärer MjAgo-*guide* DNA Komplexe mit denen, die mit Hilfe von hAgo2 bestimmt werden konnten, zeigt, dass die Proteine sich in ihren Eigenschaften bezüglich der Bindung insbesondere von einzelsträngigen *guide* Substraten ähneln.

Somit stellt MjAgo ein attraktives Modellsystem dar, um verschiedene *guide* Stränge auf ihre Bindung an Ago Proteine zu testen. Da MjAgo DNA statt RNA nutzt, kommt es zu einer großen Kostenersparnis. Die Dissoziation der binären Komplexe konnte allerdings mit allen drei

#### 4. Ergebnisse

Substraten auf Grund eines verstärkten Aggregationsverhaltens von MjAgo in Anwesenheit größerer Mengen von Nukleinsäure bei 25 °C nicht gemessen werden.

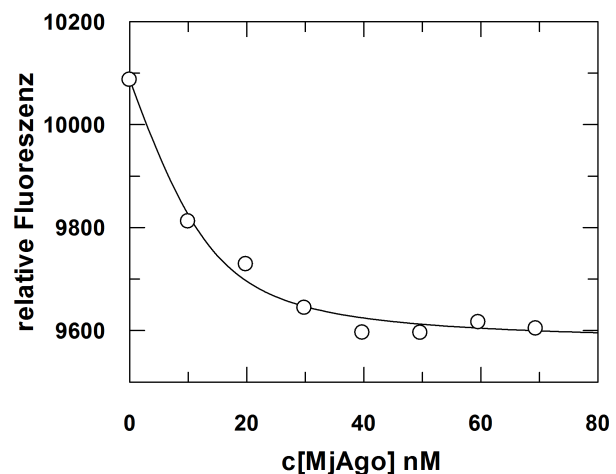
**Tabelle 4.6.: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten der Bildung binärer Komplexe mit MjAgo und hAgo2.** \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

Substrat/Protein	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )
D-as2b/MjAgo	$0,2 \times 10^8$	0,25	0,003
as2b/hAgo2*	$0,6 \times 10^8$	0,26	0,012
OH-D-as2b/MjAgo	$0,2 \times 10^8$	0,22	0,003
OH-as2b/hAgo2*	$0,6 \times 10^8$	0,16	0,01
D-si2b/MjAgo	$0,3 \times 10^8$	0,23	0,003
si2b/hAgo2*	$1,2 \times 10^8$	0,48	0,03

#### 4.2.2.2. Bestimmung der Affinität von MjAgo für verschiedene *guide* Substrate

Mit Hilfe von Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen wurde die Affinität von MjAgo für verschiedene Substrate bestimmt. Dies war mit einigen Substraten relativ problematisch. Je niedriger die potentielle Affinität ist, desto stärker zeigte MjAgo Aggregationsprobleme. Dies führte schon in den transienten Bindungsexperimenten dazu, dass keine Verdrängungsexperimente zur Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten durchgeführt werden konnten.

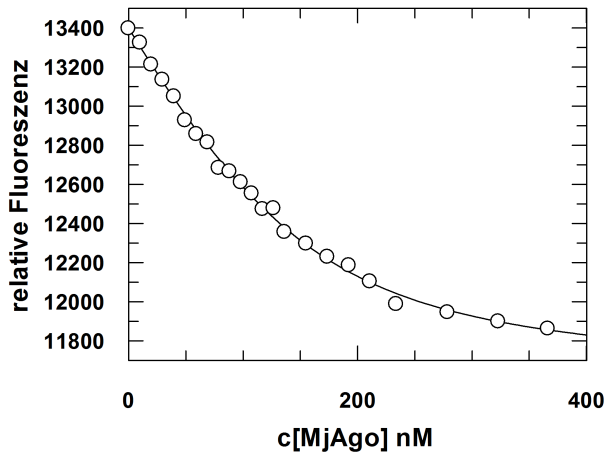
**Abbildung 4.21: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von MjAgo für *guide* DNA.** 20 nM *guide* DNA (D-as2b<sup>FAM</sup>) wurden mit steigenden Konzentrationen MjAgo titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die MjAgo-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $3,1 \pm 0,9$  nM und eine berechnete *guide* Konzentration von  $13,3 \pm 3,1$  nM.



Zunächst wurde die Affinität von MjAgo für einzelsträngige *guide* DNA gemessen. Dazu wurden 20 nM *guide* DNA mit MjAgo titriert (siehe Abbildung 4.21). Die Auswertung der Titrationskurve mit einer quadratischen Bindungsgleichung ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D = 3,1$  nM. Die berechnete Konzentration der *guide* DNA liegt in der gleichen Größenordnung wie die tatsächlich eingesetzte *guide* DNA, was ein Indiz für die Verlässlichkeit der Messung ist.

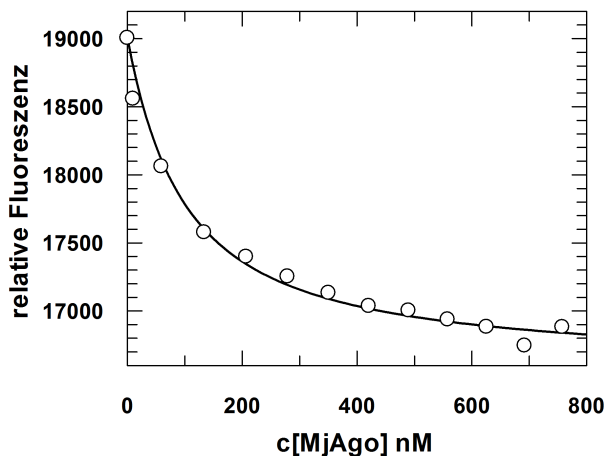
Die Affinität von MjAgo zu einer unphosphorylierten *guide* DNA wurde mit Hilfe einer Gleichgewichtsfluoreszenztitration mit 30 nM OH-D-as2b<sup>FAM</sup> bestimmt. Die Auswertung der Titrationskurve mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D = 39,4$  nM (siehe Abbildung 4.22). Damit ist die Affinität von MjAgo zu

einem unphosphorylierten *guide* Strang wesentlich niedriger als zu einem Strang, der am 5'-Ende ein Phosphat trägt. Allerdings ist dieser Wert mit Vorsicht zu behandeln. Die gleichzeitige



**Abbildung 4.22: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von MjAgo für unphosphorylierte *guide* DNA.** 30 nM unphosphorylierte *guide* DNA (OH-D-as2b<sup>FAM</sup>) wurden mit steigenden Konzentrationen MjAgo titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die MjAgo-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $39,4 \pm 2,6$  nM und eine berechnete *guide* Konzentration von  $149 \pm 6$  nM.

Berechnung der Konzentration der eingesetzten *guide* DNA ergab einen Wert, der 5 x höher war als die tatsächlich eingesetzte Menge. Vermutlich ist die Affinität noch etwas geringer als hier bestimmt. Durch eine instabile Bindung an den *guide* Strang kommt es zu einer verstärkten Aggregation des Proteins, welche die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante verfälschen kann. Die Festsetzung der eingesetzten Konzentration auf 30 nM führt zu einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D = 130$  nM. Es steht also zu erwarten, dass sich die tatsächliche Gleichgewichtsdissoziationskonstante im Bereich zwischen 39 und 130 nM bewegt.



**Abbildung 4.23: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von MjAgo für siDNA.** 20 nM siDNA (D-si2b<sup>FAM</sup>) wurden mit steigenden Konzentrationen MjAgo titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die MjAgo-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $102,0 \pm 6,6$  nM bei einer fixierten siDNA Konzentration von 20 nM.

Ähnlich verhält es sich mit der doppelsträngigen siDNA. Auch hier wurde durch Titration von 20 nM si2b<sup>FAM</sup> mit MjAgo eine Titrationskurve erstellt. Die Auswertung mit einer quadratischen Bindungsgleichung ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 102,0$  nM. Eine doppelsträngige siDNA wird somit wesentlich schlechter gebunden als eine unphosphorylierte einzelsträngige DNA. Dies ist auch an dem im Vergleich zur unphosphorylierten DNA nochmals verstärkten Aggregationsverhalten von MjAgo zu erkennen. Um eine sinnvolle Konzentration eingesetzter *guide* DNA zu erhalten, war es notwendig, diesen Parameter in der Gleichung zu fixieren. Möglicherweise weicht also die tatsächliche Gleichgewichtsdissoziationskonstante et-

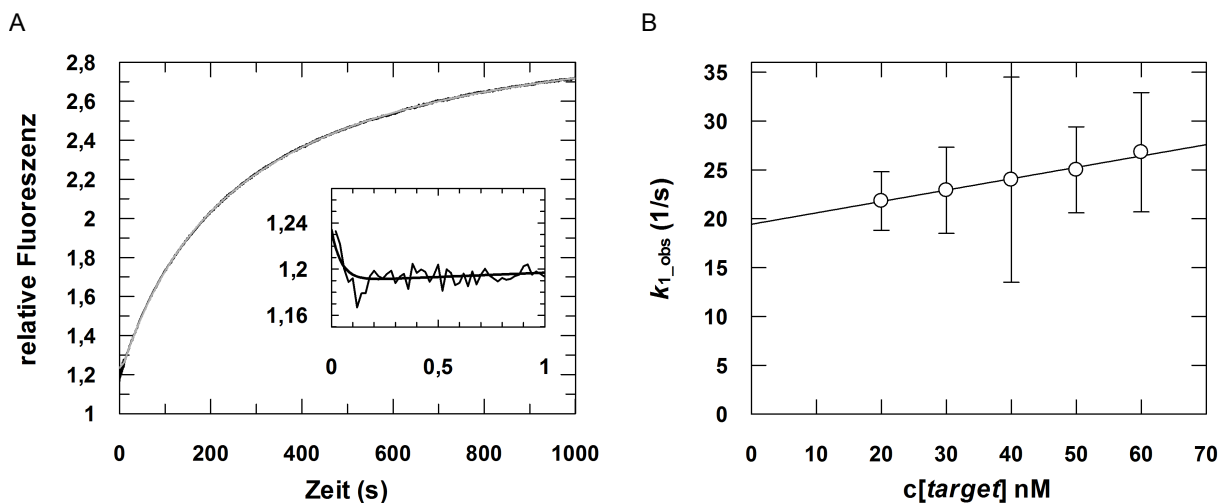
#### 4. Ergebnisse

was ab. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den mit hAgo2 durchgeführten Messungen, in denen sich zeigte, dass hAgo2 ein doppelsträngiges Substrat fester bindet als ein unphosphoryliertes einzelsträngiges Substrat<sup>(218)</sup>.

Insgesamt gesehen zeigen die Gleichgewichtsmessungen, dass eine unphosphorylierte ebenso wie eine doppelsträngige siDNA wesentlich schlechter gebunden wird als ein phosphorylierter Einzelstrang. Assoziationsexperimente zeigten, dass die Ratenkonstanten für die Bindung aller drei Substrate nahezu identisch sind. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Dissoziationsratenkonstanten entsprechend unterschiedlich sind. Experimente mit hAgo2 konnten zeigen, dass die zweite Phase der Dissoziation, die die Freisetzung des Substrates aus der Mid Domäne repräsentiert, hierbei die größten Differenzen aufweist<sup>(218)</sup>.

##### 4.2.2.3. Kinetische Untersuchung der *target* DNA Bindung durch binäre MjAgo-*guide*-Komplexe

Im folgenden Abschnitt wird die Bindung von *target* DNA durch binäre MjAgo-*guide* DNA Komplexe beschrieben und mit den für hAgo2 erhobenen Daten verglichen. Alle Experimente wurden bei 25°C und einer Magnesiumkonzentration von 1 mM durchgeführt. Im Gegensatz zu hAgo2 muss nicht auf eine niedrige Magnesiumkonzentration geachtet werden, da eine Spaltung der *target* DNA erst bei 85°C beobachtet werden kann<sup>(139)</sup>. Die Experimente wurden mit Hilfe der *stopped flow* Technik (siehe Abschnitt 3.3.6) durchgeführt.

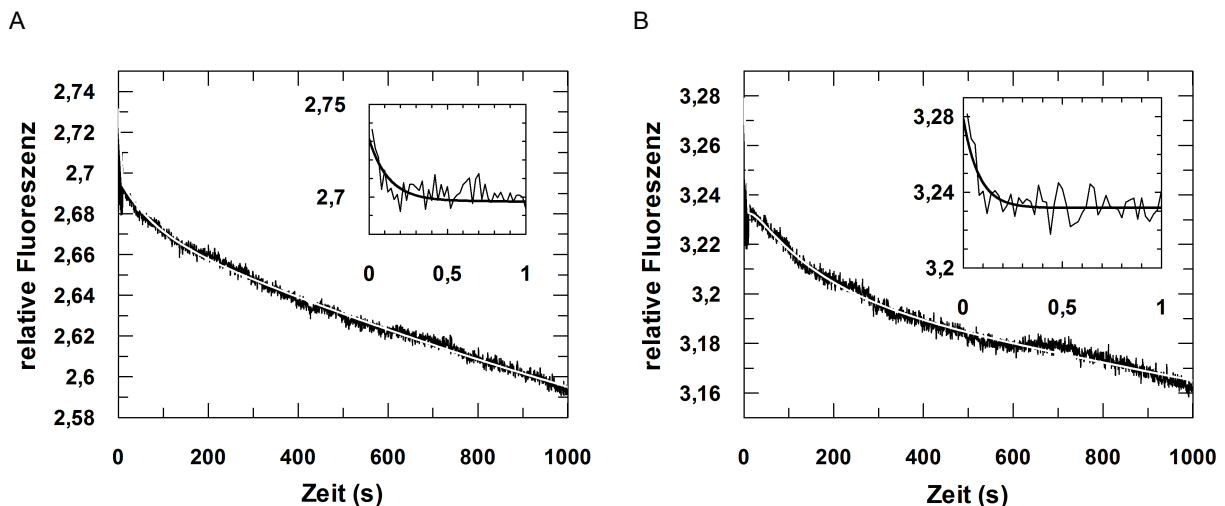


**Abbildung 4.24.: Pre-steady state Analyse der Assoziation ternärer Komplexe mit MjAgo.** (A) Darstellung eines typischen Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 500 nM MjAgo wurden mit *guide* DNA (20 nM; D-as2b<sup>FAM</sup>) präinkubiert und dann schnell mit *target* DNA (20 nM; D-s2b) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 21,8 \pm 3,0 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_2 = 0,01 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,003 (\pm 7 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der in den einzelnen Assoziationsexperimenten beobachteten Ratenkonstante  $k_{1,obs}$  von der Konzentration der *target* DNA ergab für  $k_1$  einen Wert von  $1,2 (\pm 0,007) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für  $k_{-1}$   $19,4 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ .

Zunächst wurden binäre Komplexe aus 500 nM MjAgo und 20 nM *guide* DNA bei 25°C für 10 min präassembliert, um eine vollständige Assoziation von *guide* DNA und MjAgo sicherzustellen. Diese binären Komplexe wurden schnell mit *target* DNA gemischt. Die Daten konnten

mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.24 A). Wie schon mit hAgo2 beobachtet, konnte eine sehr schnelle erste Phase bestimmt werden (siehe oben). Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese erste schnelle Phase abhängig von der Konzentration der *target* DNA ist (siehe Abbildung 4.24 B). Eine Analyse dieses linearen Zusammenhangs ergab für die erste Phase  $k_1 = 1,2 (\pm 0,007) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für die korrespondierende Rückreaktion  $k_{-1}$  einen Wert von  $19,4 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ . Ebenso wie bei der Bildung ternärer Komplexe mit hAgo2 handelt es sich hierbei also vermutlich um die unspezifische Kollision binärer Komplexe mit *target* DNA. Die darauf folgenden Phasen sind langsamer und zeigen keine Abhängigkeit von der Konzentration des *target* Stranges. Diese mit MjAgo bestimmten Ratenkonstanten sind nahezu identisch zu denen, die mit hAgo2 ermittelt wurden (siehe Tabelle 4.7).

Die korrespondierenden Dissoziationsratenkonstanten wurden mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten bestimmt. Dazu wurden ternäre Komplexe aus 500 nM MjAgo, 20 nM *guide* DNA und 40 nM *target* DNA präassembliert. Diese ternären Komplexe wurden entweder mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* oder *target* DNA kompetiert. In beiden Fällen konnten die Daten mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.25).



**Abbildung 4.25.: Pre-steady state Analyse der Dissoziation ternärer Komplexe mit MjAgo.** Darstellung typischer Graphen. Die Inserts zeigen jeweils einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. Ternäre Komplexe aus 500 nM MjAgo, 20 nM *guide* DNA und 40 nM *target* DNA wurden präinkubiert und dann schnell mit  $2 \mu\text{M}$  *guide* (A) bzw. *target* (B) DNA gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten: (A)  $k_{-1} = 8,0 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{-2} = 0,01 \pm 0,0006 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-3} = 0,0003 (\pm 3 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  und (B)  $k_{-1} = 12,6 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{-2} = 0,07 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-3} = 0,006 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ .

Im Fall der Konkurrenz mit *guide* DNA war zu beobachten, dass die Dissoziation ternärer Komplexe wie mit hAgo2 ein sehr langsamer Prozess ist. Die letzte Phase, die die Dissoziation der *target* DNA in der 3'-Region des *guide* repräsentiert, ist identisch zu der mit hAgo2 beobachteten Reaktion. Die Dissoziation der Basenpaarung im Bereich der *seed* Region scheint jedoch mit MjAgo schneller abzulaufen. Die Ratenkonstante für diese Phase ist etwa 3 x schnell-

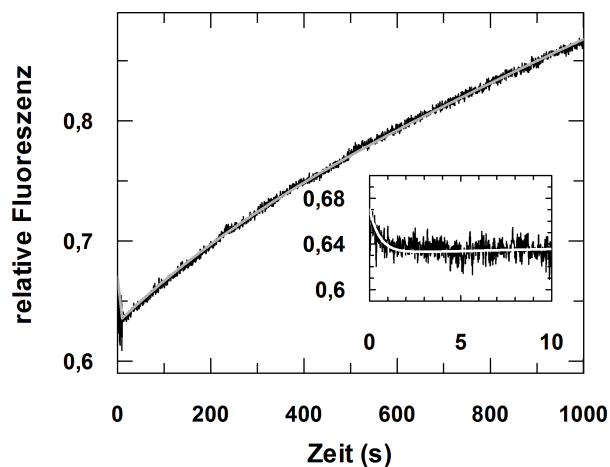
#### 4. Ergebnisse

ler als mit hAgo2 (siehe Tabelle 4.7). Dies könnte zum Beispiel damit zusammenhängen, dass der *guide-target* Duplex mit RNA wesentlich stabiler ist und somit langsamer dissoziiert.

Wie auch schon mit hAgo2 beobachtet, führt die Konkurrenz mit einer *target* DNA zu einer Beschleunigung der *target* Dissoziation. Sowohl die zweite als auch die dritte Phase werden signifikant schneller (siehe Tabelle 4.7). Während die *guide* DNA nur eine Reassoziierung von *target* DNAs blockieren kann, interagiert die *target* DNA vermutlich mit den ternären Komplexen. Wie bei hAgo2 wird postuliert, dass es sich um eine Art „Strang-Invasions“-Mechanismus handeln könnte, der in Gegenwart großer Mengen *target* RNA den Interferenz-Prozess beschleunigen kann.

Trotz einiger Abweichungen in den Dissoziationsratenkonstanten läuft offenbar die Bildung ternärer Komplexe mit hAgo2 und MjAgo in vergleichbarer Art und Weise ab. Es wird demnach

**Abbildung 4.26: Pre-steady state Analyse der Assoziation von *guide* und *target* DNA in Abwesenheit von MjAgo.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 20 nM *guide* DNA wurden schnell mit 20 nM *target* DNA gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben für  $k_1 = 1,8 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$  und für  $k_2 = 0,003 (\pm 5 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$



angenommen, dass die Phasen der Bindung der *target* DNA an binäre Komplexe mit MjAgo den gleichen strukturellen Transitionen zugeordnet werden können wie im Falle von hAgo2. Nach einer Kollision der *target* DNA mit dem ternären Komplex kommt es zunächst zur Basenpaarung im Bereich der *seed* Region. Die Basen der *guide* DNA sind dabei präarrangiert, so dass sie möglichst effizient an eine komplementäre *target* DNA binden können. Dies wird

**Tabelle 4.7.: Vergleich der Analysen der Pre-steady state Bindungsdaten für die Bildung ternärer Komplexe mit MjAgo und hAgo2.** Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wurden mit Hilfe der Gleichung 4.1 berechnet. \* = Ratenkonstante wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deeb bestimmt<sup>(218)</sup>.

	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
<b>MjAgo</b>							
<i>guide</i> Kompetitor	$1,2 \times 10^8$	8,0	0,01	0,01	0,004	0,0003	5
<i>target</i> Kompetitor		12,6		0,07		0,006	—
<b>hAgo2</b>							
<i>guide</i> Kompetitor	$3,2 \times 10^8^*$	2,0	0,01	0,003	0,003	0,0003	0,2
<i>target</i> Kompetitor		13,8		0,02		0,004	—

auch bestätigt durch transiente Bindungsexperimente in Abwesenheit von MjAgo. Die Assemblierung der Nukleinsäuren in Abwesenheit des Proteins ist durch einen zweiphasigen Prozess

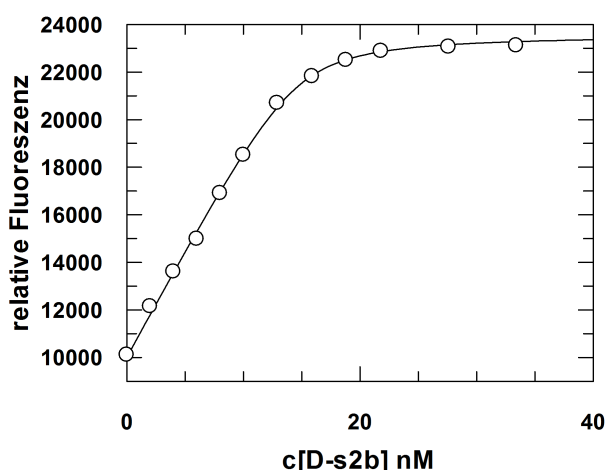


charakterisiert (siehe Abbildung 4.26), dessen erste Phase vermutlich ebenfalls die unspezifische Kollision repräsentiert, während die zweite Phase zur Basenpaarung der beiden DNAs korrespondiert. Diese ist im Vergleich zur zweiten Phase der ternären Komplexbildung um Faktor 3 langsamer, was damit zu begründen ist, dass die DNAs ohne Protein nicht in der perfekten Konformation für Basenpaarung vorliegen. Die dritte mit MjAgo beobachtete Phase korrespondiert wie im Fall von hAgo2 vermutlich mit erweiterter Basenpaarung im 3'-Bereich des *guide* Stranges und den damit verbundenen konformationellen Umlagerungen.

Die Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  mit Hilfe von Gleichung 4.1 zeigt Unterschiede zwischen hAgo2 und MjAgo (siehe Tabelle 4.7). Die berechnete niedrigere Affinität von MjAgo-*guide* DNA Komplexen für *target* Stränge im Vergleich zu hAgo2-*guide* RNA Komplexen ist vermutlich auf eine erhöhte Aggregationsneigung von MjAgo zurückzuführen. Diese Vermutung wird durch die später beschriebenen Gleichgewichtsmessungen erhärtet (siehe Abschnitt 4.2.2.4).

#### 4.2.2.4. Bestimmung der Affinität binärer Komplexe für *target* DNA

Mit Hilfe von Gleichgewichtsfluoreszenztitration wurde die Affinität von binären MjAgo-*guide* DNA Komplexen für eine komplementäre *target* DNA bestimmt. Dazu wurden zunächst binäre Komplexe präassembliert und dies über die Beobachtung der Abnahme der Fluoreszenz um etwa 15 % kontrolliert. Unmarkierte *target* DNA wurde schrittweise hinzugegeben. Die Anpassung einer quadratischen Bindungsgleichung an die experimentell bestimmten Daten ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 0,46 \pm 0,07$  nM bei einer gleichzeitig ermittelten Konzentration von  $14,7$  nM  $\pm 0,3$  nM für die eingesetzte Fluorophor-tragende *guide* DNA (siehe Abbildung 4.27). Die aus der Fluoreszenztitration berechnete Konzentration gibt Aufschluss über die Qualität der Daten. Sie liegt in der gleichen Größenordnung wie die tatsächlich eingesetzte Konzentration von 20 nM, was den Rückschluss zulässt, dass keine Verfälschung der Daten durch Aggregation zu vermuten ist.



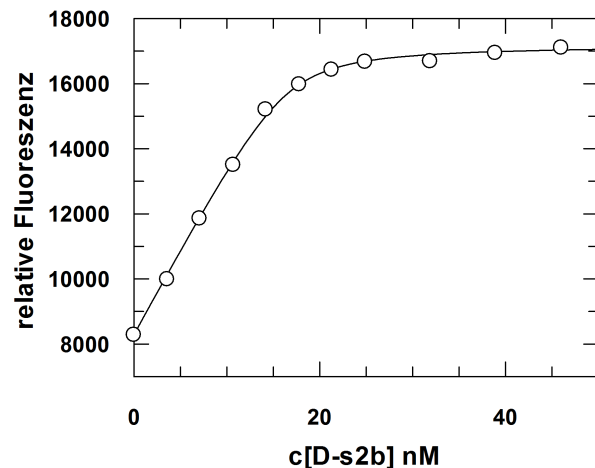
**Abbildung 4.27: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität binärer Komplexe mit MjAgo für *target* DNA.** 20 nM *guide* DNA (D-as2b<sup>FAM</sup>) wurden mit 500 nM MjAgo gemischt. Dieser binäre Komplex wurde mit aufsteigenden Konzentrationen *target* DNA (D-s2b) titriert. Die Änderung der Fluoreszenz wurde jeweils gegen die *target* Konzentration aufgetragen und die Daten mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet. Dies ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 0,46 \pm 0,07$  nM bei einer berechneten eingesetzten *guide* DNA Konzentration von  $14,7$  nM  $\pm 0,3$  nM.

Ein Vergleich der hier durch Gleichgewichts-Fluoreszenztitration bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstante für ternäre Komplexe mit der aus in transienten Bindungsexperimenten ermittelten Ratenkonstanten berechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstante (siehe Tabelle

#### 4. Ergebnisse

4.7) zeigt einen signifikanten Unterschied. Die durch Gleichgewichts-Fluoreszenztitration bestimmte Ratenkonstante ist wesentlich niedriger. Dies ist vermutlich mit während der *stopped flow* Messung auftretenden Aggregationsproblemen zu begründen, welche einen verlangsamenden Einfluss auf die diffusionskontrollierte erste Phase haben. Diese Phase mit einer Ratenkonstante zweiter Ordnung wird nach Gleichung 4.1 ebenso wie die Ratenkonstanten erster Ordnung in die Berechnung der Dissoziationsratenkonstante mit einbezogen, was zu einer höheren Fehleranfälligkeit der Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante bei Aggregationsproblemen führt. Weiterhin ist es nicht auszuschließen, dass eine weitere Phase bei der Bindung von *target* DNA an binäre Komplexe stattfindet, die in diesem experimentellen System nicht beobachtet werden kann. Neben Aggregationsproblemen stellt diese Möglichkeit eine weitere Erklärung für die Abweichung der aus Ratenkonstanten berechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstante dar.

**Abbildung 4.28:** Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante von *guide* und *target* DNA. 20 nM *guide* DNA (OH-D-as2b<sup>FAM</sup>) wurde mit aufsteigenden Konzentrationen *target* DNA (D-s2b) titriert. Die Änderung der Fluoreszenz wurde jeweils gegen die *target* Konzentration aufgetragen und die Daten mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet. Dies ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 0,6 \pm 0,08$  nM bei einer berechneten eingesetzten *guide* DNA Konzentration von  $16,6 \text{ nM} \pm 0,4 \text{ nM}$ .



Eine Titration der *guide* DNA mit der *target* DNA in Abwesenheit des Proteins ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D = 0,6 \pm 0,08$  nM bei einer berechneten Konzentration der eingesetzten *guide* DNA von  $16,6 \text{ nM} \pm 0,4 \text{ nM}$  (siehe Abbildung 4.28). Auch hier betrug die eingesetzte Konzentration der *guide* DNA 20 nM. Es fällt auf, dass die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die Assoziation ternärer Komplexe und *guide* und *target* DNA in Abwesenheit von Protein nahezu identisch sind. Dies impliziert, dass die Kontakte zwischen *target* DNA und binären Komplexen hauptsächlich durch Watson-Crick Basenpaarung vermittelt werden. Gestützt wird diese Vermutung durch die Kristallstrukturen ternärer Komplexe des TtAgo Proteins. Die kurze *target* DNA kann auf Grund ihrer Länge keine weiteren Kontakte mit dem Ago Protein eingehen. Außerdem sind im Rahmen des an Ago gebundenen *guide-target* Duplexes keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ago und der *target* DNA zu beobachten<sup>(90)</sup>.



#### 4.2.2.5. Zusammenfassung der biochemischen Parameter für binäre und ternäre Komplexe

**Tabelle 4.8.: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten der Bildung binärer und ternärer Komplexe mit MjAgo.** Die *guide* Substrate für die binären Komplexe mit MjAgo sind jeweils angegeben. Die ternären Komplexe wurden aus MjAgo, *guide* DNA (D-as2b) und *target* DNA (D-s2b) assembliert. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_{D\_cal}$  wurde mit Hilfe von Gleichung 4.1 bestimmt, während die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_{D\_FT}$  mit Hilfe von Gleichgewichts-Fluoreszenztitration gemessen wurden. Die Unterschiede zwischen dem berechneten und dem gemessenen  $K_D$  resultieren entweder aus leichter Proteinaggregation, welche reduzierte Diffusionsraten verursacht und so zu einer Unterschätzung von  $k_1$  und daraus folgend einem höheren  $K_D$  führt oder es existiert eine vierte Transition der Bildung ternärer Komplexe, die nicht detektiert werden konnte. n.b. = nicht bestimmt.

	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{D\_cal}$ (nM)	$K_{D\_FT}$ (nM)
<b>binäre Komplexe</b>								
D-as2b <sup>FAM</sup>	$0,2 \times 10^8$	n.b.	0,25	n.b.	0,003	n.b.	n.b.	3,4
OH-D-as2b <sup>FAM</sup>	$0,2 \times 10^8$	n.b.	0,22	n.b.	0,003	n.b.	n.b.	40,3
D-si2b <sup>FAM</sup>	$0,3 \times 10^8$	n.b.	0,23	n.b.	0,003	n.b.	n.b.	102
<b>ternäre Komplexe</b>								
<i>guide</i> Kompetitor	$1,2 \times 10^8$	8,0	0,01	0,01	0,004	0,0003	5	0,5

#### 4.2.2.6. Kinetische Analyse der MjAgo-vermittelten *target* DNA Spaltung

Im folgenden Abschnitt soll die MjAgo-vermittelte Spaltung von *target* DNAs beschrieben werden. Die biologische Funktion des MjAgo Proteins ist bislang nicht geklärt. Es ist allerdings bekannt, dass analog zu hAgo2 eine endonukleolytische Spaltung der *target* DNA stattfinden kann. Obwohl die Bindungsexperimente bei 25°C durchgeführt werden können, kann eine katalytische Aktivität nur bei 85°C beobachtet werden<sup>(139)</sup>. Daher wurden die hier gezeigten Spalttests bei 85°C durchgeführt.

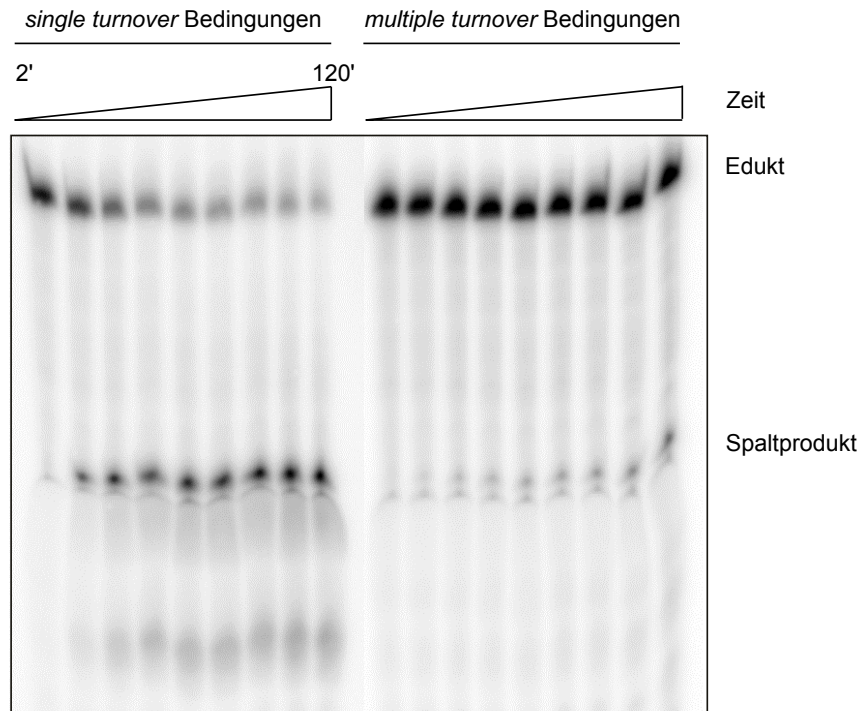
Exemplarisch ist ein Gelbild gezeigt, welches neben dem Spaltprodukt eine sehr schwache zweite Bande erkennen lässt (siehe Abbildung 4.29). Diese zweite Bande könnte zum Beispiel durch Nukleaseabbau entstehen.

Im Gegensatz zu hAgo2 ist eine Beobachtung der Spaltung sowohl unter *single turnover* als auch unter *multiple turnover* Bedingungen möglich. Dies liegt daran, dass MjAgo bei einer Temperatur von 85°C vermutlich nur wenig Aggregation zeigt. Unter *single turnover* Bedingungen liegt der binäre MjAgo-*guide* Duplex im Überschuss vor, so dass jeder binäre Komplex nur eine *target* DNA bindet und spaltet. Unter *multiple turnover* Bedingungen dagegen liegt die *target* DNA im Überschuss vor, woraus folgt, dass die binären Komplexe mehrfach eine *target* DNA binden, spalten und die Spaltprodukte freisetzen können.

Die Auswertung der Umsätze in Relation zur Zeit ergab für die Spaltung unter *single turnover* Bedingungen eine Ratenkonstante  $k_{Spaltung}$  von  $0,0012 (\pm 2 \times 10^{-5}) s^{-1}$  und unter *multiple turnover* Bedingungen eine Ratenkonstante  $k_{Spaltung}$  von  $0,0002 (\pm 7 \times 10^{-5}) s^{-1}$ . Die unter *multiple turnover* Bedingungen gemessene Ratenkonstante ist vergleichbar mit der mit hAgo2

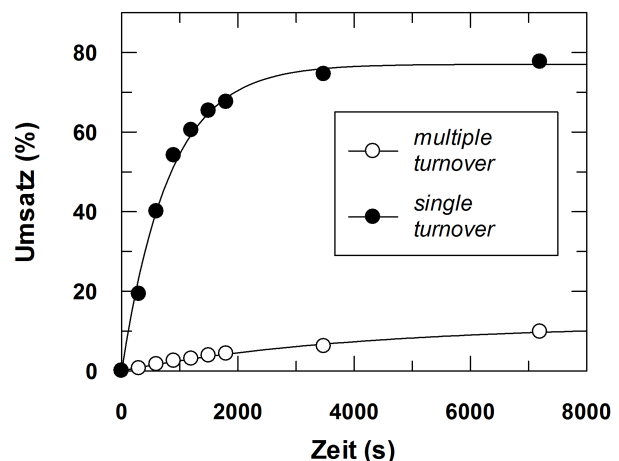
#### 4. Ergebnisse

**Abbildung 4.29: Gelbild der MjAgo-vermittelten Spaltung von *target* DNA unter *single turnover* und *multiple turnover* Bedingungen.** In beiden Fällen wurden 1  $\mu\text{M}$  MjAgo eingesetzt. Unter *single turnover* bzw. *multiple turnover* Bedingungen wurden 100 nM bzw. 20 nM *guide* DNA und 2,5 nM bzw. 100 nM radioaktiv markierte *target* DNA verwendet. Proben wurden nach 2', 5', 10', 15', 20', 25', 30', 60' und 120' entnommen und über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.



gemessenen Ratenkonstante für die Spaltung von *target* RNAs (siehe Abbildung 4.14). Es steht zu vermuten, dass ebenso wie mit hAgo2 die Dissoziation der Spaltprodukte geschwindigkeitsbestimmend ist. Die unter *single turnover* Bedingungen gemessene Ratenkonstante ist signifikant schneller. Ein Vergleich mit den Ratenkonstanten, die im Rahmen der Assozia-

**Abbildung 4.30: Die MjAgo-vermittelte Spaltung von *target* DNA unter *single turnover* und *multiple turnover* Bedingungen.** Mit Hilfe von Image Quant 5.2 wurden die Bandenintensitäten der Gele ausgewertet und der Umsatz der *target* DNA je Zeitpunkt berechnet. Die Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mittels einer einfach exponentiellen Gleichung ausgewertet. Unter *single turnover* Bedingungen ergab sich eine Ratenkonstante von  $0,0012 (\pm 2 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem Gesamtumsatz von  $77,0 \pm 1,5 \%$  und unter *multiple turnover* Bedingungen ergab sich eine Ratenkonstante von  $0,0002 (\pm 7 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem Gesamtumsatz von  $11,7 \pm 0,6 \%$ .



tion ternärer Komplexe gemessen wurden (siehe Tabelle 4.7), zeigt, dass die unter *single turnover* Bedingungen gemessene Ratenkonstante in einer ähnlichen Größenordnung wie die Ratenkonstante  $k_3$  liegt. Vermutlich wird die Spaltrate unter *single turnover* Bedingungen also durch konformationelle Umlagerungen und erweiterte Basenpaarung des *target* Stranges im 3'-Bereich der *guide* DNA limitiert. In beiden Fällen beschreibt  $k_{\text{Spaltung}}$  also nicht die Spaltreaktion selbst, sondern den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Assoziation bzw. Dissoziation ternärer Komplexe.

### 4.2.3. Biochemische Analyse der Bedeutung des *guide* 5'-Nukleotids und der *guide* Sequenz für die Bildung binärer und ternärer Komplexe

Nachdem in Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2 festgestellt werden konnte, dass mit einer ausgewählten Sequenz das Verhalten von MjAgo und hAgo2 bezüglich der Bildung binärer und ternärer Komplexe und der folgenden Spaltung von *target* Strängen in den Grundzügen sehr ähnlich ist, soll in diesem Abschnitt nun die Bedeutung des 5'-Nukleotids sowie der Sequenz des *guide* Stranges beschrieben werden. Dabei soll der Fokus auf die Unterscheidung zwischen dem 5'-Guanin und 5'-Uracil bzw. 5'-Thymin Nukleotid und darauf gerichtet werden, welche Bedeutung in diesem Zusammenhang die 5'-Phosphorylierung für die Affinität des Ago Proteins für den *guide* Strang hat. Weiterhin wird gezeigt, welchen Einfluss diese Parameter auf die Bindung und Spaltung von *target* Strängen haben.

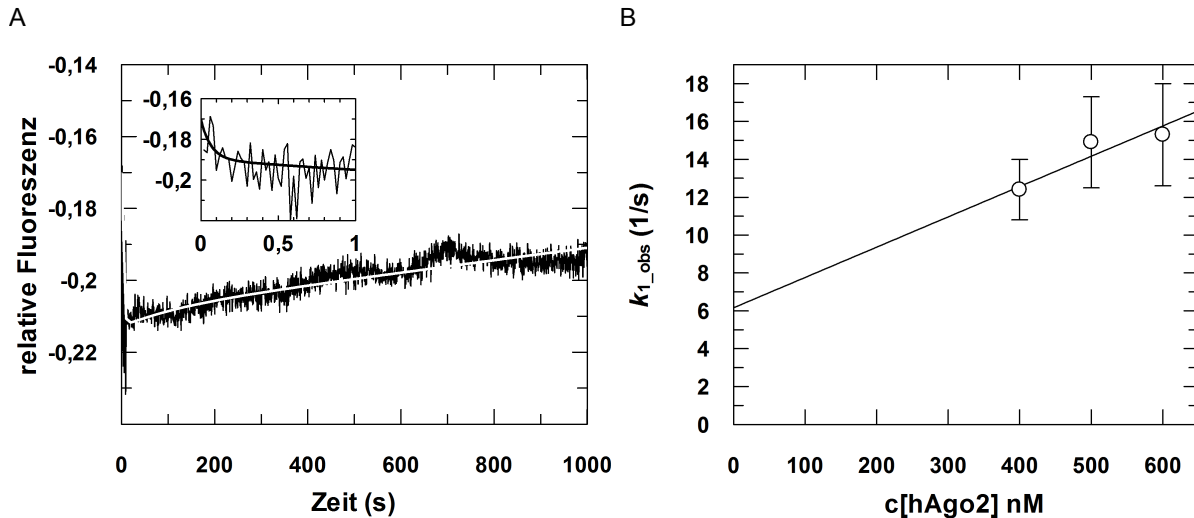
#### 4.2.3.1. Vergleichende kinetische Analyse der Bildung von binären Komplexen mit unterschiedlichen *guide* Strängen

Im folgenden Abschnitt wird die vergleichende Analyse der Bildung binärer Komplexe mit verschiedenen *guide* Substraten mit Hilfe von hAgo2 und MjAgo vorgestellt. Zunächst wurde dazu getestet, ob sich die Bildung binärer Komplexe verändert, wenn das 5'-terminale Uracil bzw. Thymin gegen ein Guanin ausgetauscht wird. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass kurze regulatorische RNAs im humanen System eine starke Präferenz für ein 5'-Uracil aufweisen. Untersuchungen an der isolierten Mid Bindungstasche unterstreichen dieses Ergebnis. Wird anstatt des 5'-Uracils ein 5'-Guanin gewählt, kommt es zu repulsiven Wechselwirkungen mit dem NSL in der Mid Bindungstasche (siehe Abschnitt 2.3.4), der im Gegensatz dazu stabilisierende Interaktionen mit dem 5'-Uracil eingeht<sup>(144)</sup>. Eine stabilisierende Wirkung auf den *guide* Strang hat außerdem, wie im Fall eines *guide* Stranges mit einem 5'-terminalen Uracil gezeigt werden konnte, die 5'-Phosphatgruppe<sup>(123,144)</sup>.

Für bakterielle Ago Proteine ist bekannt, dass diese nicht in jedem Fall eine Präferenz für ein 5'-Uracil aufweisen<sup>(88)</sup>. In bakteriellen Ago Proteinen konnte der NSL, welcher im humanen Ago Protein die Präferenz für das 5'-Uracil bestimmt<sup>(144)</sup>, zwar nachgewiesen werden, seine Funktion wurde allerdings nicht beschrieben. In archaellen Ago Proteinen ist der NSL so weit von der Mid Bindungstasche entfernt, dass keine Funktion bezüglich einer Selektion von 5'-Nukleotiden vermutet wird<sup>(140,144)</sup>. Es existieren allerdings Studien, die zeigen, dass zum Beispiel das TtAgo Protein eine Präferenz für ein 5'-Cytosin aufweist, während RsAgo ein 5'-Uracil bevorzugt<sup>(3,88)</sup>. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es auch in bakteriellen Ago Proteinen einen Selektionsmechanismus für bestimmte 5'-terminale Nukleotide gibt.

Basierend auf diesen Grundlagen wurden im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit verschiedene 5'-Nukleotide getestet, um zum Einen zu überprüfen, ob Ago Proteine auch komplette *guide* Stränge über das 5'-terminale Nukleotid selektieren. Zum Anderen sollte MjAgo auf eine mögliche Präferenz für bestimmte 5'-terminale Nukleotide getestet werden. Die transientenkinetischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der *stopped flow* Methode (siehe Abschnitt 3.3.6) durchgeführt.

### Transientenkinetische Untersuchungen der Bildung binärer Komplexe aus hAgo2 und einer *guide* RNA mit einem 5'-terminalen Guanin

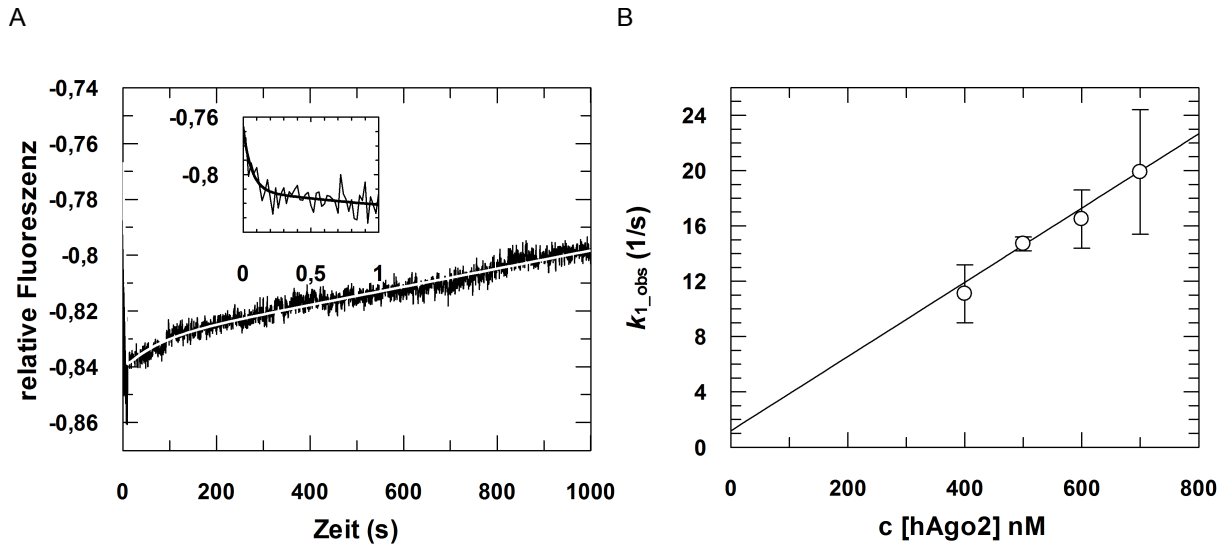


**Abbildung 4.31.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit hAgo2 und G *guide* RNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM hAgo2 wurden schnell mit *guide* RNA (20 nM; s2b<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 15,3 \pm 2,7 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,26 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,01 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  von der hAgo2 Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,2 (\pm 0,006) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 6,2 \pm 2,6 \text{ s}^{-1}$ .

Die ersten Analysen dazu wurden mit Hilfe von hAgo2 durchgeführt. 20 nM einer 5'-phosphorylierten *guide* RNA mit einem 5'-Guanin (G *guide* RNA) wurden dazu schnell mit verschiedenen Konzentrationen hAgo2 gemischt. Die Daten konnten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.31 A). Dabei wurde eine schnelle erste Phase bestimmt, die abhängig von der hAgo2 Konzentration ist. Eine Auswertung dieser linearen Abhängigkeit ergab eine Ratenkonstante zweiter Ordnung von  $k_1 = 0,2 (\pm 0,006) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.31 B). Die nachfolgenden Phasen sind langsamer und nicht konzentrationsabhängig. Die Ratenkonstanten der Assoziation sind nahezu identisch zu denen, die mit einem 5'-phosphorylierten *guide* Strang mit 5'-Uracil (U *guide* RNA) bestimmt wurden (siehe Tabelle 4.9).

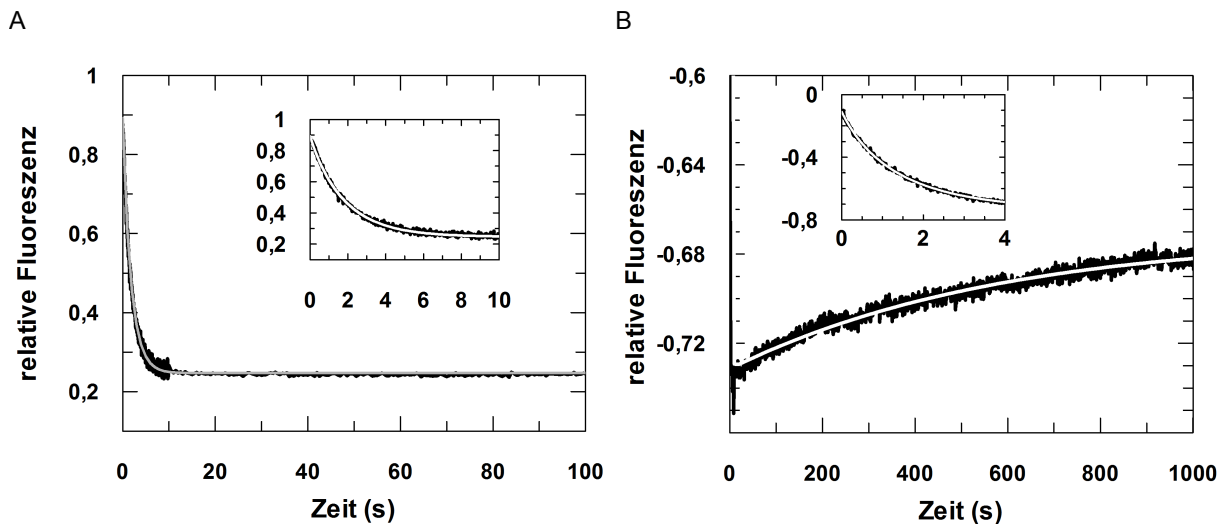
In einem nächsten Schritt wurde die Bildung binärer Komplexe mit einem 5'-Guanin *guide* Strang ohne 5'-Phosphorylierung (OH-G *guide* RNA) untersucht. Auch hierzu wurde vorerst hAgo2 eingesetzt. 20 nM der OH-G *guide* RNA wurden dazu schnell mit verschiedenen Konzentrationen hAgo2 gemischt. Die Daten konnten wiederum mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.32 A). Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der schnellen ersten Phase von der Konzentration des Proteins ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,3 (\pm 0,005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.32 B).

Die Ratenkonstanten der nachfolgenden langsameren Phasen liegen wie mit der G *guide* RNA in einer ähnlichen Größenordnung wie die, die mit einem U *guide* Strang bestimmt wurden (siehe Tabelle 4.9). Auffällig ist die zweite Phase, welche im Vergleich zum G *guide* Strang um etwa Faktor 2 beschleunigt ist. Da diese Phase die 5'-Bindung der *guide* RNA in der Mid



**Abbildung 4.32.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit hAgo2 und OH-G guide RNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM hAgo2 wurden schnell mit *guide* RNA (20 nM; OH-s2b<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 16,5 \pm 2,1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,41 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,01 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  von der hAgo2 Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,3 (\pm 0,005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierende Ratenkonstante  $k_{-1} = 1,2 \pm 2,5 \text{ s}^{-1}$ .

Bindungstasche repräsentiert, könnte dies bedeuten, dass die fehlende Phosphatgruppe im Fall des 5'-Guanins zu einer Beschleunigung der Assoziation führt. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist diese Beobachtung jedoch mit Vorsicht zu behandeln.



**Abbildung 4.33.: Pre-steady state Dissoziationskinetik binärer Komplexe mit hAgo2 und G bzw. OH-G guide RNA.** Dargestellt sind typische Graphen. Die Inserts zeigen einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM hAgo2 wurden jeweils mit phosphorylierter (A) bzw. unphosphorylierter (B) *guide* RNA (20 nM; s2b<sup>FAM</sup> bzw. OH-s2b<sup>FAM</sup>) präassembliert. Diese binären Komplexe wurden jeweils mit 2  $\mu\text{M}$  unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten: (A)  $k_{-1} = 2,0 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,5 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,003 \pm 0,0008 \text{ s}^{-1}$  (B)  $k_{-1} = 2,1 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,6 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,002 \pm 0,00007 \text{ s}^{-1}$ .

#### 4. Ergebnisse

Außerdem wurden die Auswirkungen des 5'-Nukleotids auf die Dissoziation binärer Komplexe untersucht. Dazu wurden 20 nM unphosphorylierte (siehe Abbildung 4.33 B) oder phosphorylierte (siehe Abbildung 4.33 A) *guide* RNA mit einem 5'-terminalen Guanin mit 600 nM hAgo2 für 10 min bei 25°C inkubiert, um sicherzugehen, dass die gesamte *guide* RNA an hAgo2 gebunden ist. Diese binären Komplexe wurden dann schnell mit einem Überschuss unmarkierter *guide* RNA gemischt, um die Reassoziierung dissoziierter *guide* RNAs zu unterbinden. Auch diese Daten wurden am Besten durch eine dreifach exponentielle Gleichung beschrieben. Die erhaltenen Ratenkonstanten sind dabei sehr ähnlich bei unphosphorylierter und bei phosphorylierter *guide* RNA (siehe Tabelle 4.9).

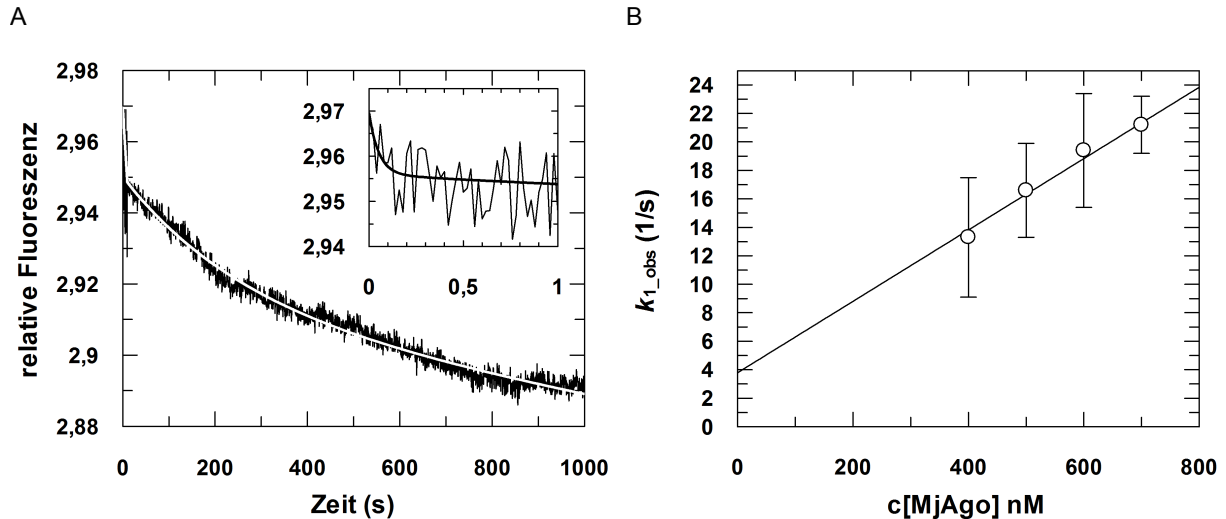
Große Unterschiede sind hingegen im Vergleich zur binären Komplexbildung mit einem *guide* Strang, der an Stelle eines 5'-terminalen Uracils ein 5'-terminales Guanin trägt, zu beobachten. So ist zum Beispiel die Ratenkonstante  $k_{-2}$  mit einem G *guide* Strang um etwas mehr als einen Faktor 3 schneller als die korrespondierende Phase mit einem U *guide*. Die berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  ist mit 63 nM etwas höher als die mit einem U *guide* berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante. Im Gegensatz dazu ist die Ratenkonstante  $k_{-2}$  mit einer OH-G *guide* RNA wesentlich langsamer als mit einem unphosphorylierten OH-U *guide* Strang. Dies spiegelt sich auch in den berechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wider. Ist bei einem *guide* Strang mit einem 5'-Uracil auffällig, dass ein unphosphorylierter *guide* Strang signifikant schlechter gebunden wird als sein phosphoryliertes Gegenstück, so ist bei einer *guide* RNA mit einem 5'-Guanin das Gegenteil der Fall. Ein *guide* Strang mit einem 5'-Guanin wird mit einer höheren Affinität durch hAgo2 gebunden, wenn keine Phosphatgruppe vorhanden ist (siehe Tabelle 4.9). Dies könnte zum Beispiel damit zusammenhängen, dass der NSL repulsive Wechselwirkungen mit einem Guanin zeigt und in Anwesenheit eines 5'-Phosphats kein Raum besteht, diesen auszuweichen<sup>(144)</sup>. Fehlt jedoch das 5'-Phosphat, kann das Guanin theoretisch eine andere Position in der Mid Bindungstasche einnehmen, was zu einer höheren Affinität für die *guide* RNA führt. Eine ideale Positionierung ohne Phosphatgruppe schließt höchstwahrscheinlich auch Kationen- $\pi$ -Interaktionen mit dem Y529 in der Mid Bindungstasche ein. Diese Wechselwirkung führt zu einer festen Bindung des *guide* Stranges ohne 5'-Phosphat.

**Tabelle 4.9.: Vergleich der *pre-steady state* Ratenkonstanten der Bildung binärer Komplexe aus hAgo2 und *guide* RNA mit einem 5'-terminalen Guanin mit und ohne Phosphatgruppe.** Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_{D,cal}$  wurden mit Hilfe von Gleichung 4.1 bestimmt. Die Ratenkonstanten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Messungen gemittelt. \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{D,cal}$ (nM)
G <i>guide</i>	$0,2 \times 10^8$	2,1	0,2	0,6	0,02	0,002	63
OH-G <i>guide</i>	$0,3 \times 10^8$	2,1	0,4	0,6	0,01	0,002	11
U <i>guide</i> *	$0,6 \times 10^8$	6,2	0,26	0,17	0,012	0,007	37
OH-U <i>guide</i> *	$0,6 \times 10^8$	5,5	0,16	1,7	0,01	0,009	440

### Transientenkinetische Untersuchungen der Bildung binärer Komplexe aus MjAgo und einer *guide* DNA mit einem 5'-terminalen Guanin

Analog wurden transientenkinetische Studien zur 5'-Nukleotid Präferenz des MjAgo Proteins durchgeführt, um festzustellen, ob sich hier eine ähnliche Tendenz abzeichnet. 20 nM der *guide*



**Abbildung 4.34.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit MjAgo und G *guide* DNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden schnell mit *guide* DNA (20 nM; G-as2b<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 19,4 \pm 4,0 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,43 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,004 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  von der MjAgo Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,25 (\pm 0,002) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 3,8 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$ .

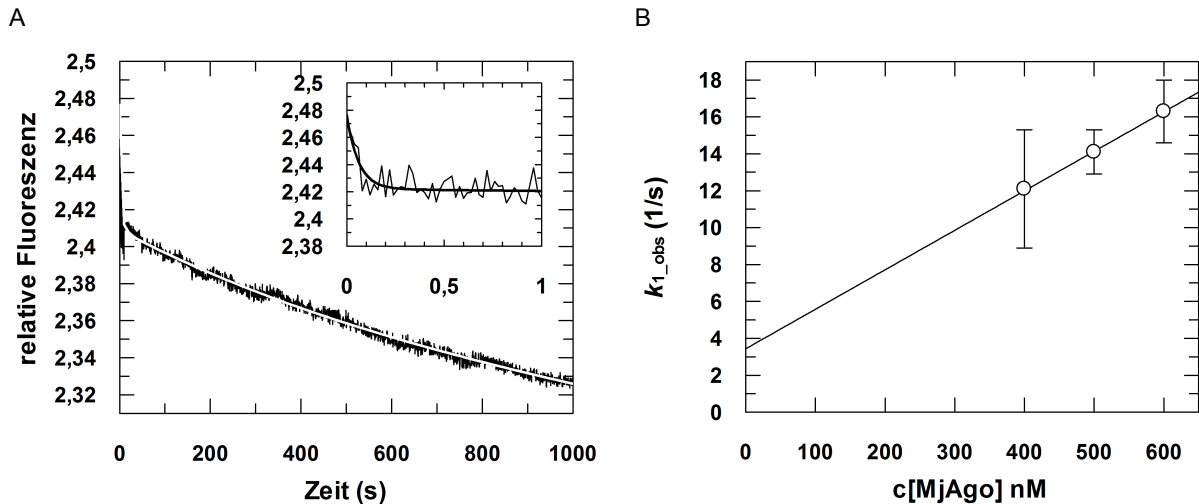
DNA mit einem Guanin und einer Phosphatgruppe am 5'-Ende (G *guide* DNA) wurden schnell mit verschiedenen Konzentrationen MjAgo gemischt. Die Daten konnten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung am Besten beschrieben werden (siehe Abbildung 4.34 A). Die erste Phase ist dabei sehr schnell und abhängig von der MjAgo Konzentration. Eine lineare Auswertung dieser Abhängigkeit ergibt eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,25 (\pm 0,002) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Rückrate von  $k_{-1} = 3,8 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.34 B).

Die darauf folgenden Ratenkonstanten sind langsamer und zeigen keine Abhängigkeit von der Konzentration des Proteins. Sie sind nahezu identisch zu denen, die mit Hilfe eines 5'-phosphorylierten *guide* Stranges mit einem Thymin ermittelt wurden (siehe Tabelle 4.10). Die Assoziation von binären Komplexen scheint somit nicht durch die Identität des 5'-Nukleotids beeinflusst zu werden.

Auch der Einfluss der Phosphatgruppe auf die Assoziation von binären Komplexen mit einer *guide* DNA, die ein Guanin an Stelle eines Thymins an der 5'-Position trägt, ist begrenzt. 20 nM einer unphosphorylierten *guide* DNA mit einem 5'-Guanin (OH-G *guide* DNA) wurden schnell mit verschiedenen Konzentrationen MjAgo gemischt und die Daten dreifach exponentiell ausgewertet (siehe Abbildung 4.35 A). Die Auswertung der ersten schnellen Phase in Abhängigkeit von der MjAgo Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,21 (\pm 0,0007) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer Rückrate von  $k_{-1} = 3,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.35 B). Die nachfolgenden lang-



#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.35.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit MjAgo und OH-G *guide* DNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden schnell mit *guide* DNA (20 nM; OH-G-as2b<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 16,3 \pm 1,7 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,11 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,005 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_{1,obs}$  von der MjAgo Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,21 (\pm 0,0007) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 3,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ .

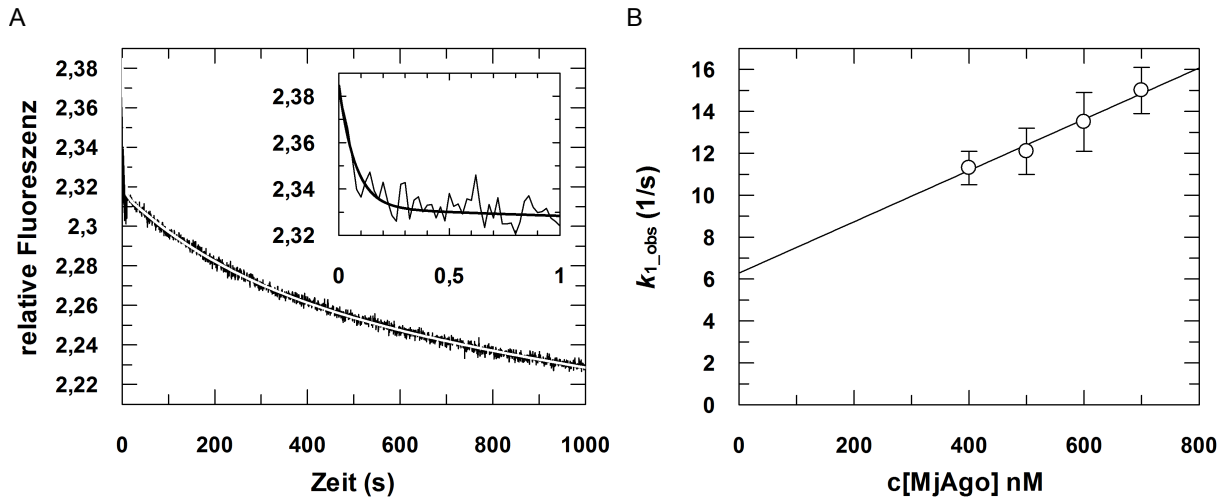
sameren Phasen zeigen nur wenig Abweichung von den mit G *guide* DNA bestimmten Ratenkonstanten. Lediglich  $k_2$  ist um etwa Faktor 2,5 langsamer als die korrespondierende Phase in Anwesenheit der 5'-Phosphorylierung (siehe Tabelle 4.10). Allerdings ist auch hier im Rahmen eines gewissen Fehlers diese Beobachtung mit Vorbehalt zu betrachten.

Auch im Fall des 5'-G und 5'-OH-G *guide* Stranges konnten mit MjAgo keine Dissoziationsratenkonstanten bestimmt werden. Der DNA Überschuss in den Verdrängungsexperimenten führt zu einer starken Aggregation, die eine fehlerfreie Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten verhindert. Die im Rahmen der Assoziationsexperimente bestimmten Ratenkonstanten jedoch zeigen, dass wie mit hAgo2 die Identität des 5'-Nukleotids keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Assoziation binärer Komplexe zeigt. Auch das 5'-Phosphat zeigt hier nur einen geringen Effekt, was im Hinblick auf die Messgenauigkeit allerdings mit Vorsicht behandelt werden sollte.

#### **Transientenkinetische Analyse des Effekts des 5'-terminalen Nukleotids im Kontext der *guide* Strang Sequenz auf die Bildung binärer Komplexe mit MjAgo**

Um zu überprüfen, ob die Sequenz des *guide* Stranges einen Einfluss auf die Assoziation binärer Komplexe haben kann, wurde mit der let7 *guide* DNA eine weitere Sequenz untersucht. Dazu wurde zunächst ein 5'-phosphorylierter let7 *guide* Strang mit einem Thymin am 5'-Ende schnell mit verschiedenen Konzentrationen MjAgo gemischt. Die resultierenden Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.36 A). Die erste schnelle Phase zeigte auch mit der let7 *guide* DNA eine lineare Abhängigkeit von der MjAgo





**Abbildung 4.36.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit MjAgo und T let7 guide DNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden schnell mit *guide* DNA (20 nM; D-T-let7<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 13,5 \pm 1,4 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,24 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,003 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_1$  von der MjAgo Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,12 (\pm 0,001) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 6,3 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ .

Konzentration. Deren Auswertung ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,12 (\pm 0,001) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und eine korrespondierende Rückrate von  $k_{-1} = 6,3 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.36 B).

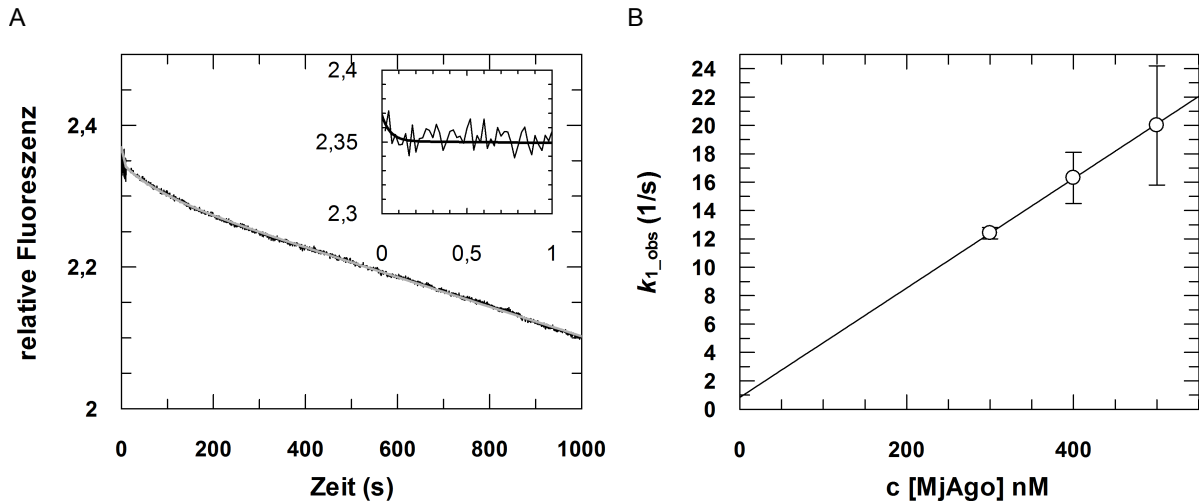
	$k_1 (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_2 (\text{s}^{-1})$	$k_3 (\text{s}^{-1})$
G <i>guide</i>	$0,25 \times 10^8$	0,3	0,004
OH-G <i>guide</i>	$0,21 \times 10^8$	0,13	0,005
G let7 <i>guide</i>	$0,39 \times 10^8$	0,2	0,003
T <i>guide</i>	$0,2 \times 10^8$	0,25	0,003
OH-T <i>guide</i>	$0,2 \times 10^8$	0,22	0,003
T let7 <i>guide</i>	$0,12 \times 10^8$	0,2	0,006

**Tabelle 4.10: Vergleich der pre-steady state Ratenkonstanten der Bildung binärer Komplexe aus MjAgo und guide RNA mit einem 5'-terminalen Guanin mit und ohne Phosphatgruppe.** Die Ratenkonstanten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Messungen gemittelt.

Die darauf folgenden langsameren Ratenkonstanten sind nahezu identisch zu denen, die mit dem as2b *guide* Strang bestimmt wurden (siehe Tabelle 4.10). Diese Daten lassen vermuten, dass die Sequenz der *guide* DNA keinen Einfluss auf die Bildung binärer Komplexe hat. Dissoziationsratenkonstanten sowie Ratenkonstanten in Abwesenheit der 5'-Phosphatgruppe konnten mit dem let7 *guide* Strang auf Grund von Aggregationsprobleme nicht bestimmt werden.

Die fehlende Phosphatgruppe erschwert infolge des symmetrischen let7 *guide* Stranges die Auswahl des 5'-Endes. Dies ist sowohl beim G- als auch beim T-let7 *guide* Strang zu beobachten. Da beim let7 *guide* Strang die auf das 5'-Nukleotid folgenden zwei Nukleotide symmetrisch zu den zwei vorletzten Nukleotiden des 3'-Endes sind, kann vermutet werden, dass diese beiden Nukleotide für die Auswahl des *guide* Stranges eine wichtige Rolle spielen.

#### 4. Ergebnisse



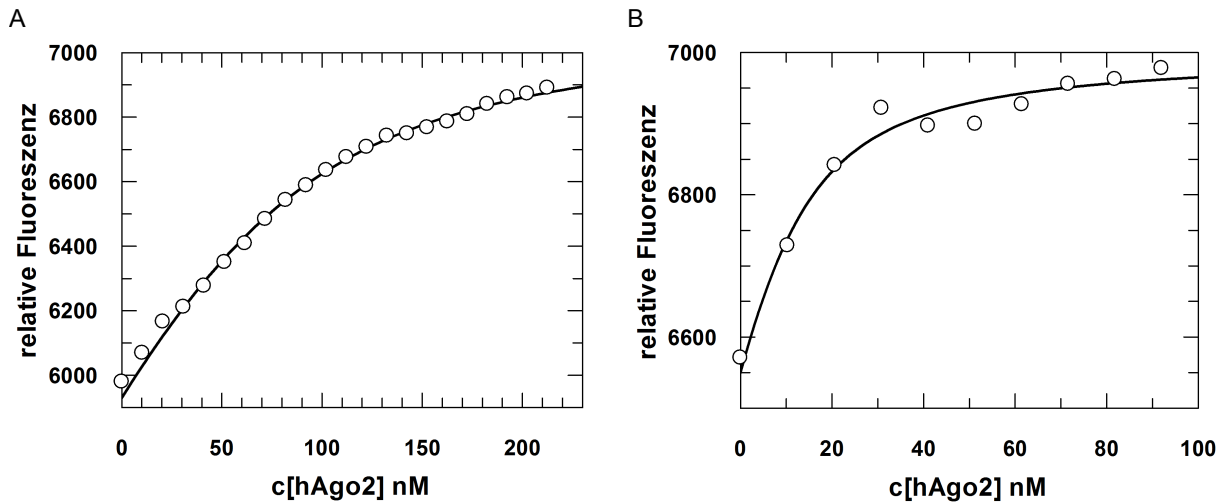
**Abbildung 4.37.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit MjAgo und G-let7 guide DNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 500 nM MjAgo wurden schnell mit *guide* DNA (20 nM; D-G-let7<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 20,0 \pm 4,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,12 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,01 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_{1,obs}$  von der MjAgo Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,39 (\pm 0,0005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 0,8 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ .

Um zu untersuchen, ob sich der Effekt des 5'-Nukleotids im Kontext der Sequenz ändert, wurde der *let7 guide* Strang in einem weiteren Experiment mit einem 5'-Guanin überprüft. Wiederum wurden 20 nM des 5'-phosphorylierten *let7 guide* Stranges mit einem Guanin am 5'-Ende mit verschiedenen Konzentrationen MjAgo gemischt. Auch diese Daten lassen sich am Besten durch eine dreifach exponentielle Gleichung beschreiben (siehe Abbildung 4.37 A). Die lineare Abhängigkeit der ersten Phase ergibt die Ratenkonstante  $k_1 = 0,39 (\pm 0,0005) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer Rückrate  $k_{-1} = 0,8 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ . Die langsameren Ratenkonstanten sind nahezu identisch zu den zuvor für den T-*let7 guide* Strang bestimmten Ratenkonstanten. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Assoziation von binären Komplexen unabhängig von der Sequenz des *guide* Stranges ist. Weiterhin konnte aus den vorliegenden Ergebnissen keine Präferenz von MjAgo für ein bestimmtes 5'-Nukleotid abgeleitet werden.

#### 4.2.3.2. Bestimmung der Affinität von Ago Proteinen für verschiedene *guide* Stränge

Im folgenden Abschnitt werden Untersuchungen zur Affinität von Ago Proteinen für *guide* Stränge mit verschiedenen 5'-Nukleotiden beschrieben. Studien aus dem Jahr 2010 haben ergeben, dass die Affinitäten der isolierten Mid Domäne des hAgo2 Proteins für die vier verschiedenen Nukleotide UMP, AMP, CMP und GMP sich stark unterscheiden. So ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für GMP im Vergleich zu UMP um Faktor 30 erhöht<sup>(144)</sup>. Die hier beschriebenen Analysen sollen zeigen, ob sich die für einzelne Nukleotide bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten an einer isolierten Mid Domäne in den Messungen mit dem gesamten Protein und einem kompletten *guide* Strang bestätigen. Außerdem soll untersucht

werden, ob MjAgo sich bezüglich des 5'-Nukleotids ähnlich verhält wie hAgo2, oder ob möglicherweise ein anderes 5'-Nukleotid präferiert wird.



**Abbildung 4.38.: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von hAgo2 für *guide* RNA mit einem 5'-Guanin.** 20 nM *guide* RNA (s2b<sup>FAM</sup> (A) bzw. OH-s2b<sup>FAM</sup> (B)) wurden mit steigenden Konzentrationen hAgo2 titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die hAgo2-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D = 34,2 \pm 2,4$  nM sowie eine berechnete *guide* Konzentration von  $84,5 \pm 6,2$  nM (A) und  $K_D = 7,5 \pm 1,8$  nM sowie eine berechnete *guide* Konzentration von  $11,7 \pm 5,6$  nM (B).

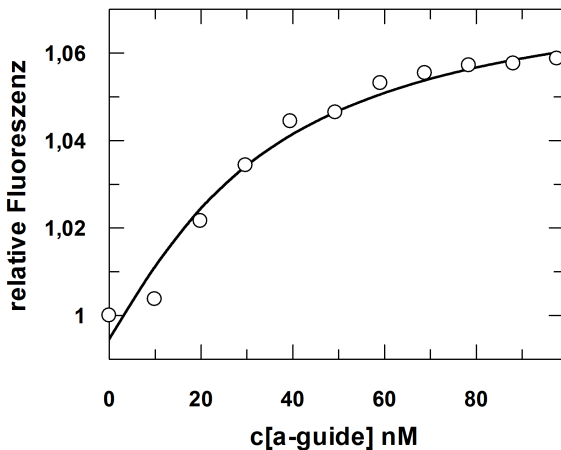
Zunächst wurde die Affinität von hAgo2 für *guide* RNAs mit einem 5'-Guanin einmal mit und einmal ohne 5'-Phosphorylierung mit Hilfe von Gleichgewichts-Fluoreszenztitrationen untersucht. Es ergaben sich Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von 34,7 nM für einen phosphorylierten und 7,5 nM für einen unphosphorylierten *guide* Strang. Damit ergibt sich im Vergleich zur *guide* RNA mit einem 5'-Uracil, wie schon in transientenkinetischen Messungen festgestellt werden konnte, ein gegensätzliches Bild (siehe Tabelle 4.11). Eine 5'-Phosphorylierung wirkt sich im Kontrast zum 5'-Uracil *guide* Strang an einer 5'-Guanin *guide* RNA negativ auf die Affinität der Bindung an hAgo2 aus. Ein unphosphorylierter *guide* Strang mit einem 5'-Guanin wird um Faktor 5 besser an hAgo2 gebunden als sein phosphoryliertes Gegenstück. Dieser Unterschied ist jedoch geringer als die Differenz zwischen den Affinitäten von hAgo2 für phosphorylierte bzw. unphosphorylierte *guide* Stränge mit einem 5'-Uracil. Ein unphosphorylierter 5'-U *guide* Strang wird um Faktor 15 schlechter gebunden als die phosphorylierte Variante.

Um die Affinität von hAgo2 für *guide* Stränge mit 5'-Adenin bzw. 5'-Cytosin in An- und Abwesenheit einer 5'-Phosphorylierung zu bestimmen, wurden sogenannte Konkurrenztitrationen durchgeführt. Dazu wurden binäre Komplexe aus hAgo2 und FAM-markierter *guide* RNA vorgelegt, die dann mit dem zu bestimmenden unmarkierten *guide* Strang kompetiert wurden.

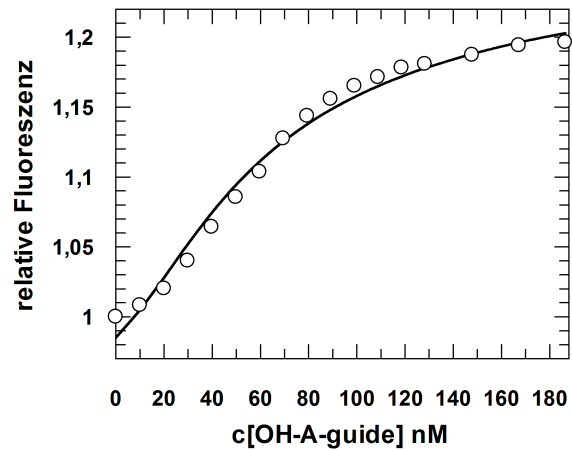
Diese Titrationen führten zu Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von  $K_D = 5,0$  nM bzw. 4,9 nM für phosphorylierte 5'-A bzw. 5'-C *guide* RNA (siehe Abbildung 4.39 A und 4.40 A). Die unphosphorylierten Varianten ergaben Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D = 6,6$  bzw. 8,2 nM (siehe Abbildung 4.39 B und 4.40 B). Damit nehmen die *guide* Stränge, welche ein 5'-Adenin oder 5'-Cytosin besitzen, eine intermediäre Position ein. Die Phosphatgruppe zeigt

#### 4. Ergebnisse

A



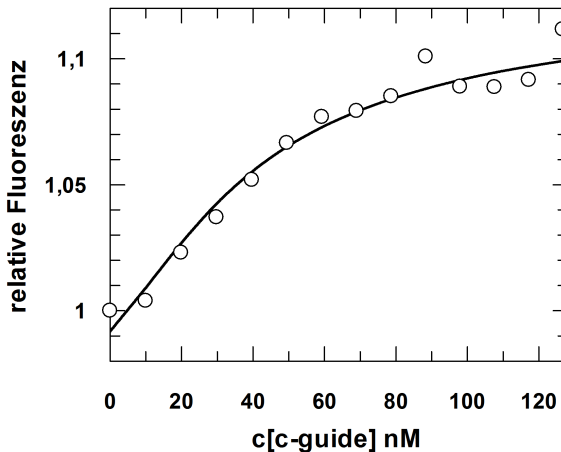
B



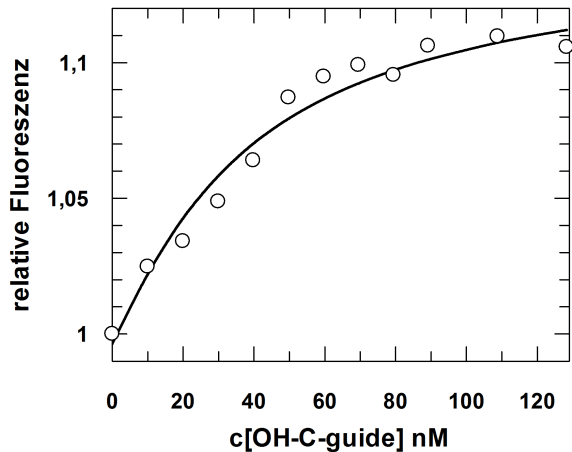
**Abbildung 4.39.: Kompetitionsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von hAgo2 für *guide* RNA mit einem 5'-Adenin.** Binäre Komplexe aus 600 nM hAgo2 und 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) wurden präassembliert. Diese wurden mit aufsteigenden Konzentrationen unmarkierter *guide* RNA (A-as2b (A) bzw. OH-A-as2b (B)) titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die *guide* RNA Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe eines Modells der Titration mit dem Programm Scientist ausgewertet und ergaben Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D = 5,0 \pm 1,9$  nM (A) und  $K_D = 8,2 \pm 2,0$  nM (B).

kaum einen Einfluss auf die Affinität. Sowohl mit als auch ohne 5'-Phosphorylierung werden sie mit einer ähnlichen Affinität gebunden (siehe Tabelle 4.11).

A

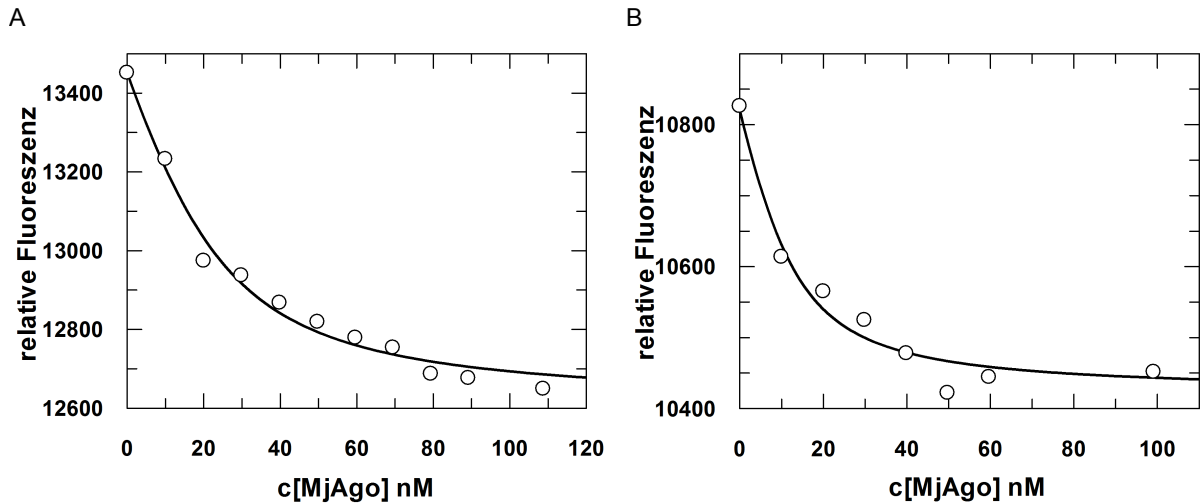


B



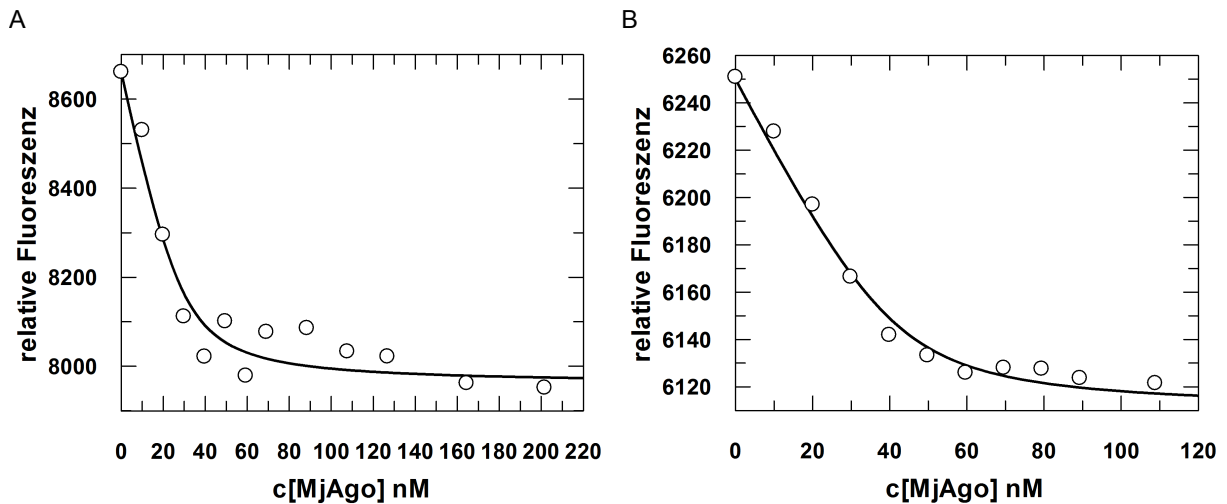
**Abbildung 4.40.: Kompetitionsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von hAgo2 für *guide* RNA mit einem 5'-Cytosin.** Binäre Komplexe aus 600 nM hAgo2 und 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) wurden präassembliert. Diese wurden mit aufsteigenden Konzentrationen unmarkierter *guide* RNA (C-s2b (A) bzw. OH-C-s2b (B)) titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die *guide* RNA Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe eines Modells der Titration mit dem Programm Scientist ausgewertet und ergaben Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D = 4,9 \pm 2,2$  nM (A) und  $K_D = 6,6 \pm 2,3$  nM (B).

Da mit dem *guide* Strang mit einem Guanin am 5'-Ende die größten Unterschiede beobachtet werden konnten, soll im Folgenden dieses 5'-Nukleotid im Kontext von MjAgo untersucht werden. Mit Hilfe von Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen wurden Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von  $K_D = 9,4$  nM und 5,0 nM für phosphorylierte bzw. unphosphorylierte *guide*



**Abbildung 4.41.: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von MjAgo für *guide* DNA mit einem 5'-Guanin.** 20 nM *guide* DNA (G-as2b<sup>FAM</sup> (A) bzw. OH-G-as2b<sup>FAM</sup> (B)) wurden mit steigenden Konzentrationen MjAgo titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die MjAgo-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D = 9,4 \pm 1,8$  nM sowie eine berechnete *guide* Konzentration von  $21,9 \pm 5,5$  nM (A) und  $K_D = 5,0 \pm 2,0$  nM sowie eine berechnete *guide* Konzentration von  $11,5 \pm 6,5$  nM (B).

DNA mit einem 5'-Guanin bestimmt (siehe Abbildung 4.41). Es zeigt sich somit, dass auch im Fall von MjAgo die 5'-Phosphorylierung an *guide* Strängen mit einem 5'-Guanin eine untergeordnete Rolle für die Affinität spielt. Außerdem ist ebenfalls eine leichte Tendenz für die



**Abbildung 4.42.: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von MjAgo für *let7* *guide* DNAs mit einem 5'-Thymin oder 5'-Guanin.** 20 nM *guide* DNA (D-T-let7<sup>FAM</sup> (A) bzw. D-G-let7<sup>FAM</sup> (B)) wurden mit steigenden Konzentrationen MjAgo titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die MjAgo-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D = 3,8 \pm 1,9$  nM und eine berechnete *guide* Konzentration von  $29,0 \pm 7,4$  nM (A) und  $K_D = 3,7 \pm 1,0$  nM und eine berechnete *guide* Konzentration von  $42,0 \pm 4,1$  nM (B).

Präferenz eines unphosphorylierten *guide* Stranges mit einem 5'-Guanin zu beobachten. Allerdings ist auch zu erkennen, dass ein phosphorylierter G *guide* Strang mit einer nur um Faktor

#### 4. Ergebnisse

3 höheren Gleichgewichtsdissoziationskonstante durch MjAgo gebunden wird, als dies für den phosphorylierten T *guide* Strang der Fall ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass MjAgo *guide* Stränge weniger stark als hAgo2 über das 5'-Nukleotid selektiert.

Neben dem Effekt der Phosphatgruppe offenbaren die vorliegenden Untersuchungen auch, dass keine Vergleichbarkeit zu Studien zur Bindung einzelner Nukleotide an eine isolierte Mid Domäne gegeben ist. Diese Studien zeigten, dass phosphorylierte C- und G- Nukleotide vergleichbar schlecht mit einer sehr viel geringeren Affinität als A- und U-Nukleotide an die Mid Domäne gebunden werden, wobei die Affinität des C-Nukleotids sogar niedriger ist, als die des G-Nukleotids. Die hier beschriebenen Experimente lassen im Gegenteil erkennen, dass die Differenzen in der Affinität von hAgo2 für *guide* Stränge mit unterschiedlichen 5'-Nukleotiden nicht so groß sind wie bisher angenommen.

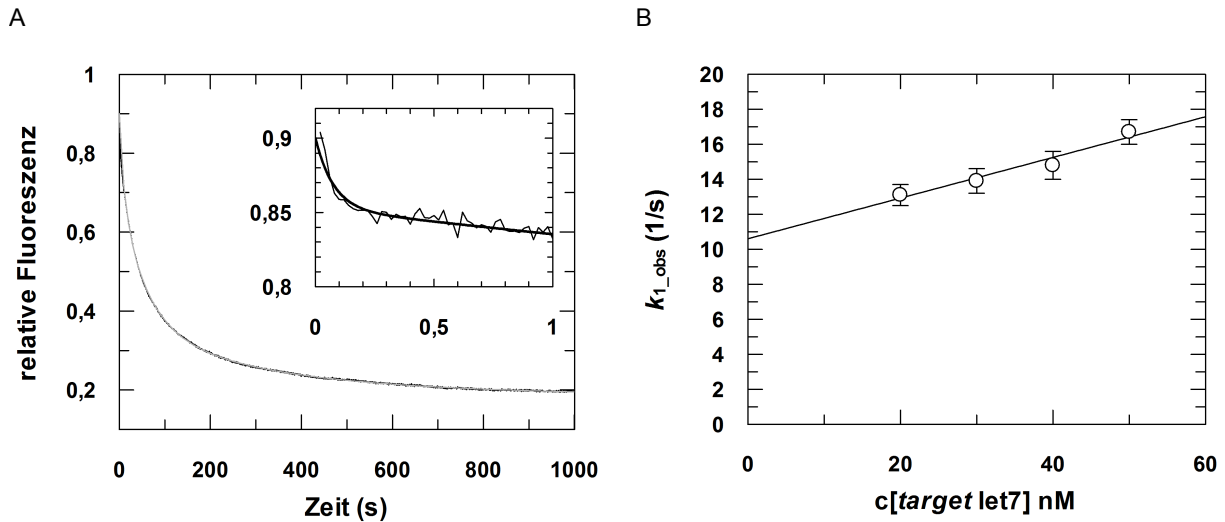
**Tabelle 4.11: Vergleich der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bildung binärer Komplexe mit Ago Proteinen und verschiedenen *guide* Strängen mit und ohne Phosphatgruppe.** Die Ratenkonstanten wurden aus mindestens 2 unabhängigen Messungen gemittelt. \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

	$K_D$ (nM)		$K_D$ (nM)	
	<b>hAgo2</b>		<b>MjAgo</b>	
G <i>guide</i>	34,7		G <i>guide</i>	9,1
OH-G <i>guide</i>	7,5		OH-G <i>guide</i>	6,6
U <i>guide</i> *	7		T <i>guide</i>	3,4
OH-U <i>guide</i> *	106		OH-T <i>guide</i>	40,3
A <i>guide</i>	5		—	—
OH-A <i>guide</i>	8		—	—
C <i>guide</i>	5		—	—
OH-C <i>guide</i>	7		—	—
—	—		G let7 <i>guide</i>	3,4
—	—		T let7 <i>guide</i>	2,5

Weiteren Aufschluss bieten Bindungsstudien mit einer *guide* DNA, deren Sequenz von der in den anderen Experimenten genutzten Standard siRNA abweicht. Es zeigt sich, dass mit der let7 *guide* DNA Gleichgewichtsdissoziationskonstanten in einer ähnlichen Größenordnung wie mit der Standard Sequenz erzielt werden. Allerdings ist kaum ein Unterschied in den Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der 5'-phosphorylierten let7 *guide* DNA mit 5'-Thymin bzw. 5'-Guanin zu beobachten (siehe Tabelle 4.11). Dies bestätigt, dass auch die übrige Sequenz eine Rolle für die Affinität von Ago Proteinen für *guide* Stränge spielen könnte.

#### 4.2.3.3. Vergleichende kinetische Analyse der Bildung ternärer Komplexe mit unterschiedlichen *guide* Strängen

Ein Einfluss der Sequenz von *guide* Strängen auf die Assoziationsratenkonstanten binärer Komplexe konnte nicht gezeigt werden. Im folgenden Abschnitt soll mit Hilfe der *stopped flow* Methode (siehe Abschnitt 3.3.6) überprüft werden, ob dies auch bei der Assoziation ternärer Komplexe der Fall ist. Diese wurde zu diesem Zweck mit dem let7 *guide-target* DNA System und MjAgo untersucht und mit den Ergebnissen des vorher verwendeten Standard si2b Konstrukts (siehe Abschnitt 4.2.2.3) verglichen.



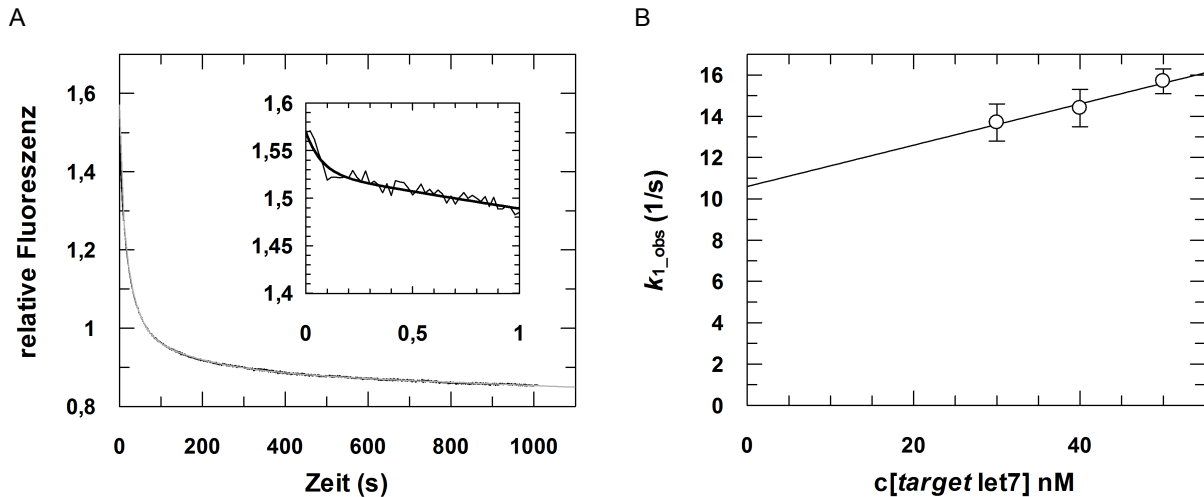
**Abbildung 4.43.: Pre-steady state Assoziationskinetik ternärer Komplexe mit MjAgo und T-let7 guide DNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden mit *guide* DNA (20 nM; D-T-let7<sup>FAM</sup>) zu binären Komplexen präassembliert. Diese binären Komplexe wurden schnell mit 20 nM let7 *target* DNA gemischt. Die Daten wurden mittels einer vierfach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 13,1 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,07 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_3 = 0,017 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$  und  $k_4 = 0,003 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  von der MjAgo Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 1,2 (\pm 0,017) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 10,6 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ .

Dazu wurden binäre Komplexe aus 600 nM MjAgo und 20 nM *guide* DNA für 10 min bei 25 °C präassembliert, um eine vollständige Assoziation von binären Komplexen sicherzustellen. Zunächst wurde ein let7 *guide* Strang mit einem Thymin am 5'-Ende verwendet. Die binären Komplexe wurden schnell mit verschiedenen Konzentrationen *target* DNA gemischt. Eine mathematische Auswertung der resultierenden Daten wurde mit Hilfe einer vierfach exponentiellen Gleichung durchgeführt (siehe Abbildung 4.43 A). Die erste schnelle Phase zeigt eine Abhängigkeit von der Konzentration der *target* DNA. Eine lineare Auswertung dieser Abhängigkeit ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 1,2 (\pm 0,017) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.43 B). Die darauf folgenden Phasen sind langsamer und nicht konzentrationsabhängig. Im Unterschied zum si2b System ist eine vierte Phase zu beobachten (siehe Tabelle 4.12). Zusätzlich zur Basenpaarung im Bereich der *seed* Region und zur Freisetzung des *guide* 3'-Ende von der PAZ Domäne im Zuge der erweiterten Basenpaarung im 3'-Bereich des *guide* Strangs ist eine vierte etwas schnellere Phase detektierbar. Sie ist vermutlich einer konformationellen Änderung zwischen Bildung des Kollisionskomplexes von binären Komplexen und *target* DNA und der nachfolgenden Nukleation der *guide-target* Wechselwirkung in der *seed* Region zuzuordnen.

Analog dazu wurden Experimente mit einem let7 *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Guanin durchgeführt. Diese Daten konnten ebenfalls mit Hilfe einer vierfach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.44 A). Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der ersten Phase ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 1,0 (\pm 0,017) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.44 B). Auch im Fall des 5'-Guanins werden nachfolgend drei langsamere Phasen detektiert, von denen die erste Phase mit dem si2b Konstrukt nicht detektiert werden konnte. Im Vergleich zu den Experimenten, die mit Hilfe eines *guide* Stranges mit einem



#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.44.: Pre-steady state Assoziationskinetik ternärer Komplexe mit MjAgo und G-let7 guide DNA.** (A) Dargestellt ist ein typischer Graph. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden mit *guide* DNA (20 nM; D-G-let7<sup>FAM</sup>) zu binären Komplexen präassembliert. Diese binären Komplexe wurden schnell mit 20 nM let7 *target* DNA gemischt. Die Daten wurden mittels einer vierfach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 13,7 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,17 \pm 0,004 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_3 = 0,04 \pm 0,0006 \text{ s}^{-1}$  und  $k_4 = 0,007 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  von der MjAgo Konzentration ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 1,0 (\pm 0,017) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 10,6 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$ .

5'-terminalen Thymin durchgeführt wurden, ist zu erkennen, dass die bestimmten Assoziationsratenkonstanten für die vier Phasen im Rahmen der Messgenauigkeit nahezu identisch sind (siehe Tabelle 4.12). Somit führt zwar eine Veränderung der gesamten Sequenz zu unterschiedlichen Assoziationsratenkonstanten, das 5'-Nukleotid scheint darauf jedoch keinen Einfluss zu haben. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass auch ein Vertauschen von *guide* und *target* Strang, d.h. wenn der *guide* Strang die Funktion des *target* Strangs übernimmt und umgekehrt, zu keiner Veränderung der Assoziationsratenkonstanten führt<sup>(218)</sup>.

Interessanterweise ist mit dem let7 *guide-target* System zu beobachten, dass die Phase, welche der Basenpaarung im Bereich der *seed* Region entspricht ( $k_3$ ), um Faktor 3 - 5 schneller ist als die korrespondierende mit dem si2b *guide-target* System ermittelte Ratenkonstante (siehe Tabelle 4.12). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die zweite nur mit dem let7 *guide-target* System detektierbare Phase einen Schritt repräsentiert, der eine beschleunigte Basenpaarung in der *seed* Region ermöglicht. Die letzte Phase, welche die Freisetzung des 3'-Endes der *guide* DNA von der PAZ Domäne und eine erweiterte Basenpaarung zwischen *guide* und *target* DNA darstellt, ist dadurch nicht beeinflusst.

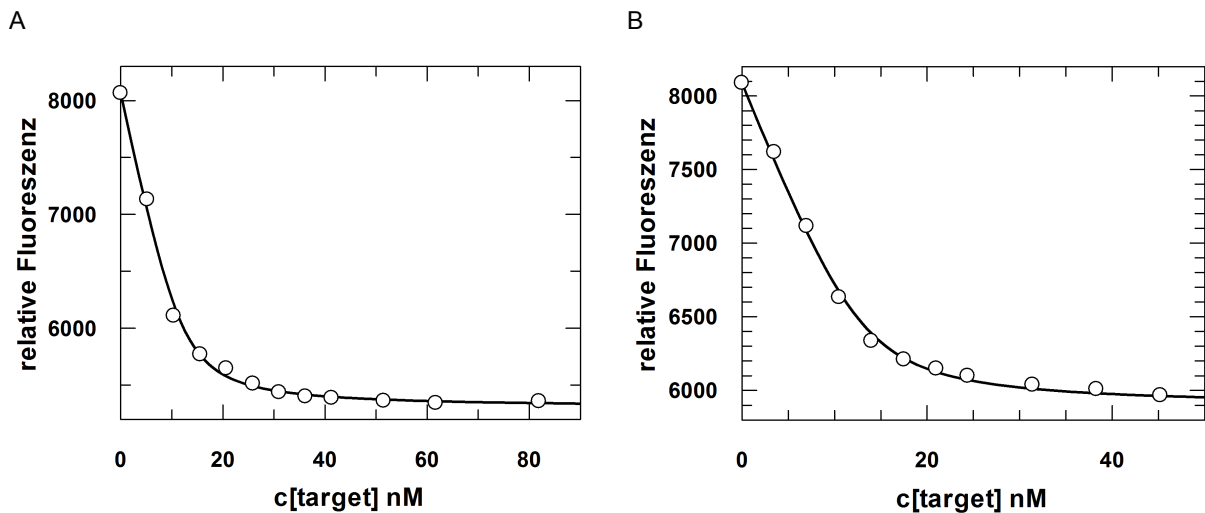
**Tabelle 4.12: Vergleich der Assoziationsratenkonstanten der Bildung ternärer Komplexe mit MjAgo und let7 guide Strängen mit verschiedenen 5'-Nukleotiden.** Die Ratenkonstanten wurden aus mindestens drei unabhängigen Messungen gemittelt.

<i>guide</i> Strang	$k_1 (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_2 (\text{s}^{-1})$	$k_3 (\text{s}^{-1})$	$k_4 (\text{s}^{-1})$
T let7 <i>guide</i>	$1,2 \times 10^8$	0,09	0,03	0,004
G let7 <i>guide</i>	$1,0 \times 10^8$	0,18	0,05	0,006
T as2b <i>guide</i>	$1,2 \times 10^8$	—	0,01	0,004



#### 4.2.3.4. Bestimmung der Affinität binärer MjAgo-let7 *guide* Komplexe für *target* DNA

Mit Hilfe des Standard si2b Konstrukts konnte gezeigt werden, dass sich die Affinitäten binärer MjAgo-*guide* DNA Komplexe für *target* DNAs nicht von der Affinität der Nukleinsäuren in Abwesenheit von Protein unterscheidet (siehe Abschnitt 4.2.2.4). Da sich die Assoziationsratenkonstanten für die Assemblierung ternärer Komplexe mit dem let7 *guide-target* Konstrukt von denen des Standard si2b Konstrukts unterscheiden, wird im folgenden Abschnitt beschrieben, wie sich die let7 *guide-target* Kombination auf die Affinitäten der ternären Komplexe auswirkt.



**Abbildung 4.45.: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von binären MjAgo-let7 *guide* DNA Komplexen für *target* DNA.** 20 nM *guide* DNA (D-T-let7<sup>FAM</sup> (A) bzw. D-G-let7<sup>FAM</sup> (B)) wurden mit 600 nM MjAgo präassembliert und mit steigenden Konzentrationen *target* DNA titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die Konzentration der *target* DNA aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $1,1 \pm 0,2$  nM (A) bzw.  $1,1 \pm 0,1$  nM (B) mit jeweils einer berechneten *guide* Konzentration von  $12,2 \pm 0,7$  nM (A) bzw.  $13,2 \pm 0,7$  nM (B).

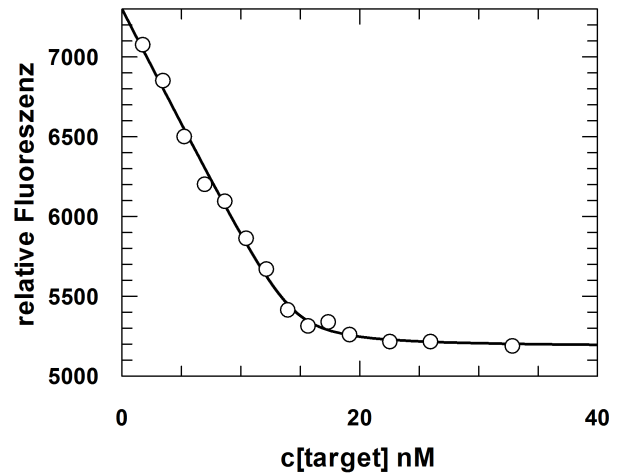
Um dies zu untersuchen, wurden Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen durchgeführt. Binäre Komplexe aus MjAgo und 5'-phosphorylierter und FAM-markierter let7 *guide* DNA wurden präassembliert und mit aufsteigenden Konzentrationen *target* DNA titriert. Dies wurde sowohl mit einem 5'-Thymin (siehe Abbildung 4.45 A) als auch mit einem 5'-Guanin (siehe Abbildung 4.45 B) am *guide* Strang durchgeführt. Die resultierenden Titrationskurven konnten mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.45). Die dadurch ermittelte Gleichgewichtsdissoziationskonstante beträgt in beiden Fällen 1,1 nM. Wie auch schon mit dem Standard si2b Konstrukt wird mit unterschiedlichen 5'-Nukleotiden kein Unterschied in der Affinität der binären Komplexe für die *target* DNA beobachtet.

Die Bestimmung der Affinität der Nukleinsäuren in Abwesenheit von MjAgo ergibt eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 0,2 nM (siehe Abbildung 4.46). Damit ist die Affinität der Nukleinsäuren füreinander in Abwesenheit des Proteins wesentlich höher als im ternären Komplex. Dies ist mit dem Standard si2b Konstrukt nicht der Fall. Mit dem Standard si2b Konstrukt ist die Affinität der Nukleinsäuren in Abwesenheit von MjAgo nahezu identisch zur Affinität im ternären Komplex (siehe Abschnitt 4.2.2.4). Offenbar wechselwirkt MjAgo mit dem let7 *guide-*

#### 4. Ergebnisse

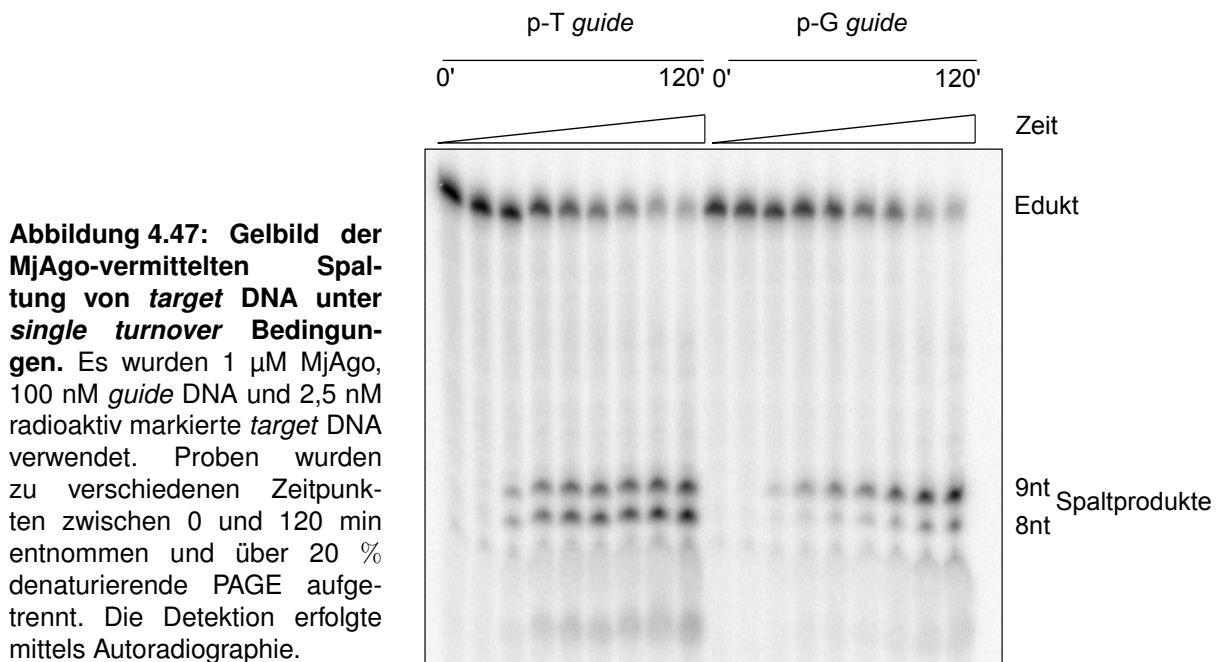
*target* Duplex und schwächt die Interaktionen zwischen *guide* und *target* DNA. Dies könnte zum Beispiel über eine sequenzabhängig leicht veränderte Helixgeometrie vermittelt werden.

**Abbildung 4.46: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von *let7* *guide* DNA und *target* DNA in Abwesenheit von MjAgo.** 20 nM *guide* DNA (D-T-*let7*<sup>FAM</sup>) wurden mit steigenden Konzentrationen *target* DNA (D-*let7* *target*) titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die Konzentration der *target* DNA aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $0,2 \pm 0,06$  mit einer berechneten *guide* Konzentration von  $14,5 \pm 0,4$  nM.



#### 4.2.3.5. Biochemische Analyse der Auswirkungen verschiedener *guide* Sequenzen auf die Ago-vermittelte Spaltung

Im folgenden Abschnitt werden Untersuchungen zum Einfluss der *guide* Strang Sequenz auf die Spaltung von *target* Strängen vorgestellt. Die Studien zur Assoziation und Affinität ternärer Komplexe mit verschiedenen *guide* Strängen und 20 - 21 nt langen *target* Strängen zeigten sequenzabhängige Unterschiede (siehe Abschnitt 4.2.3.4 und 4.2.3.3). Mit Hilfe der Spaltexperimente sollte untersucht werden, ob sich diese Differenzen in den ternären Komplexen auf die Spaltung der *target* Stränge auswirken.

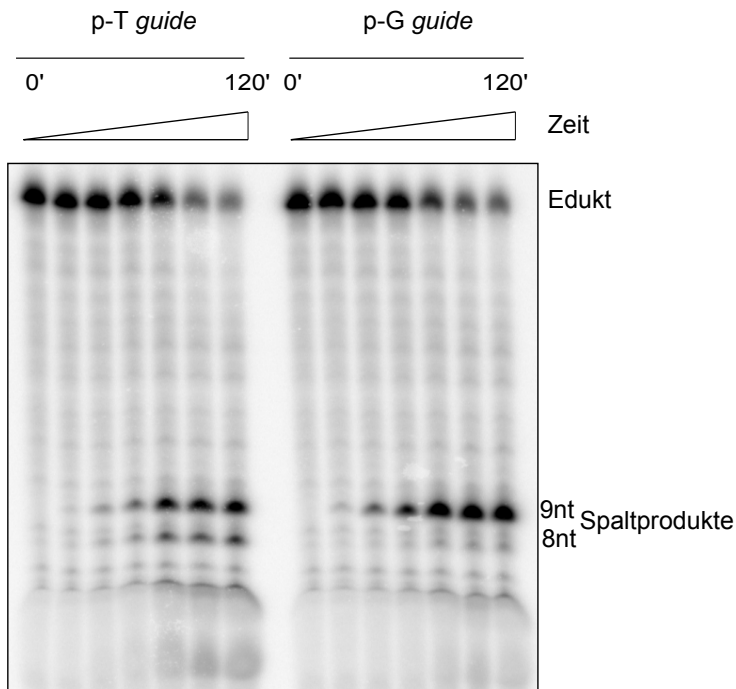


**Abbildung 4.47: Gelbild der MjAgo-vermittelten Spaltung von *target* DNA unter *single turnover* Bedingungen.** Es wurden 1  $\mu$ M MjAgo, 100 nM *guide* DNA und 2,5 nM radioaktiv markierte *target* DNA verwendet. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 120 min entnommen und über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

Zunächst wurden dazu Spaltexperimente mit MjAgo und dem *let7* Konstrukt durchgeführt. Transientenkinetische Analysen zur Assemblierung des ternären Komplexes zeigten im Ver-

gleich zum Standard si2b Konstrukt eine zusätzliche Phase der *target* DNA Bindung (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Ein Einfluss des 5'-Nukleotids konnte nicht nachgewiesen werden.

Trotzdem wurden *guide* Stränge mit einem 5'-Thymin oder mit einem 5'-Guanin für die Versuche eingesetzt, um die in Bindungsexperimenten gewonnenen Erkenntnisse in den Spaltexperimenten zu überprüfen. Sowohl unter *single turnover* als auch unter *multiple turnover* Bedingungen zeigte sich im direkten Vergleich, dass die Identität des 5'-Nukleotids einen Einfluss auf die Bildung ternärer Komplexe hat, obwohl dies in den Bindungsexperimenten nicht detektiert werden konnte.



**Abbildung 4.48: Gelbild der MjAgo-vermittelten Spaltung von target DNA unter multiple turnover Bedingungen.** Es wurden 1  $\mu$  M MjAgo, 20 nM *guide* DNA und 100 nM radioaktiv markierte *target* DNA verwendet. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 120 min entnommen und über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

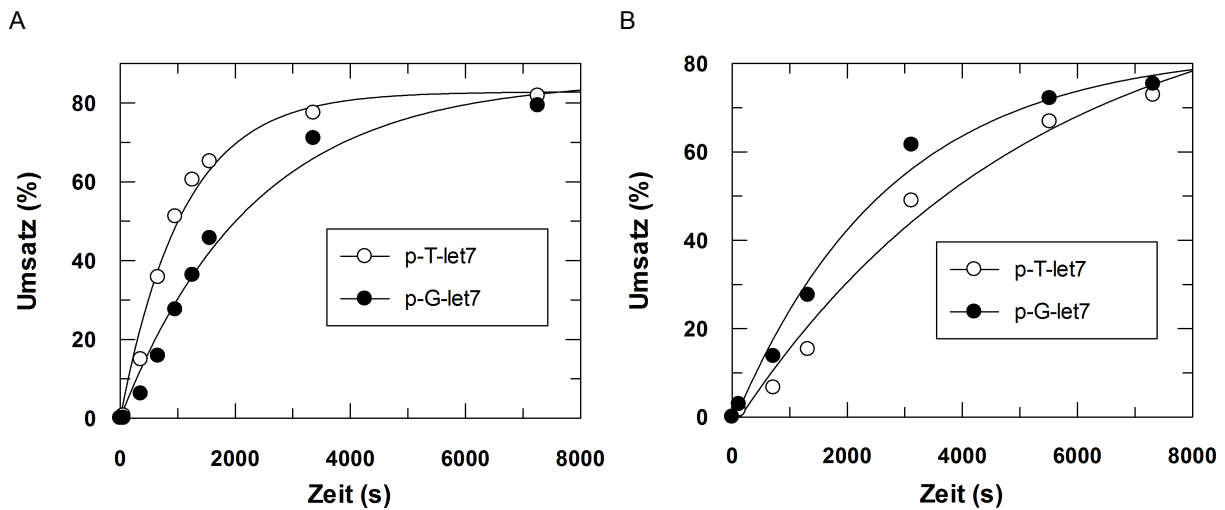
Die durch die Auswertung der Bindungsexperimente aufgestellte Hypothese, dass sich ternäre Komplexe abhängig von den gebundenen *guide-target* Sequenzen unterscheiden, konnte jedoch bestätigt werden. Sowohl mit einem 5'-Guanin als auch mit einem 5'-Thymin waren im Gegensatz zum Standard si2b Konstrukt zwei Spaltprodukte zu erkennen (siehe Abbildung 4.47). Diese waren unter *single turnover* Bedingungen besonders deutlich erkennbar. Das kanonische Spaltprodukt hat eine Größe von 9 Nukleotiden und wurde durch den let7 *guide* mit einem 5'-Guanin zu einem wesentlich höheren Anteil produziert als das um ein Nukleotid verkürzte Spaltprodukt.

Das Gegenteil stellte sich mit dem let7 *guide* mit einem 5'-Thymin heraus. Hier wurde zu einem größeren Anteil das verkürzte Spaltprodukt gebildet. Ein 5'-Thymin führt offenbar eher zu einer abweichenden Positionierung des *guide* Stranges im MjAgo Protein als ein 5'-Guanin.

Eine mathematische Auswertung der Daten mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung zeigt, dass mit einem *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Thymin die Ratenkonstante für die Spaltung mit  $k_{Spaltung} = 0,0009 \text{ s}^{-1}$  um etwa Faktor zwei höher ist als mit einem 5'-Guanin *guide* Strang, der zu einer Ratenkonstante  $k_{Spaltung} = 0,0004 \text{ s}^{-1}$  führt (siehe Abbildung 4.49 A). Die schnellere Spaltung ist jedoch korreliert mit einer höheren Fehlerrate bei der Determinierung der Spaltposition unter *single turnover* Bedingungen. Die Ratenkonstante  $k_{Spaltung}$  repräsen-

#### 4. Ergebnisse

tiert dabei nicht die Geschwindigkeit des chemischen Spaltprozesses. Sie beschreibt jeweils den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, welcher unter *single turnover* Bedingungen in der Bindung des binären Komplexes an eine passende *target* DNA zu finden ist.



**Abbildung 4.49.: Kinetische Analyse der Spaltaktivität mit let7 guide DNA unter multiple turnover und single turnover Bedingungen.** Im Standard Spalttest wurde entweder let7 guide DNA mit einem Thymin oder Guanin am 5'-Ende eingesetzt, um MjAgo für die Spaltung der let7 target DNA zu programmieren. Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen, über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. (A) Unter *single turnover* Bedingungen (1  $\mu\text{M}$  MjAgo, 100 nM guide DNA, 2,5 nM target DNA) ergaben sich folgende Ratenkonstanten und Amplituden: 5'-T guide DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0009 (\pm 9 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $83 \pm 3 \%$  und 5'-G guide DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0004 (\pm 6 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $86 \pm 5 \%$ . (B) Unter *multiple turnover* Bedingungen (1  $\mu\text{M}$  MjAgo, 20 nM guide DNA, 100 nM target DNA) ergaben sich folgende Ratenkonstanten und Amplituden: 5'-T guide DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0002 (\pm 7 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $102 \pm 19 \%$  und 5'-G guide DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0004 (\pm 6 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $85 \pm 6 \%$ .

Unter *multiple turnover* Bedingungen zeichnete sich ein anderes Bild ab. Auch hier führt das 5'-Thymin am guide Strang zu einer geringeren Genauigkeit im Vergleich zum 5'-Guanin. Allerdings liegt unter *multiple turnover* Bedingungen die Ratenkonstante der Spaltung mit dem 5'-Thymin-tragenden guide Strang in einer ähnlichen Größenordnung wie mit dem 5'-Guanin guide Strang. Unter *multiple turnover* Bedingungen wird diese Ratenkonstante vermutlich durch die Freisetzung der Spaltprodukte begrenzt.

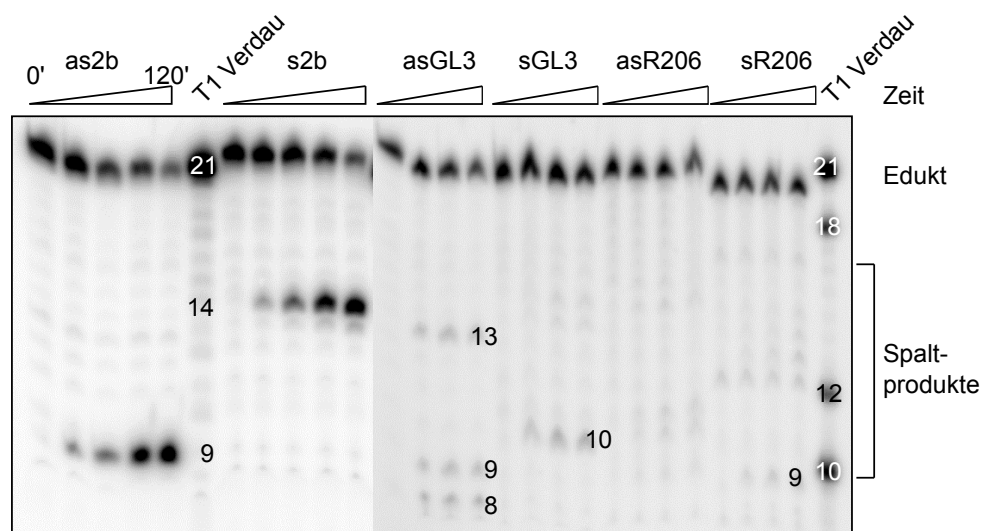
An Hand des Gels ist zu erkennen, dass unter *multiple turnover* Bedingungen im Vergleich zu *single turnover* Bedingungen insgesamt eine Erhöhung der Genauigkeit der Spaltposition festzustellen ist (siehe Abbildung 4.48). Dies ist mit einem 5'-Guanin wesentlich ausgeprägter als mit einem 5'-Thymin. Mit dem 5'-Guanin guide Strang kommt es zu einem annähernden Verlust des nicht-kanonischen Spaltprodukts, aber auch mit dem 5'-Thymin guide Strang beginnt das kanonische Spaltprodukt zu dominieren. Dies weist darauf hin, dass der binäre Komplex im Fall des let7 Konstrukts erst nach ersten Runden der Spaltung einer target DNA in der richtigen Konformation vorliegt. Nur diese Konformation ermöglicht eine akkurate Positionierung der target Stränge im aktiven Zentrum und somit eine exakte Bestimmung der Spaltposition. Die

Bindung und Spaltung eines *target* Stranges spielt somit eine Rolle für die richtige Positionierung des *guide* Stranges.

Möglicherweise wird diese ungenaue Positionierung des let7 *guide* Stranges im Protein vor der ersten *target* Spaltung durch die neu hinzugekommene Phase der Bildung ternärer Komplexe reflektiert. Sowohl die transienten Bindungsexperimente als auch die Spaltexperimente mit verschiedenen 5'-Nukleotiden am let7 *guide* Strang lassen darauf schließen, dass eine erhöhte Flexibilität im 5'-Bereich des let7 *guide* Stranges besteht. Vermutlich existieren für diesen *guide* Strang verschiedene Möglichkeiten der Positionierung in der Mid Bindungstasche und dem Nukleinsäurebindungskanal. Somit besteht die Option für einige Basen in der *seed* Region, durch eine flexible Positionierung des *guide* 5'-Endes so aus dem Nukleinsäurebindungskanal herauszuragen, dass eine schnellere Assoziation mit einer *target* DNA stattfinden kann als dies mit einer normal präarrangierten *seed* Region möglich ist. Dies impliziert allerdings, dass in den transientenkinetischen Ensemblemessungen Populationen von zwei verschiedenen Komplexen beobachtet werden. Eine Population von Komplexen, welche die *guide* DNA korrekt inkorporiert hat, bindet dabei die *target* DNA in der kanonischen Position über Basenpaarung in der *seed* Region, gefolgt von erweiterten Basenpaarung und einer Freisetzung des *guide* 3'-Endes von der PAZ Domäne. Eine andere Population von Komplexen bindet das 5'-Ende des *guide* Stranges anders in der Mid Bindungstasche. Dadurch ist die *seed* Region abweichend arrangiert, so dass zunächst nur ein oder zwei Basenpaare sehr schnell ausgebildet werden, gefolgt von erweiterter *seed* Basenpaarung und Basenpaarung im 3'-Bereich im Kontext der Freisetzung des *guide* 3'-Endes. Werden dann *target* DNAs gebunden und gespalten, kommt es zu einer endgültigen Positionierung des *guide* Stranges im Protein und nur noch das kanonische Spaltprodukt mit 9 Nukleotiden Größe wird gebildet. Die multiplen Zyklen der Bindung und Spaltung von *target* DNAs bieten die Aktivierungsenergie, die der *guide* Strang benötigt, um eine neue energetisch günstigere Position einzunehmen. Im Rahmen wiederholter Bindung und Spaltung von *target* DNAs erreicht der binäre Komplex aus MjAgo und *guide* DNA so ein energetisches Minimum und eines der Spaltprodukte beginnt zu dominieren. Diese Hypothese wird durch die in den transienten Bindungsstudien ermittelte Amplitude der neu hinzugekommenen Phase unterstützt. Mit der 5'-Thymin *guide* DNA, die im Vergleich zum 5'-Guanin *guide* Strang zu einer geringeren Genauigkeit bei der Positionierung der Spaltstelle führt, ist die Amplitude der neu hinzugekommenen Phase etwa doppelt so hoch (siehe Abbildung 4.43 und 4.44).

In einem nächsten Schritt wurden verschiedene *guide* bzw. *target* RNA Sequenzen mit Hilfe von hAgo2 auf die Positionierung der Spaltstelle überprüft. Im Rahmen der Promotion von Dr. A. Deerberg konnte bereits gezeigt werden, dass kein Effekt auf die Assoziationsratenkonstanten ternärer Komplexe beobachtet werden kann, wenn *guide* und *target* RNA ausgetauscht werden, d.h. die *guide* RNA als *target* RNA eingesetzt wird und umgekehrt<sup>(218)</sup>. Ein möglicher Einfluss auf die Positionierung des *guide-target* Duplexes im Ago Protein und folglich die Position der Spaltung in der *target* RNA wurde bisher nicht untersucht. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene vollständig komplementäre siRNA Paare eingesetzt, um die Spaltung der jeweils als *target* RNA selektierten RNA zu analysieren.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.50.: Gelbild der hAgo2-vermittelten Spaltung von *target* RNAs.** Es wurden 2,5  $\mu\text{M}$  hAgo2, 100 nM *guide* RNA und 2,5 nM radioaktiv markierte *target* RNA verwendet. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 120 min entnommen und über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

Die Verwendung verschiedener *guide* Sequenzen führt zu unterschiedlichen Positionierungen des *guide-target* Duplexes relativ zum aktiven Zentrum des Ago Proteins und somit zu verschiedenen Spaltproduktgrößen. Weiterhin werden sequenzabhängig mehrere Spaltprodukte detektiert, wie es auch für das MjAgo Protein mit dem *let7* Konstrukt beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus transienten Bindungsexperimenten ist es dabei nicht irrelevant, in welcher Orientierung siRNAs im Ago Protein gebunden werden. Die Position der Spaltstelle und die Anzahl der Spaltprodukte kann sich bei Verwendung eines siRNA Paares erheblich unterscheiden, je nachdem welche der beiden Nucleinsäuren als *guide* bzw. *target* RNA selektiert wurde (siehe as2b vs s2b; asGL3 vs sGL3 in Abbildung 4.50). Es scheinen also nur bestimmte Sequenzabschnitte die Positionierung des *guide-target* Duplexes zu beeinflussen.

Ein Einfluss des 5'-Nucleotids ist vermutlich abhängig von der gesamten Sequenz. Mit der Standard as2b/s2b siRNA, die zur Bildung von nur einem Spaltprodukt führt, kann durch die Verwendung eines 5'-Guanins anstatt des 5'-Uracils keine Veränderung der Spaltposition oder Effizienz der Spaltung detektiert werden. Ebenso findet mit unveränderter Position Spaltung mit einem 5'-terminalen Cytosin bzw. Adenin statt (Daten nicht gezeigt). Im Kontext der Ergebnisse für die MjAgo-vermittelte Spaltung des *let7* Konstrukts kann gefolgert werden, dass das 5'-Nucleotid nur dann einen Einfluss auf die Genauigkeit der Positionierung des *guide-target* Duplexes im Ago Protein hat, wenn es für den *guide-target* Duplex mehrere Möglichkeiten gibt, an das Ago Protein zu binden. Dies wiederum ist abhängig von der Sequenz und den daraus resultierenden Optionen für die Interaktionen zwischen Duplex und Ago Protein.

Außerdem scheint die Sequenz die Effizienz der Spaltung zu beeinflussen. Mit dem siRNA Paar asR206/sR206 konnte nur dann ein Spaltprodukt detektiert werden, wenn sR206 als *guide* Strang ausgewählt wurde. Mit dem siRNA Paar as2b/s2b zeigt hAgo2 einen deutlich höheren Umsatz der *target* RNA als mit den anderen siRNA Paaren. Weiterhin ist es offenbar unerheb-

lich welcher Strang des si2b Konstrukts als *guide* RNA ausgewählt wird. Die Effizienz ist in beiden Fällen nahezu identisch. Dies hängt vermutlich von der Positionierung des spaltbaren Phosphats relativ zum aktiven Zentrum ab, welche von der Struktur des *guide-target* Duplexes beeinflusst wird. Die verwendeten *target* RNAs entsprechen in ihrer Struktur und Länge dem *passenger* Strang. Möglicherweise werden entgegen der allgemeinen Lehrmeinung<sup>(55,56)</sup> nicht alle *passenger* siRNAs gespalten, um aus dem RISC entfernt zu werden.

#### 4.2.4. Biochemische Analyse des Einflusses der *target* Länge auf die Bildung ternärer Komplexe

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurde ein vereinfachtes System mit einem *target* Strang verwendet, welcher in seiner Länge dem *passenger* Strang entspricht. Diese vereinfachende Annahme wurde getroffen, nachdem in den Spaltexperimenten keine Unterschiede in Effizienz und Ratenkonstante zwischen einer langen und einer kurzen *target* RNA festgestellt wurde (siehe Abschnitt 4.2.1.4). Allerdings sind dadurch keine Kontakte des *target* Stranges außerhalb des *guide-target* Duplexes mit dem Ago Protein möglich. Schon 2007 vermutete die Arbeitsgruppe um Renée Schröder jedoch, dass Interaktionen der *target* RNA mit dem Ago Protein einen Einfluss auf die Bindung an binäre Komplexe haben können<sup>(107)</sup>. Im folgenden Abschnitt soll die Bildung ternärer Komplexe mit langen *target* Strängen und deren Affinität beschrieben werden.

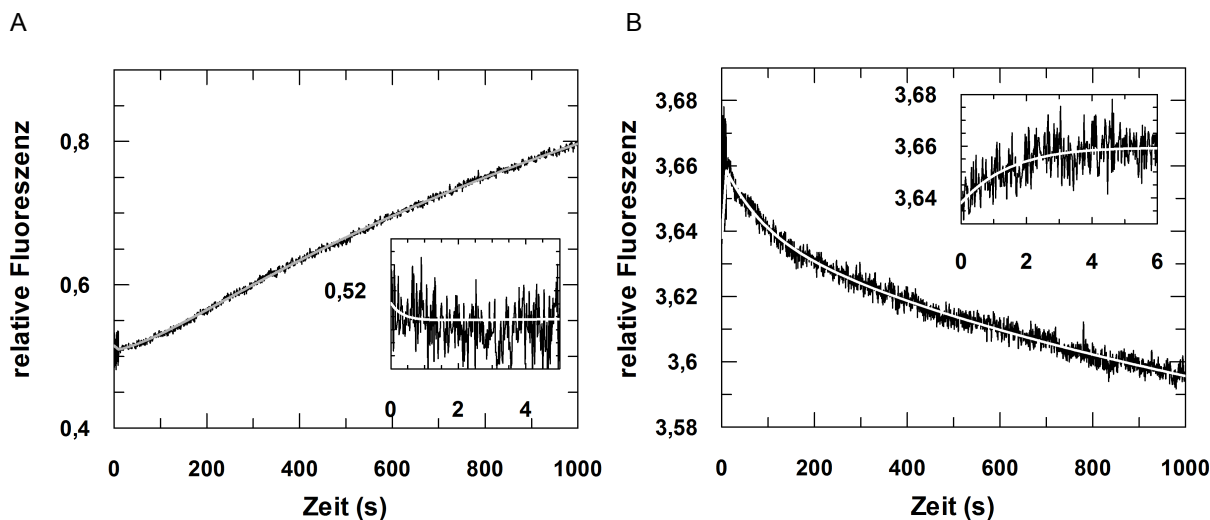
##### 4.2.4.1. Einfluss der *target* Strang Länge auf die Kinetik der Assoziation ternärer Komplexe

Zunächst wurden Assoziations- und Dissoziationskinetik der Bildung ternärer Komplexe mit der 140 nt langen ICAM *in vitro* Transkript (ICAM IVT) *target* RNA analysiert. Da das ICAM IVT eine *target* Sequenz enthält, die komplementär zum as2b *guide* Strang ist, wurde as2b<sup>FAM</sup> als *guide* RNA eingesetzt. Diese wurde mit hAgo2 für 10 min bei 25 °C präinkubiert, um eine vollständige Assoziation der *guide* RNA mit hAgo2 sicherzustellen. Die binären Komplexe wurden schnell mit dem ICAM IVT gemischt. Ebenso wie mit dem kurzen *target* Strang ließen sich die Daten am besten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung beschreiben (siehe Abbildung 4.51 A). Es konnte eine erste schnelle von der Konzentration der Reaktanden abhängige Phase bestimmt werden. Die nachfolgenden Phasen sind langsamer und unabhängig von der Konzentration. Um die Dissoziation zu untersuchen, wurden ternäre Komplexe präassembliert und mit einem hohen Überschuss an kurzer unmarkierter *guide* RNA gemischt. Dadurch wurde die Reassoziations von dissoziierten *target* RNAs verhindert. Auch diese Daten konnten dreifach exponentiell ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.51 B).

Ein Vergleich mit den für kurze *target* RNAs bestimmten Ratenkonstanten zeigt Unterschiede zwischen den Assoziationskinetiken ternärer Komplexe mit kurzen und langen *target* RNAs. Mit der kurzen *target* RNA stellt die Dissoziationsratenkonstante  $k_{-3}$  den Geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt unter *multiple turnover* Bedingungen dar. Dies kann mit der langen *target* RNA nicht bestätigt werden. Hier repräsentiert die Assoziationsratenkonstante  $k_3$  den geschwindigkeitslimitierenden Schritt. Offenbar wird eine lange *target* RNA anders gebunden



#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.51.: Pre-steady state Kinetik ternärer Komplexe mit der ICAM *in vitro* Transkript 140 nt target RNA.** Dargestellt sind typische Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. (A) Assoziation ternärer Komplexe. 600 nM hAgo2 wurden mit *guide* RNA (20 nM; as2b<sup>FAM</sup>) zu binären Komplexen präassembliert. Diese binären Komplexe wurden schnell mit 20 nM ICAM *in vitro* Transkript gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 2,9 \pm 1,8 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,01 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,0007 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Dissoziation ternärer Komplexe. Ternäre Komplexe aus 600 nM hAgo2, *guide* RNA (20 nM; as2b<sup>FAM</sup>) und *target* RNA (40 nM; ICAM *in vitro* Transkript) wurden präassembliert und dann schnell mit 2  $\mu\text{M}$  unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die Auswertung erfolgte mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung und ergab folgende Ratenkonstanten:  $k_{-1} = 0,6 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-2} = 0,01 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-3} = 0,002 \pm 0,0008 \text{ s}^{-1}$ .

bzw. geht zusätzliche Interaktionen mit dem Ago Protein ein, so dass die Dissoziation beschleunigt wird und die Assoziation langsamer abläuft. Obwohl die as2b *target* Position im ICAM IVT sehr gut zugänglich ist<sup>(101)</sup>, könnten für eine langsamere Assoziation neben Interaktionen der *target* RNA mit dem Protein auch Sekundärstrukturen verantwortlich sein. Kontakte der *target* RNA zu hAgo2 stellen dagegen vermutlich den Grund für die schnellere Dissoziation dar. Sowohl die Dissoziation im 3'-Bereich der *guide* RNA als auch die Dissoziation von *guide* und *target* in der *seed* Region sind mit dem ICAM IVT im Vergleich zum kurzen *target* Strang um eine Log-Stufe beschleunigt (siehe Tabelle 4.13).

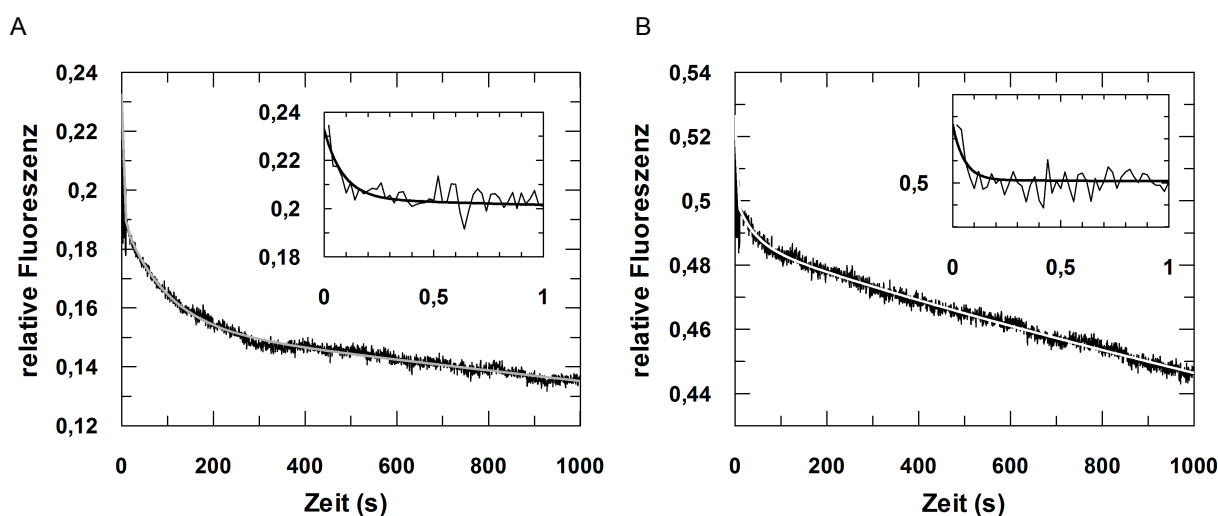
**Tabelle 4.13.: Vergleich der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten ternärer Komplexe mit hAgo2 und 21 nt bzw. 140 nt target DNA.** Die Ratenkonstanten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Messungen gemittelt. \* = Ratenkonstante im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt.

	$k_1 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$k_{-1} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_D \text{ (nM)}$
<b>21 nt target</b>	$3,2 \times 10^8^*$	2,0	0,01	0,002	0,003	0,0002	0,1
<b>140 nt target</b>	$0,2 \times 10^8$	0,6	0,02	0,01	0,0006	0,002	50

Um den Effekt eines verlängerten *target* Stranges auf die Assoziation ternärer Komplexe besser zu verstehen, wurde in einem zweiten Versuch eine 40 nt lange *target* DNA eingesetzt. Diese ist komplementär zum let7 *guide* Strang. Assoziationskinetiken wurden sowohl mit einem



5'-terminalen Thymin als auch mit einem 5'-terminalen Guanin am *guide* Strang analysiert. Ansonsten wurden diese Experimente mit MjAgo und 40 nt *target* DNA analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit hAgo2 und ICAM IVT durchgeführt. Im Gegensatz zu den Untersuchungen des ternären Komplexes mit dem *let7* *guide* Strang und einer kurzen *target* DNA wurden Unterschiede in den Ratenkonstanten mit unterschiedlichen 5'-Nukleotiden festgestellt. Die Daten wurden am Besten durch eine dreifach exponentielle Gleichung beschrieben (siehe Abbildung 4.52), die ternären Komplexe mit kurzen *target* DNAs dagegen mit einer vierfach exponentiellen Gleichung. Die Auswertung der nicht von der Konzentration abhängigen Ratenkonstanten offenbart entscheidende Unterschiede zwischen ternären Komplexen mit einem 5'-Thymin und einem 5'-Guanin am *guide* Strang (siehe Tabelle 4.14).



**Abbildung 4.52.: Pre-steady state Assoziationskinetik ternärer Komplexe mit MjAgo und einer 40 nt *let7* *target* DNA.** Dargestellt sind typische Graphen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt der Reaktion mit einer kürzeren Zeitachse. 600 nM MjAgo wurden mit *guide* DNA (20 nM; (A) D-T-*let7*<sup>FAM</sup> bzw. (B) D-G-*let7*<sup>FAM</sup>) zu binären Komplexen präassembliert. Diese binären Komplexe wurden schnell mit 20 nM 40 nt *let7* *target* DNA gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten: (A)  $k_1 = 11,6 \pm 1,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,17 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,01 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  (B)  $k_1 = 18,7 \pm 2,5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,03 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,002 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$ .

Wird die Assoziation ternärer Komplexe mit einem *let7* *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Thymin untersucht, ist die letzte Phase der ternären Komplexbildung nicht mehr zu beobachten. Diese Phase repräsentiert die Freisetzung des *guide* Stranges aus der PAZ Domäne und die damit assoziierte erweiterte Basenpaarung. Im nächsten Kapitel (siehe Abschnitt 4.2.4.3) zeigt sich, dass diese langen *target* DNAs trotzdem gespalten werden.

Die Freisetzung des 3'-Endes der *guide* DNA aus der PAZ Domäne ist mit der 40 nt *target* RNA zu beobachten, wenn sich am 5'-Ende des *guide* Stranges ein Guanin befindet. Dafür fehlt mit einem 5'-Guanin die zweite Phase, die erstmals bei Verwendung des *let7* Konstrukts beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.3.3) und vermutlich die Bildung von zwei oder mehreren Populationen ternärer Komplexe reflektiert, die den *guide* Strang in unterschiedlichen Positionen binden. Diese Vermutung wird durch später beschriebene Spaltexperimente erhärtet, die zeigen, dass im Gegensatz zum 5'-T *guide* mit dem 5'-G *guide* Strang bei Verwendung eines langen *target* Strangs ein Spaltprodukt sehr stark dominiert (siehe Abschnitt 4.2.4.3).

#### 4. Ergebnisse

Mit einer längeren *target* DNA können also Unterschiede in der Assemblierung der ternären Komplexe beobachtet werden, die mit einer kurzen *target* DNA verborgen bleiben. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Konformation des Ago Proteins sich vor allem in Bereichen ändert, die nicht mit dem *guide-target* Duplex interagieren. Erst ein überhängender *target* Strang kann durch diese konformationellen Änderungen beeinflusst werden.

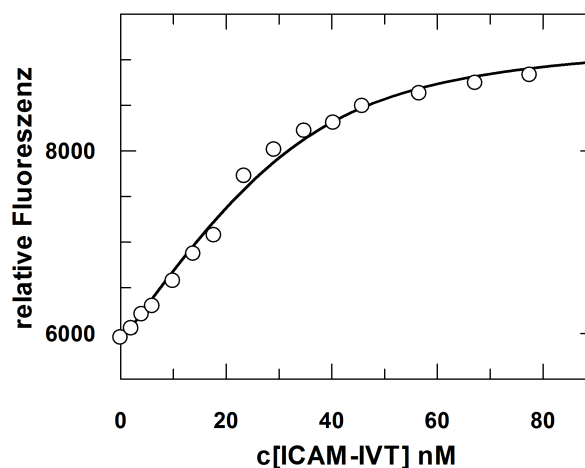
**Tabelle 4.14: Vergleich der Assoziationsratenkonstanten der Bildung ternärer Komplexe mit MjAgo und let7 *guide* Strängen mit verschiedenen 5'-Nukleotiden und einer 20 nt bzw. 40 nt *target* DNA.** Die Ratenkonstanten wurden aus mindestens 2 unabhängigen Messungen gemittelt. n.b. = nicht bestimmt.

<i>guide</i> Strang	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_4$ ( $s^{-1}$ )
<b>20 nt <i>target</i> DNA</b>				
T let7 <i>guide</i>	$1,2 \times 10^8$	0,09	0,03	0,004
<b>40 nt <i>target</i> DNA</b>				
T let7 <i>guide</i>	$0,8 \times 10^8$	0,2	0,013	—
G let7 <i>guide</i>	n.b.	—	0,04	0,004

#### 4.2.4.2. Untersuchung der Affinität ternärer Komplexe in Abhängigkeit von der *target* Länge

Die kinetische Analyse der Assemblierung ternärer Komplexe hat ergeben, dass große Unterschiede zwischen längeren *target* Strängen und *target* Strängen, die in der Länge den *passenger* Strängen entsprechen, bestehen. Im folgenden Abschnitt wird die Affinität binärer Ago-*guide* Komplexe für lange *target* Stränge beschrieben.

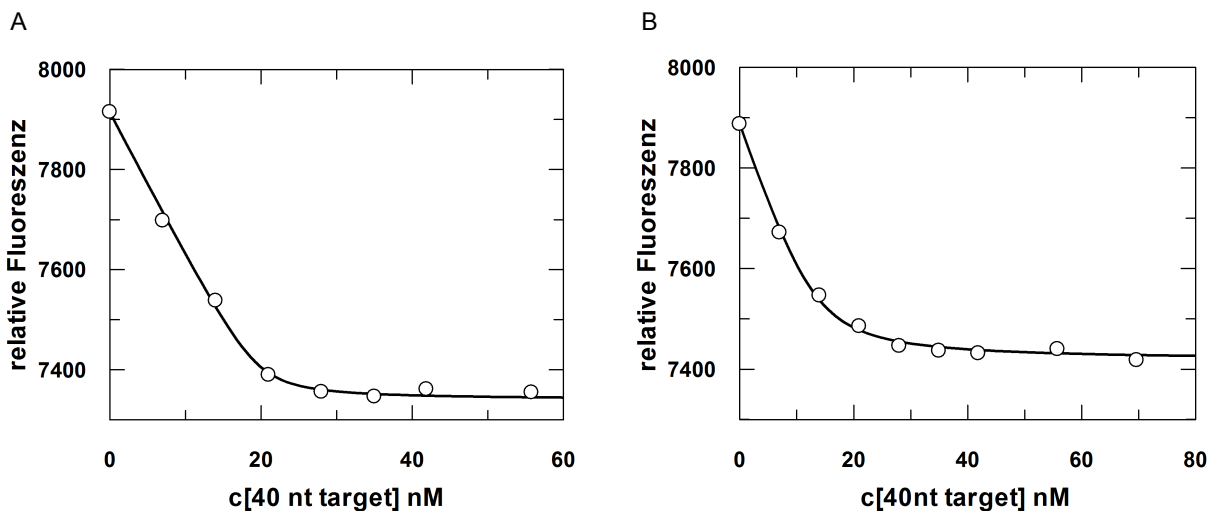
**Abbildung 4.53: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von binären hAgo2-as2b *guide* RNA Komplexen für das ICAM-IVT.** 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) wurden mit 500 nM hAgo2 präassembliert und mit steigenden Konzentrationen ICAM-IVT titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die Konzentration des ICAM IVTs aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $6,1 \pm 1,1$  nM mit einer berechneten *guide* Konzentration von  $35,4 \pm 3,0$  nM.



Zunächst wurde die Affinität binärer Komplexe für das ICAM IVT untersucht. Dazu wurden binäre Komplexe aus hAgo2 und *guide* RNA präassembliert und über die Abnahme des Fluoreszenzsignals die Bindung der *guide* RNAs an hAgo2 kontrolliert. Diese binären Komplexe wurden mit dem ICAM IVT titriert. Die Titrationskurve wurde mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung mathematisch ausgewertet und ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 6,6 nM für die Affinität der binären Komplexe für die ICAM IVT *target* RNA. Damit ist die Affinität für diese lange *target* RNA um Faktor 35 niedriger als die für eine kurze

*target* RNA (siehe Abschnitt 4.2.1.3), welche die gleiche Komplementarität zur *guide* RNA aufweist. Interaktionen der langen *target* RNA mit hAgo2 können offenbar zu einer Schwächung der Bindung zwischen dem binären Komplex und der *target* RNA führen.

In einem weiteren Schritt wurde in einem analogen Versuchsaufbau die Affinität binärer MjAgo *guide* DNA Komplexe für die 40 nt lange *target* DNA untersucht, welche Komplementarität zum let7 *guide* Strang aufweist. Auch diese *target* DNA unterscheidet sich wie das ICAM IVT nur durch die Länge von der kurzen *target* DNA, nicht aber durch die Komplementarität zum *guide* Strang. Da die Analyse der Assoziationskinetiken mit diesem *guide-target* System ergeben hat, dass das 5'-Nukleotid eine entscheidende Rolle spielt (siehe Abschnitt 4.2.4.1), wurde auch für die Untersuchungen der Affinität das 5'-Nukleotid mit einbezogen.



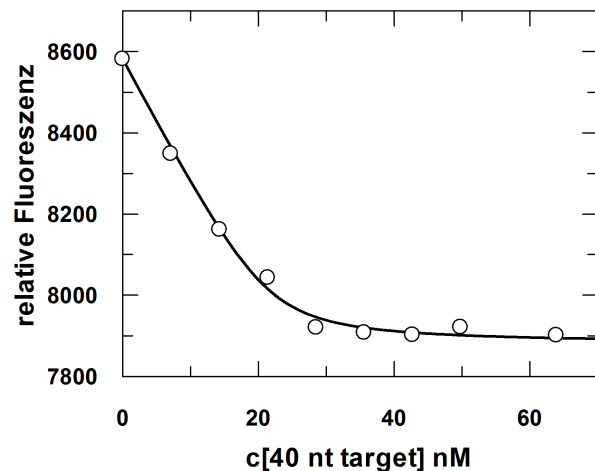
**Abbildung 4.54.: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von binären MjAgo-let7 *guide* DNA Komplexen für die 40 nt *target* DNA.** 20 nM *guide* DNA (D-T-let7<sup>FAM</sup> (A) bzw. D-G-let7<sup>FAM</sup> (B)) wurden mit 600 nM MjAgo präassembliert und mit steigenden Konzentrationen der 40 nt *target* DNA titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die Konzentration der *target* DNA aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $0,3 \pm 0,1$  nM (A) bzw.  $1,4 \pm 0,2$  nM (B) mit jeweils einer berechneten *guide* DNA Konzentration von  $19,7 \pm 0,7$  nM (A) bzw.  $13,4 \pm 1,0$  nM (B).

Es zeigte sich, dass sich die Affinität binärer Komplexe für die 40 nt *target* DNA abhängig vom 5'-Nukleotid unterscheidet. Wurde ein let7 *guide* Strang mit einem 5'-Thymin verwendet, ist die Affinität des binären Komplexes für die *target* DNA mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 0,3 nM wesentlich höher als mit einem 5'-Guanin (siehe Abbildung 4.54). Wurde ein *guide* Strang mit einem 5'-Guanin eingesetzt, beträgt die Gleichgewichtsdissoziationskonstante nur 1,4 nM. Wird an Stelle des langen ein kurzer *target* Strang verwendet, ist kein Unterschied mit *guide* Strängen mit verschiedenen 5'-Nukleotiden zu beobachten (siehe Abschnitt 4.2.3.4). Die verschiedenen Konformationen, die das MjAgo Protein einnimmt, um die *guide* DNAs mit den unterschiedlichen 5'-Nukleotiden zu binden, können erst detektiert werden, wenn ein längerer *target* Strang eingesetzt wird. Interaktionen des Ago Proteins mit den überhängenden Sequenzen des längeren *target* Strangs ermöglichen wie im Fall des ICAM IVT eine Modulation der Bindungsaffinität durch das Ago Protein. Eine Veränderung der Interaktionsfläche des MjAgo Proteins für den *target* DNA Überhang und somit eine Beeinflussung der

#### 4. Ergebnisse

Bindung des *target* Strangs durch die Assoziation des Ago Proteins mit verschiedenen *guide* 5'-Nukleotiden erklärt, dass unterschiedliche 5'-Nukleotide zu abweichenden Bindungsaffinitäten führen.

**Abbildung 4.55: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von let7 *guide* DNA für die 40 nt *target* DNA in Abwesenheit von MjAgo.** 20 nM *guide* DNA (D-let7<sup>FAM</sup>) wurden mit steigenden Konzentrationen der 40 nt *target* DNA titriert. Die Fluoreszenzänderung wurde jeweils gegen die Konzentration der *target* DNA aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet und ergaben einen  $K_D$  von  $0,9 \pm 0,3$  nM mit einer berechneten *guide* Konzentration von  $21,7 \pm 1,3$  nM.



Eine Untersuchung der Affinität der let7 *guide* DNA und der 40 nt langen *target* DNA in Abwesenheit von MjAgo ergibt eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 0,9 nM (siehe Abbildung 4.55). Sie liegt damit genau zwischen den Affinitäten des 5'-Thymin und 5'-Guanin *guide* Komplexes für die *target* DNA. Offenbar können die Wechselwirkungen der Überhänge eines langen *target* Strangs mit dem Ago Protein sowohl zu einer Verstärkung als auch zu einer Abschwächung der Affinität führen.

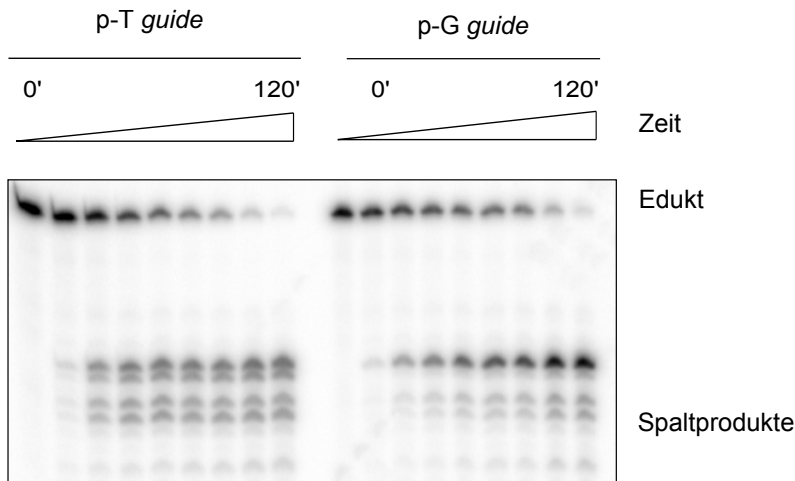
#### 4.2.4.3. Einfluss der *target* DNA Länge auf die Spaltaktivität der Ago Proteine

In weiteren Versuchen sollte überprüft werden, ob sich die *target* Stranglänge auch auf die Spaltaktivität des Ago Proteins auswirken kann. Untersuchungen an Hand der siRNA si2b und der langen *target* RNA ICAM IVT zeigten keine Unterschiede in der Spaltung von kurzen und langen *target* RNAs (siehe Abschnitt 4.2.1.4). Allerdings gehört die siRNA si2b zu den siRNAs, die nur ein Spaltprodukt zeigen. Hier wurde der Fokus auf lange *target* Stränge gerichtet, deren komplementäre *guide* Stränge mehrere Spaltprodukte mit kurzen *target* Strängen aufweisen. Außerdem sollte der Effekt der *target* Länge auf die Spaltung von *passenger* RNAs untersucht werden.

Zunächst wurde die MjAgo-vermittelte Spaltung einer 40 nt *target* DNA, welche komplementär zur let7 *guide* DNA ist, untersucht. In vorangehenden Spaltexperimenten mit kurzen *target* DNAs konnten mit der let7 *guide* DNA mehrere Spaltprodukte beobachtet werden. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der Identität des 5'-Nukleotids und der Genauigkeit der Positionierung der Spaltstelle festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.2.3.5).

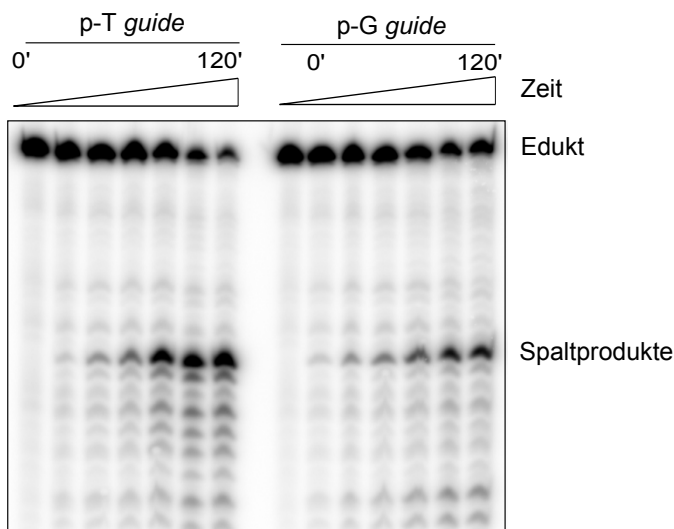
Die Spaltung des 40 nt *target* Stranges wurde anfangs unter *single turnover* Bedingungen analysiert. Dazu wurden MjAgo und let7 *guide* DNA präassembliert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der radioaktiv markierten 40 nt *target* DNA gestartet. Wie schon mit dem kurzen *target* Strang beobachtet, konnten auch mit der langen *target* DNA mehrere Spaltprodukte detektiert werden (siehe Abbildung 4.56). Dabei ist auffällig, dass bei dem *guide* Strang mit

#### 4.2. Guide Strang-abhängige Ago-vermittelte Bindung und Spaltung von target Strängen



**Abbildung 4.56: Gelbild der MjAgo-vermittelten Spaltung der 40 nt target DNA unter single turnover Bedingungen.** Es wurden 1  $\mu$ M MjAgo, 100 nM let7 guide DNA und 2,5 nM radioaktiv markierte 40 nt target DNA verwendet. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 120 min entnommen und über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

einem 5'-terminalen Thymin die Intensitäten aller vier Spaltprodukte vergleichbar sind, während mit dem 5'-Guanin eines der Spaltprodukte präferentiell gebildet wird. Die anderen drei Spaltprodukte sind wesentlich schwächer und eines ist kaum erkennbar. Mit einem 5'-Guanin ist offenbar eine höhere Genauigkeit für die Positionierung der Spaltstelle gewährleistet. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Spaltung kurzer target DNAs. Weiterhin bestätigt dies die Vermutung, dass die in der Bildung ternärer Komplexe mit dem let7 guide-target System neu hinzugekommene Phase eine ungenaue Positionierung der Spaltposition reflektiert. Mit dem guide Strang, der ein 5'-Guanin trägt, und einer langen target DNA fehlt diese Phase (siehe Tabelle 4.14). Im Gegenzug ist ein stark dominierendes Spaltprodukt mit dem 5'-Guanin zu erkennen, während mit dem guide Strang, der ein 5'-Thymin trägt, verschiedene Spaltprodukte ähnlicher Intensität auftreten. Mit dem 5'-Thymin am guide Strang ist die neu hinzugekommene Phase der ternären Komplexbildung im Gegensatz zum 5'-Guanin guide wie mit dem kurzen target Strang detektierbar (siehe Tabelle 4.14).



**Abbildung 4.57: Gelbild der MjAgo-vermittelten Spaltung der 40 nt target DNA unter multiple turnover Bedingungen.** Es wurden 1  $\mu$ M MjAgo, 20 nM let7 guide DNA und 100 nM radioaktiv markierte 40 nt target DNA verwendet. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 120 min entnommen und über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

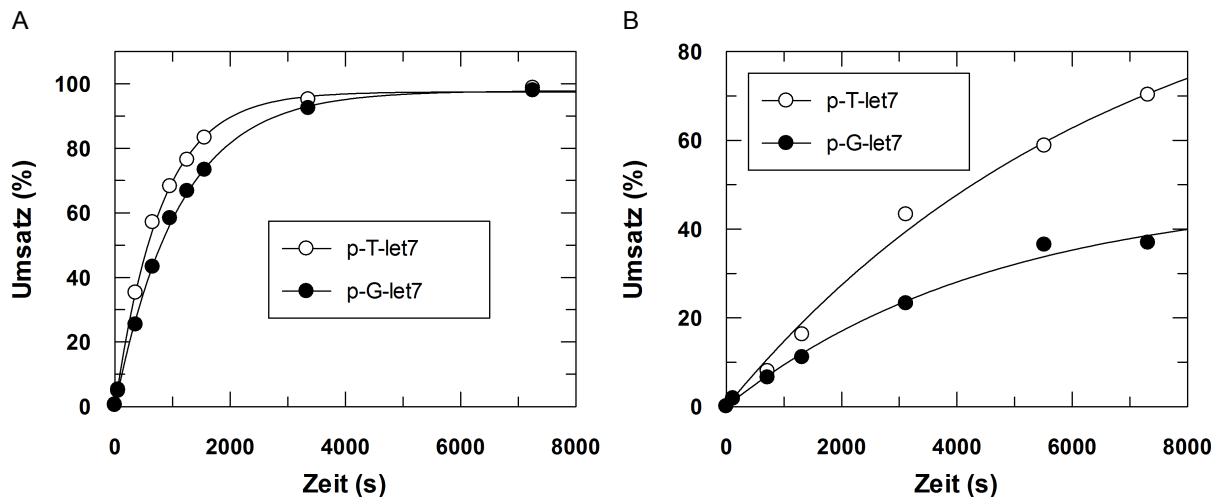
Unter multiple turnover Bedingungen bestätigte sich, dass das 5'-Nukleotid im Kontext des let7 guide Stranges einen entscheidenden Einfluss auf die Positionierung der Spaltstelle hat. Mit dem 5'-Guanin dominiert das Spaltprodukt, welches schon unter single turnover Bedingun-

#### 4. Ergebnisse

gen am deutlichsten erkennbar war. Die anderen Spaltprodukte sind dagegen deutlich schwächer.

Auch mit dem 5'-Thymin ist unter *multiple turnover* Bedingungen zu erkennen, dass nun das oberste Spaltprodukt präferentiell gebildet wird. Wie schon mit der kurzen *target* DNA beobachtet, steigt die Genauigkeit der Positionierung des *guide-target* Duplexes unter *multiple turnover* Bedingungen, was die Vermutung unterstützt, dass multiple Runden der *target* Bindung und Spaltung notwendig sind, um eine ideale Positionierung der *guide* DNA zu erreichen (siehe Abschnitt 4.2.3.5).

Die mathematische Auswertung der Spaltexperimente zeigt, dass wie im Fall des kurzen *target* Strangs die Spaltung mit dem *guide* Strang mit einem 5'-Thymin unter *single turnover* Bedingungen etwas schneller ist als mit dem 5'-Guanin. Auch hier ist eine höhere Genauigkeit auf Kosten der Geschwindigkeit mit einem 5'-Guanin zu beobachten. Die berechneten Amplituden sind dagegen nahezu identisch. Unter *multiple turnover* Bedingungen dagegen gleichen sich die Ratenkonstanten an.



**Abbildung 4.58.: Kinetische Analyse der Spaltaktivität mit let7 *guide* DNA und 40 nt *target* DNA unter *multiple turnover* und *single turnover* Bedingungen.** Im Standard Spalttest wurde entweder let7 *guide* DNA mit einem Thymin oder Guanin am 5'-Ende eingesetzt, um MjAgo für die Spaltung der let7 *target* DNA zu programmieren. Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen, über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Die ermittelten Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. (A) Unter *single turnover* Bedingungen (1  $\mu$ M MjAgo, 100 nM let7 *guide* DNA, 2,5 nM 40 nt *target* DNA) ergaben sich folgende Ratenkonstanten und Amplituden: 5'-T *guide* DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0013 (\pm 3 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $97,5 \pm 0,9 \%$  und 5'-G *guide* DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0009 (\pm 2 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $97,8 \pm 0,8 \%$ . (B) Unter *multiple turnover* Bedingungen (1  $\mu$ M MjAgo, 20 nM let7 *guide* DNA, 100 nM 40 nt *target* DNA) ergaben sich folgende Ratenkonstanten und Amplituden: 5'-T *guide* DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0001 (\pm 4 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $106,2 \pm 16,3 \%$  und 5'-G *guide* DNA:  $k_{\text{Spaltung}}$  von  $0,0002 (\pm 4 \times 10^{-5}) \text{ s}^{-1}$  bei einem maximalen Umsatz von  $48,6 \pm 5 \%$ .

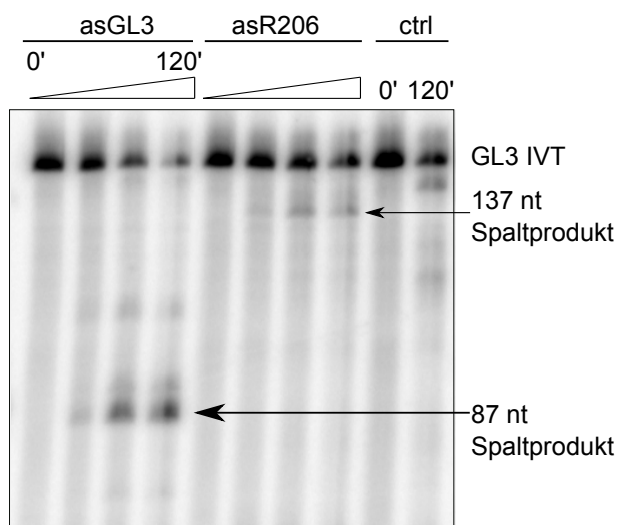
In einem weiteren Schritt wurden *guide* RNAs überprüft, die mit hAgo2 und kurzen *target* RNAs zu mehreren Spaltprodukten und ineffizienter Spaltung führten (siehe Abbildung 4.50). Der *guide* Strang asGL3 führte dabei zu drei Spaltprodukten, während die *guide* RNA asR206 keinerlei Spaltprodukt mit kurzen *target* RNAs, die in ihrer Länge dem *passenger* Strang entsprechen, produzierte. Die asGL3 wird also offenbar so flexibel positioniert, dass verschiedene



Positionen des *target* Strangs in die Reichweite des aktiven Zentrums gelangen. Der asR206 *guide* Strang dagegen verursacht eine Positionierung des *guide-target* Duplexes, die zu einer großen Distanz zwischen dem aktiven Zentrum von hAgo2 und dem spaltbaren Phosphat führt, so dass keinerlei Spaltung stattfindet.

Beide dieser *guide* RNAs besitzen Bindungsstellen im GL3 *in vitro* Transkript (GL3 IVT). Dieses besitzt eine Länge von 155 nt. Es zeigte sich, dass im Kontext der langen *target* RNA mit beiden *guide* Strängen genau ein Spaltprodukt erzielt wird. Offenbar kann eine lange *target* RNA auf Grund von Wechselwirkungen mit hAgo2 den *guide-target* Duplex so positionieren, dass der energetisch günstigste Zustand direkt erreicht wird. Es kommt somit nicht zu unterschiedlichen Spaltprodukten. Möglicherweise zeigen diese unterschiedlichen Mechanismen der Spaltung kurzer und langer *target* Stränge einen Mechanismus zur Regulation der *target* Strang Spaltung. Eventuell sind gewisse Konzentrationen an *target* Strang notwendig, um eine effiziente Bildung des Holo-RISC zu ermöglichen.

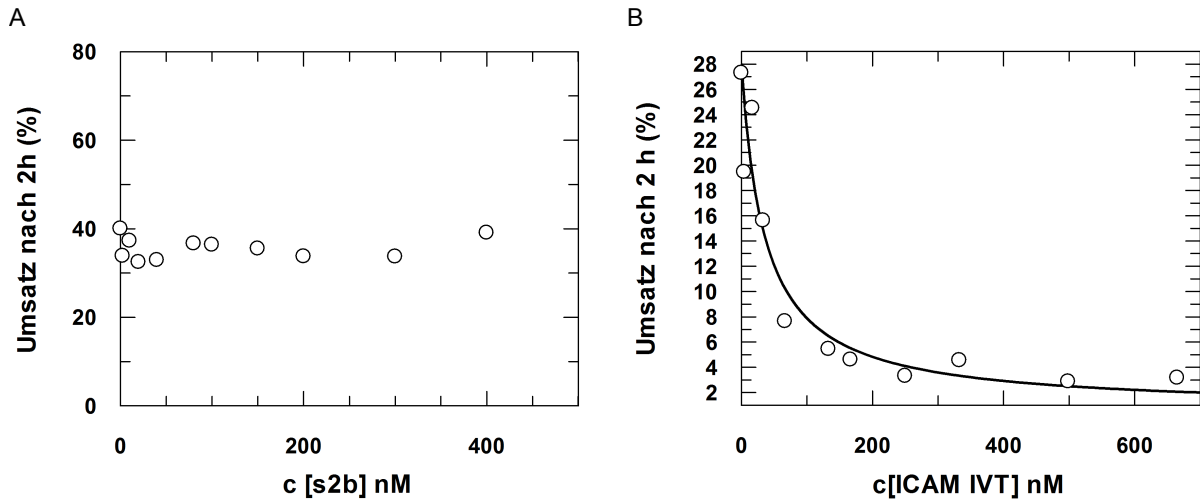
Um dies zu untersuchen, wurde die Spaltung der *passenger* RNA der si2b siRNA in Anwesenheit verschiedener Mengen *target* RNA untersucht. Diese *passenger* RNA wird im Normalfall sehr effizient gespalten (siehe Abbildung 4.15). Sollte es einen Effekt der langen *target* RNA auf die Spaltung der *passenger* RNA geben, ist er mit dieser siRNA deutlich zu erkennen. Die radioaktiv markierte *passenger* RNA wurde mit *guide* RNA prähybridisiert und mit auf-



**Abbildung 4.59: Gelbild der hAgo2-vermittelten Spaltung des GL3 IVT mit den *guide* RNAs asGL3 und asR206.** Es wurde der Standard Spalttest durchgeführt und zum Starten der Reaktion das radioaktiv markierte GL3 IVT eingesetzt. Die Probenentnahme erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 120 min. ctrl = Nukleasekontrolle ohne *guide* RNA. Die Proben wurden über 8 % denaturierende PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie detektiert.

steigenden Konzentrationen unmarkierter langer *target* RNA (ICAM IVT) im Standard Spalttest überprüft. Als Kontrolle diente ein vergleichbarer Test mit kurzer *target* RNA als Kompetitor. Wie in Abbildung 4.60 A zu erkennen ist, kann die kurze *target* RNA eine Spaltung der *passenger* RNA nicht verhindern. Die lange *target* RNA jedoch blockiert schon bei geringen Konzentrationen die Spaltung der *passenger* RNA (siehe Abbildung 4.60 B). Offenbar wird die Wechselwirkung zwischen *guide* und *passenger* RNA durch eine *target* RNA geschwächt, was eine Freisetzung der *passenger* RNA verursacht, ohne dass diese gespalten wird. Möglicherweise sind zusätzliche Kontakte der langen *target* RNA mit hAgo2 involviert, die eine kurze *target* RNA nicht ausbilden kann. Vermutlich ist es jedoch so, dass eine kurze *target* RNA als *guide* Strang an überschüssige hAgo2 Proteine gebunden wird und somit nicht für eine Konkurrenz zur Verfügung steht.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.60.: Konkurrenz der *passenger* RNA Spaltung durch lange und kurze *target* RNA.** Es wurden Standard Spalttests zur Untersuchung der *passenger* Spaltung durchgeführt. Der *passenger* Strang lag radioaktiv markiert vor, während die *target* Stränge unmarkiert waren. 30 nM der radioaktiv markierten siRNA wurden mit 3  $\mu$ M hAgo2 in Anwesenheit von aufsteigenden Konzentrationen von kurzer 21 nt (s2b) (A) oder langer 140 nt (ICAM-IVT) (B) *target* RNA durchgeführt. Nach 2 h erfolgte die Probenentnahme. Die Auftrennung erfolgte über 20 % denaturierende PAGE, gefolgt von Autoradiographie und Ermittlung der relativen Umsätze. Die relativen Umsätze wurden gegen die Konzentration aufgetragen und im Fall von langer *target* RNA mit Hilfe der Hill Gleichung ausgewertet. Es ergab sich eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 35,9 \pm 11,4$  nM.

#### 4.2.4.4. Der Einfluss der *target* RNA Länge auf das Oligomerisierungsverhalten von hAgo2

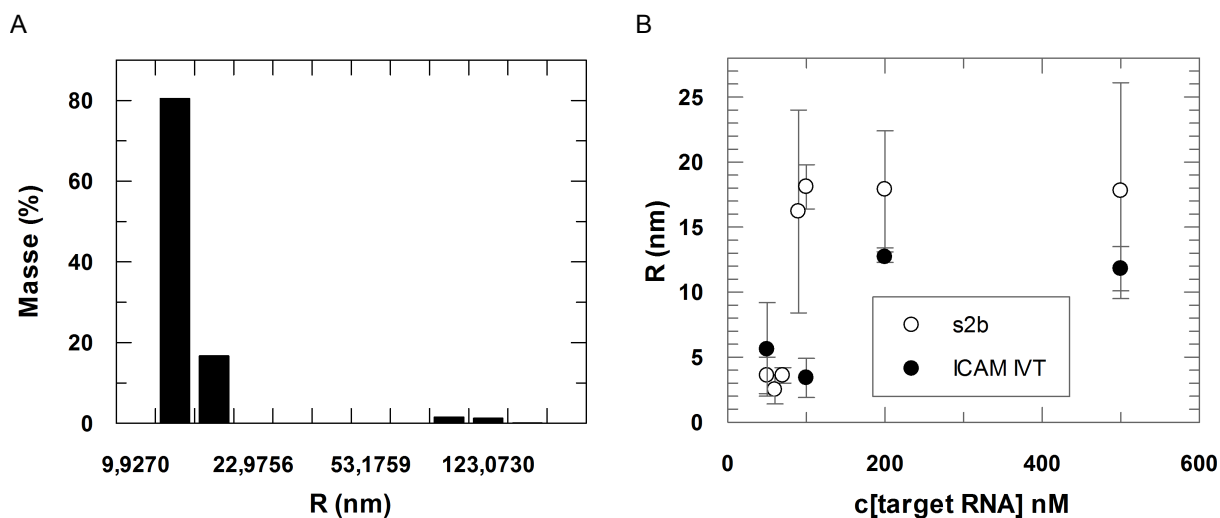
In den vorangehenden Analysen der Assemblierung ternärer Komplexe und Spaltung von *target* Strängen konnte gezeigt werden, dass ternäre Komplexe sich in Abhängigkeit der *target* Strang Länge unterscheiden. Mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung (DLS) (siehe Abschnitt 3.3.7) wurde analysiert, ob sich auch das Aggregationsverhalten der ternären Komplexe in Abhängigkeit von der Länge der *target* RNA ändert.

Dazu wurde zunächst das Aggregationsverhalten der verwendeten hAgo2-Präparation untersucht. 8  $\mu$ M hAgo2 wurden dafür in 1 x Ago Bindungspuffer verdünnt. Direkt vor der Messung wurde die Probe bei 20.000 x g und 4°C für 45 min abzentrifugiert, um größere Aggregate aus der Lösung zu entfernen.

Die Auswertung der Messung ergab zwei Populationen, von denen die erste Population mit einem Massenanteil von 97,1 % dominiert (siehe Abbildung 4.61 A). Aus vier verschiedenen Messungen wurde ein durchschnittlicher hydrodynamischer Radius von  $12,6 \pm 2,9$  nm mit einer Polydispersität von  $12,4 \pm 1,2$  % ermittelt. Anhand des bekannten Molekulargewichts von hAgo2 und der Tatsache, dass es sich um ein globuläres Protein handelt, konnte der theoretische hydrodynamische Radius berechnet werden. Er beträgt 4,4 nm. Kontrollmessungen mit BSA zeigten, dass es bei den Messungen zu kleinen Diskrepanzen des experimentell bestimmten Wertes im Vergleich zum berechneten Radius kommt. Der für BSA berechnete Radius beträgt 3,6 nm, während die experimentell bestimmten Radien sich in einem Bereich von 2,8 - 3,4 nm bewegen (Daten nicht gezeigt). Die für hAgo2 bestimmten Werte zeigen, dass das Protein in einem aggregierten Zustand vorliegt. An Hand des experimentell bestimmten Radius



und des berechneten Radius für monomeres hAgo2 steht zu vermuten, dass in der Lösung Trimere und Tetramere vorliegen.



**Abbildung 4.61.: Analyse des Aggregationsverhaltens von hAgo2 allein und in ternären Komplexen mit verschiedenen target RNAs.** (A) Repräsentatives Histogramm der DLS Messung von hAgo2 in Abwesenheit von Nukleinsäuren. Es ergaben sich zwei Populationen, von denen die erste 97,1 % des Gesamtanteils der in der Lösung enthaltenen Aggregate ausmacht. Sie hat einen hydrodynamischen Radius (R) von 13,9 nm und eine Polydispersität (Pd) von 11,5 %. Die zweite Population macht nur 2,9 % des Gesamtanteils aus. Für sie beträgt R = 107,8 nm bei einer Pd = 16,2 %. (B) Mittlere hydrodynamische Radien ternärer Komplexe in Gegenwart verschiedener Mengen an target RNA. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen vom Mittelwert.

Um den Einfluss der target RNA in Abhängigkeit ihrer Länge auf das Aggregationsverhalten ternärer Komplexe zu untersuchen, wurden ternäre Komplexe aus 1,5  $\mu$ M hAgo2, 50 nM guide RNA (as2b) und verschiedenen Mengen kurzer (s2b) oder langer (ICAM-IVT) target RNA in 1x Ago Bindungspuffer präassembliert und bei 20.000 x g und 4°C für 45 min abzentrifugiert. Es zeigte sich, dass mit beiden target RNAs eine Auflösung der Aggregate erreicht werden kann (siehe Abbildung 4.61 B). Alle Messwerte zeigten eine Polydispersität von 20 - 30 %, was zeigt, dass die Proben sehr homogen sind. Der experimentell bestimmte hydrodynamische Radius für ternäre Komplexe mit kurzen target RNAs, die in einer Konzentration von 50 - 70 nM vorliegen, bewegt sich in einem Bereich von 2,5 bis 3,6 nm. Für ternäre Komplexe mit langen target RNAs, die Konzentrationen von 50 - 100 nM aufweisen, wurden hydrodynamische Radien zwischen 3,4 und 5,6 nm ermittelt. Unabhängig von ihrer Länge scheinen target RNAs zur Vereinzelung der ternären Komplexe zu führen. Die experimentell bestimmten Radien zeigen im Vergleich mit dem für hAgo2 berechneten hydrodynamischen Radius, dass es sich vermutlich um monomere ternäre Komplexe handelt. Bereits Dr. A. Deerberg konnte im Rahmen ihrer Promotionsarbeit zeigen, dass katalytisch aktive Komplexe im Gegensatz zu freiem Protein vor Aggregation geschützt sind<sup>(218)</sup>.

Unterschiede zwischen ternären Komplexen mit kurzen und langen target RNAs offenbaren sich erst bei höheren target RNA Konzentrationen. Ternäre Komplexe mit kurzer target RNA beginnen bereits bei einer target RNA Konzentration von 90 nM zu aggregieren. Der hydrodynamische Radius der ternären Komplexe erhöht sich auf  $16,2 \pm 7,8$  nm. Auch bei höheren

#### 4. Ergebnisse

Konzentrationen der kurzen *target* RNA verändert sich dieser Radius kaum. Bis 500 nM *target* RNA Konzentration werden hydrodynamische Radien von 17,8 bis 18,1 nm bestimmt.

Im Gegensatz dazu bleiben die ternären Komplexe mit langer *target* RNA länger stabil. Bei 100 nM *target* RNA Konzentration wird ein hydrodynamischer Radius von  $3,4 \pm 1,5$  nm ermittelt, was dem Radius eines monomeren ternären Komplexes entspricht. Bei *target* RNA Konzentrationen von 200 und 500 nM wird dann erhöhte Aggregation detektiert, die zu hydrodynamischen Radien von  $12,7 \pm 0,4$  nm und  $11,8 \pm 1,7$  nm führt. Obwohl also auch ein Überschuss der langen *target* RNA zu Aggregation führt, so ist dies erst bei höheren Konzentrationen als mit der kurzen *target* RNA der Fall. Desweiteren sind die Aggregate, die sich in Anwesenheit der langen *target* RNA bilden, kleiner als mit kurzen *target* RNAs. Offenbar werden katalytisch aktive Komplexe durch lange *target* RNAs besser stabilisiert und so vor Aggregation geschützt. Vorhergehende Messungen zur Assemblierung ternärer Komplexe und Spaltung von *target* Strängen verschiedener Länge implizieren, dass die langen *target* Stränge zu einer optimaleren Positionierung des *guide-target* Duplexes führen. Auf Grundlage der bereits durchgeführten Experimente wurde postuliert, dass lange *target* RNAs neben der Basenpaarung mit dem *guide* Strang zusätzliche Wechselwirkungen mit dem binären Komplex, an den sie binden, eingehen können. Diese könnten zur Stabilisierung und so wegen reduzierter Aggregationsneigung verminderten hydrodynamischen Radien mit langen *target* RNAs führen. Möglicherweise lagert sich an die Nukleinsäure-Bindungsstellen, die durch eine lange *target* RNA belegt werden, im Fall des kurzen *target* Strangs überschüssige kurze *target* RNA an, die nicht an binäre Komplexe gebunden werden kann. Dies könnte dann zur Nukleinsäure-induzierten Aggregation der ternären Komplexe führen. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass die in Anwesenheit von überschüssiger kurzer *target* RNA gebildeten Aggregate wesentlich größer als die in Anwesenheit von langer *target* RNA gebildeten Aggregate sind.

### 4.3. Biochemische Charakterisierung der Regulation der katalytischen Aktivität von hAgo2 durch die L2 Linker Region und das aktive Zentrum

Das aktive Zentrum von hAgo2 besteht aus vier Aminosäuren, der sogenannten katalytischen Tetrade. Diese katalytische Tetrade ist in den spaltungsaktiven Ago Proteinen in Prokaryoten wie Eukaryoten hoch konserviert. Die Besonderheit dieser katalytischen Tetrade ist, dass sie nur im spaltungskompetenten Zustand komplett ist. Ein Glutamat der katalytischen Tetrade wird flexibel in das aktive Zentrum inseriert, wenn Spaltung stattfinden soll<sup>(146)</sup> (siehe Abschnitt 2.4.3).

Für eine endonukleolytische Spaltung von *target* RNAs ist neben einer kompletten katalytischen Tetrade auch eine korrekte Positionierung der Nukleinsäure im Protein notwendig. Wie schon in Abschnitt 4.2 beschrieben, sind Grundvoraussetzungen dafür die Bindung des *guide* RNA 5'-Endes an die Mid Domäne sowie die Assoziation des *guide* RNA 3'-Endes mit der PAZ Domäne. Die Untersuchungen in Abschnitt 4.2 konnten auch zeigen, dass eine präarrangierte *seed* Region eine weitere Bedingung für eine effiziente hAgo2-vermittelte Spaltung darstellt. Röntgenkristallstrukturen stellen dafür die Bedeutung des Isoleucin 365 in der Helix 7 der L2 Linker Region heraus<sup>(123,151)</sup>. *In silico* Studien im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. M. Kalia geben Hinweise, dass das Aspartat 358 dieser Helix mit dem Lysin 525 im NSL wechselwirken kann und so zu einer Stabilisierung des Proteins führt<sup>(220)</sup>. Zusammengefasst weisen diese Erkenntnisse stark darauf hin, dass die Helix 7 eine wichtige Aufgabe für die endonukleolytische *slicer* Aktivität von hAgo2 erfüllt.

In diesem Teil der vorliegenden Promotionsarbeit soll die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren der katalytischen Tetrade analysiert und die biologische Rolle der L2 Linker Region in der hAgo2-vermittelten RNA Spaltung näher beleuchtet werden.

#### 4.3.1. Biochemische Analyse der Bedeutung der Aminosäuren der katalytischen Tetrade für die hAgo2-vermittelte RNA Spaltung<sup>1</sup>

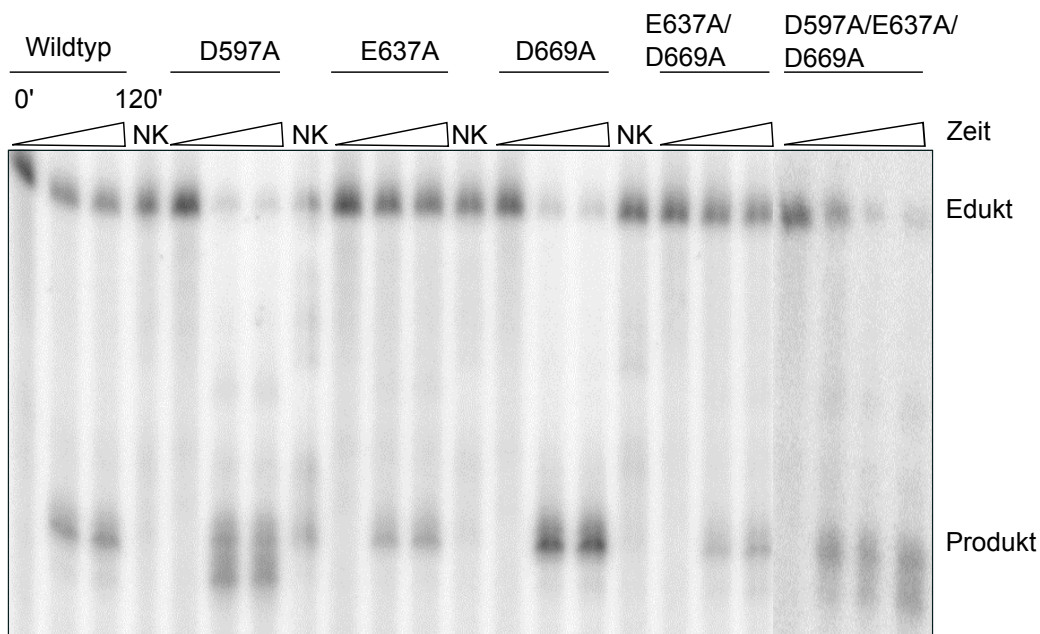
In mehreren Studien wurden Punktmutationen im aktiven Zentrum eingefügt. Es zeigte sich, dass schon der Austausch einer einzigen Aminosäure der katalytischen Tetrade zum Verlust der endonukleolytischen Spaltaktivität von hAgo2 führt<sup>(104,146,147,162,221)</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Mutationen im aktiven Zentrum von hAgo2 eingefügt und die Auswirkungen auf die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von *target* RNAs analysiert. Dabei wurden nicht nur einzelne Punktmutationen eingefügt, sondern auch Doppel- und Tripelmutanten hergestellt. Die hAgo2 Mutanten mit Mutationen im aktiven Zentrum sollten dazu dienen, zu überprüfen, ob im Rahmen der Assemblierung ternärer Komplexe eine vierte Transition, die im Rahmen des minimal mechanistischen Modells nicht beschrieben werden konnte, stattfindet. Die Experimente zum minimal mechanistischen Modell wurden unter Bedingungen durchgeführt, die eine Spaltung der *target* RNA nicht erlauben. Es ist zu vermuten, dass eine vierte

<sup>1</sup>Klonierung, Expression und Reinigung der hAgo2-Mutanten wurden in Zusammenarbeit mit S. Hanika und J. Ernesti durchgeführt.

#### 4. Ergebnisse

Transition im Zusammenhang mit der Spaltaktivität von hAgo2 steht. Mit Hilfe der Spaltmutanten sollte eine mögliche vierte Transition näher charakterisiert werden.

In Spaltexperimenten mit den hAgo2-Mutanten zeigte sich, dass Spaltung auch mit Mutationen im aktiven Zentrum detektiert werden kann (siehe Abbildung 4.62). Dabei ist die Effizienz der Spaltung im Vergleich zum Wildtyp hAgo2 nahezu identisch. In einigen Fällen ist die Effizienz der Spaltung sogar etwas höher als mit dem Wildtyp Protein. Da die Proteine aus technischen Gründen nicht alle gleichzeitig aufgereinigt werden konnten, handelt es sich um Präparationen verschiedenen Alters, was sich durch unterschiedlich fortgeschrittene Proteinaggregation bemerkbar macht. Wie im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg gezeigt werden konnte, zeigt rekombinant exprimiertes und gereinigtes hAgo2 eine Neigung zur Aggregation<sup>(218)</sup>. Trotz optimierten Lagerungsbedingungen ist eine fortschreitende Aggregationsneigung von hAgo2 mit der Zeit zu beobachten, was u. a. durch erniedrigte Spalteffizienz deutlich wird. Außerdem ist zu erkennen, dass beispielsweise hAgo2-D597A eine erhöhte Nukleaseaktivität aufweist, die zu einer Falscheinschätzung der Effizienz der Spaltung führen kann. Daher ist eine quantitative Aussage über das Verhalten von hAgo2 mit Mutationen im aktiven Zentrum mit Hilfe des Spaltexperiments technisch bedingt problematisch.



**Abbildung 4.62.: Spaltaktivität der hAgo2 Proteine mit Mutationen im aktiven Zentrum.** Untersuchung der Spaltaktivität unter *multiple turnover* Bedingungen. Es wurden 2,5  $\mu\text{M}$  des jeweiligen hAgo2 Proteins, 100 nM *guide* RNA (as2b) und 2,5 nM *target* RNA (ICAM IVT) eingesetzt und Proben nach verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 120 min entnommen. Diese Proben wurden mit Hilfe von denaturierender PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. NK = Nukleasekontrolle (Ansatz ohne *guide* RNA) der jeweils vorher benannten hAgo2 Variante.

Es muss insbesondere beachtet werden, dass die Spaltexperimente unter *multiple turnover* Bedingungen durchgeführt wurden. Trotz der im Standard Spaltexperiment gewählten Bedingungen ist es nicht möglich *single turnover* zu beobachten. Es wird davon ausgegangen, dass auf Grund von leichter Proteinaggregation nicht alle Ago Proteine enzymatisch aktiv sind. Diese sind allerdings trotzdem in der Lage, *guide* Stränge zu binden, und kompetieren so um Substra-

te. Dies erniedrigt die Konzentration an enzymtisch aktiven binären Komplexen und führt dazu, dass nur *multiple turnover* beobachtet werden kann (siehe Abbildung 4.16). Eine Erhöhung der Nukleinsäurekonzentration führt zu Nukleinsäure-induzierter Aggregation und ermöglicht somit ebenfalls keine Untersuchung unter *single turnover* Bedingungen.

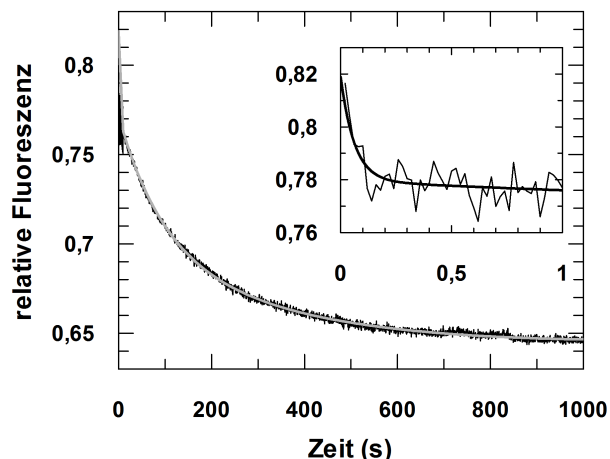
Da angenommen wird, dass die Spaltrate sich in der gleichen Größenordnung wie die Spaltrate der RNase H der retroviralen Reversen Transkriptase befindet, wäre die Spaltung mit  $10 \text{ s}^{-1}$  (106) sehr viel schneller als die gemessene Freisetzung der Spaltprodukte mit  $0,0003 \text{ s}^{-1}$  (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Um folglich einen Effekt auf die Spaltung beobachten zu können, müsste die Ratenkonstante der Spaltung durch die Mutation um vier Log-Stufen verlangsamt werden. Außerdem muss beachtet werden, dass das Paar der für die Katalyse essentiellen Magnesiumionen nicht allein über die katalytische Tetrade koordiniert wird, sondern u. a. auch über die *target* RNA<sup>(59)</sup>. Aus diesen Gründen war die gemessene Spaltaktivität der verschiedenen Mutanten nicht überraschend.

Da unter *multiple turnover* Bedingungen die Effekte der Punktmutationen im aktiven Zentrum nicht untersucht werden konnten, wurden Analysen der ternären Komplexbildung unter *pre-steady state* Bedingungen durchgeführt. In den vorhergehenden Experimenten zur Etablierung des minimalen mechanistischen Modells wurde die Konzentration von bivalenten Kationen möglichst niedrig gehalten, um eine Spaltung der *target* RNA zu verhindern. Um mit Hilfe der transientenkinetischen Untersuchungen Unterschiede in der Assoziation ternärer Komplexe zwischen dem Wildtyp hAgo2 und den Punktmutanten zu detektieren, wurden den Ansätzen jedoch in den hier gezeigten Experimenten bivalente Kationen zugesetzt, sodass die Spaltung von *target* RNAs möglich ist. Analysen von hAgo2 mit einem intakten aktiven Zentrum in Gegenwart von  $2 \text{ mM Mg}^{2+}$  zeigen, dass im Gegensatz zu Messungen in Abwesenheit von bivalenten Kationen eine vierte Phase detektierbar ist (siehe Tabelle 4.15 und Abbildung 4.63). Diese Phase konnte auch in Gegenwart von  $1,5 \text{ mM Mn}^{2+}$  beobachtet werden. Da in Vorexperimenten gezeigt werden konnte, dass die Amplitude der neuen vierten Phase mit  $\text{Mn}^{2+}$  höher ist als mit  $\text{Mg}^{2+}$  und mögliche Effekte so besser zu detektieren sind, wurde in den hier beschriebenen Experimenten  $\text{Mn}^{2+}$  an Stelle von  $\text{Mg}^{2+}$  eingesetzt.

Die Ratenkonstante der neu beobachteten vierten Phase beträgt mit Wildtyp hAgo2  $0,4 \text{ s}^{-1}$ . Damit ist sie wesentlich langsamer als die auf Grund von Messungen mit der RNase H erwarteten Ratenkonstante. Möglicherweise handelt es sich bei der neuen vierten Phase um eine konformationelle Änderung, die für die Spaltung der *target* RNA notwendig ist.

In einem weiteren Schritt wurde die Bildung ternärer Komplexe mit hAgo2-E637A und hAgo2-D669A in Anwesenheit von  $1,5 \text{ mM Mn}^{2+}$  überprüft. In beiden Fällen ist ebenfalls eine zusätzliche vierte Phase mit einer Ratenkonstante von  $0,007 \text{ s}^{-1}$  messbar. Die Mutation einer Aminosäure des aktiven Zentrums von hAgo2 führt offenbar zu einer Reduktion der Ratenkonstante um Faktor 60. Außerdem wurde eine dritte Mutante des hAgo2 Proteins analysiert, in der beide Mutationen gleichzeitig vorlagen (hAgo2-E637A-D669A). Mit zwei Mutationen ist eine zusätzliche Verlangsamung der Ratenkonstante der vierten Phase detektierbar. Im Vergleich zum Wildtyp ist eine Reduktion um Faktor 130 erkennbar. Wird zusätzlich zur Mutation von zwei Aminosäuren des aktiven Zentrums eine dritte Aminosäure verändert, ist die vierte Phase nicht mehr detektierbar. Die Abnahme der Geschwindigkeit der vierten Phase in Abhängigkeit von

**Abbildung 4.63: Pre-steady state Assoziationskinetik ternärer Komplexe mit hAgo2 und 1,5 mM Mn<sup>2+</sup>.** Binäre Komplexe aus 500 nM hAgo2 und *guide* RNA (as2b; 20 nM) wurden in 1x Ago-Bindungspuffer mit 1,5 mM Mn<sup>2+</sup> präassembliert und dann schnell mit *target* RNA (s2b<sup>FAM</sup>; 20 nM) gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer vierfach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 16,1 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,01 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_3 = 0,002 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$  und  $k_4 = 0,42 \pm 0,07 \text{ s}^{-1}$ .



der Anzahl der Mutationen im aktiven Zentrum und der vollständige Verlust der vierten Phase mit drei Mutationen im aktiven Zentrum unterstützt die Hypothese, dass diese vierte Phase konformationelle Änderungen im Rahmen der Spaltung von *target* RNAs repräsentiert. Dass also in den Spaltexperimenten keine Unterschiede zwischen verschiedenen hAgo2-Mutanten erkannt werden konnten, ist vermutlich auf die *multiple turnover* Bedingungen im Spalttest zurückzuführen. Die transientenkinetischen Untersuchungen zeigen dagegen eindeutig den Einfluss verschiedener Mutationen im aktiven Zentrum des hAgo2 Proteins auf die katalytische Aktivität. Schon eine einzige Mutation im aktiven Zentrum reicht aus, die Geschwindigkeit der neuen vierten Ratenkonstante, welche vermutlich einen mit der Spaltung assoziierten Prozess beschreibt, drastisch zu reduzieren. Dabei ist es unerheblich, ob das D669 oder das E637 mutiert wird. Mit steigender Zahl der Mutationen verlangsamt sich die Ratenkonstante, bis sie mit drei Mutationen nicht mehr detektierbar ist. Mit hAgo2-D597A-E637A-D669A ist die vierte Phase vermutlich in der gleichen Größenordnung wie die Ratenkonstante der Freisetzung der Spaltprodukte (siehe Abbildung 4.9), sodass eine Unterteilung in vier Phasen nicht mehr möglich ist. Dies erklärt, warum auch mit drei Mutationen im aktiven Zentrum weiterhin Spaltung von *target* RNAs detektierbar ist.

**Tabelle 4.15.: Auswirkungen der Mutation einzelner Aminosäuren im aktiven Zentrum von hAgo2 auf die Assoziation ternärer Komplexe.** Die Ratenkonstanten wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, in Anwesenheit von 1,5 mM Mn<sup>2+</sup> bestimmt. # = siehe Abbildung 4.7.

	$k_{1\_obs}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )	$k_4$ (s <sup>-1</sup> )
hAgo2 ohne Mn <sup>2+</sup> #	32,3	0,01	0,003	—
hAgo2	21,5	0,01	0,003	0,4
hAgo2-E637A	22,7	0,017	0,005	0,007
hAgo2-D669A	18,9	0,012	0,002	0,007
hAgo2-E637A-D669A	25,2	0,013	0,004	0,003
hAgo2-D597A-E637A-D669A	13,4	0,015	0,002	—

Weiterhin zeigen die Experimente, dass die Mutationen im aktiven Zentrum nur die Spaltaktivität von hAgo2 beeinflussen und nicht dessen Fähigkeit an *guide* und *target* RNAs zu binden. Ein Vergleich der Ratenkonstanten, welche erstens die Assemblierung von *guide* und

*target* RNA im Bereich der *seed* Region ( $k_2$ ) und zweitens die erweiterte Basenpaarung mit der *target* RNA im 3'-Bereich der *guide* RNA ( $k_3$ ) repräsentieren, zeigt keine Unterschiede zwischen den Proteinen mit den Mutationen im aktiven Zentrum und dem Wildtyp hAgo2 (siehe Tabelle 4.15). Untersuchungen der ternären Komplexbildung unter Bedingungen, die eine Spaltung der *target* RNA ermöglichen, zeigen jedoch eindeutig, dass zusätzlich zu diesen Phasen der Bindung binärer Komplexe an eine *target* RNA eine vierte Transition stattfindet. Analysen mit Hilfe der hAgo2 Mutanten mit Mutationen im aktiven Zentrum weisen weiterhin darauf hin, dass diese vierte Transition einen Schritt der ternären Komplexbildung repräsentiert, der für die Spaltaktivität von hAgo2 unerlässlich ist.

### 4.3.2. Biochemische Analyse der Bedeutung der L2 Linker Region für die katalytische Aktivität von hAgo2

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Rolle der L2 Linker Region in der hAgo2-vermittelten Spaltung von RNA. Die L2 Linker Region verbindet die PAZ Domäne mit der Mid Domäne. Ein wichtiges Strukturelement dieser Linker Region ist die Helix 7, die sich hinter der Nukleinsäure-Bindungsfurche befindet. Diese Helix enthält zum Beispiel das Isoleucin 365 (I365), welches zwischen den Nukleotiden 6 und 7 der *guide* RNA interkaliert und so die  $\pi - \pi$ -Interaktionen zwischen den präarrangierten Basen der *seed* Region unterbricht<sup>(123,151)</sup>.

Eine weitere Aminosäure in dieser Helix, die für die Funktion von hAgo2 von Bedeutung ist, ist das Aspartat 358 (D358). Im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. M. Kalia wurden *in silico* Studien durchgeführt, die darauf hinweisen, dass diese Aminosäure zu einer Stabilisierung zwischen der L2 Linker Region und der Mid Domäne führt (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Es konnte eine Salzbrücke zwischen D358 und der Aminosäure Lysin 525 (K525), die integraler Bestandteil des NSL ist, gefunden werden<sup>(220)</sup>.

Nicht nur der binäre Komplex wird jedoch durch die Helix 7 stabilisiert. Bindet eine *target* RNA an den binären Komplex, bewegt sich diese Helix um 4 Å, sodass sie einerseits in der Lage ist, Platz für den *target* Strang zu schaffen und andererseits mit der kleinen Furche des *guide-target* Duplexes zu interagieren und diesen auf diese Weise in Position zu halten<sup>(142)</sup>.

Ziel der hier vorgestellten Experimente ist es, die biologische Bedeutung der L2 Linker Region zu beleuchten. Dazu wurden die vorgestellten Aminosäuren mutiert und die Fähigkeit der mutierten Proteine an RNAs zu binden und diese zu spalten im Vergleich zum Wildtyp hAgo2 untersucht.

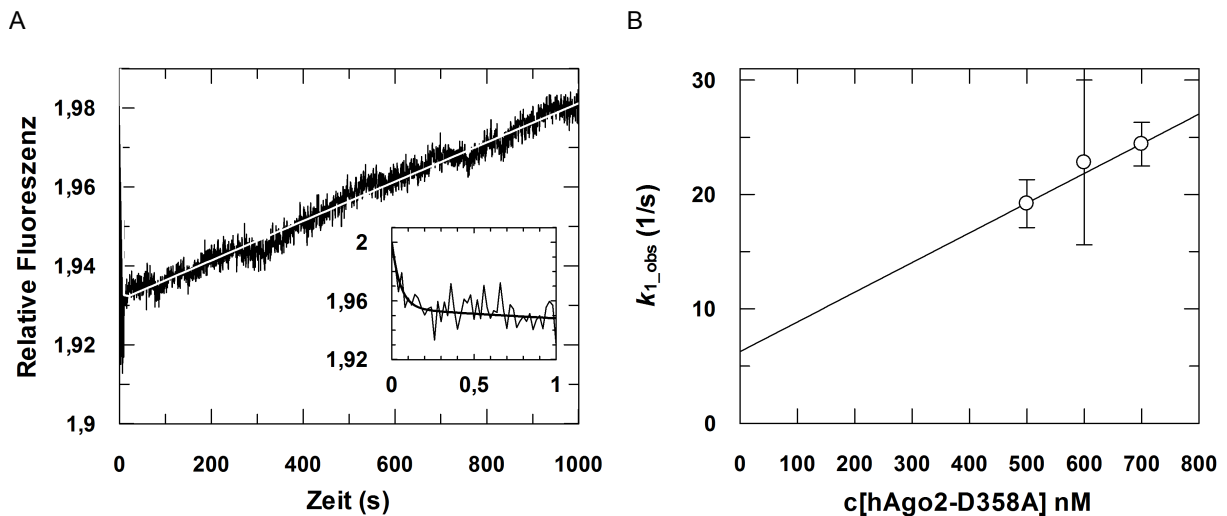
#### 4.3.2.1. Analysen zur Bedeutung der Salzbrücke zwischen der L2 Linker Domäne und dem NSL

Im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. M. Kalia wurden MD Simulationen des hAgo2-*guide* RNA Komplexes über 100 ns durchgeführt, die eine Salzbrücke zwischen D358 und der Aminosäure K525 des NSL offenlegten. Der für die Simulationen verwendete *guide* Strang ist dabei eine verkürzte Version mit 11 Nukleotiden Länge. Die Salzbrücke blieb über einen Großteil des Simulationszeitraums stabil. In den Kristallstrukturen des hAgo2 Proteins konnte diese Wechselwirkung nicht beobachtet werden, da offenbar die Elektronendichte des K525 nicht ausrei-

#### 4. Ergebnisse

chend ist. Ein Austausch des Aspartats durch ein Alanin führt in den *in silico* Studien nicht dazu, dass sich die allgemeine Faltung von hAgo2 ändert. Allerdings sind Veränderungen in der Positionierung der Domänen zu beobachten. Die größte Veränderung ist dabei in der PAZ Domäne zu erkennen, die sich um 6 Å von ihrer initialen Position entfernt und dabei relativ frei rotieren kann. Auch der NSL zeigt auf Grund der fehlenden Stabilisierung des K525 eine erhöhte Flexibilität<sup>(220)</sup>.

#### Kinetische Analyse der hAgo2-vermittelten Bindung von RNA nach Mutation der Aminosäure D358<sup>2</sup>



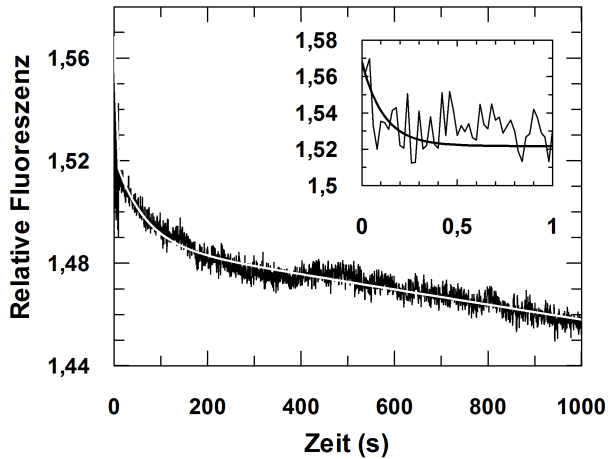
**Abbildung 4.64.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe aus hAgo2-D358A und *guide* RNA.** (A) Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 500 nM hAgo2-D358A wurden schnell mit 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 19,2 \pm 2,1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,34 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,0003 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$  (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit von  $k_{1\_obs}$  von der Proteinkonzentration ergibt die Ratenkonstanten  $k_1 = 0,26 (\pm 0,02) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 6,3 \pm 1,2 \text{ s}^{-1}$ .

Die Auswirkungen der Mutation des Aspartat 358 zu einem Alanin wurden zunächst im Rahmen der binären Komplexbildung untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen hAgo2-D358A mit FAM-markierter *guide* RNA gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.64). Es ergab sich eine erste schnelle Phase, die abhängig von der Konzentration ist. Die lineare Auswertung dieser Abhängigkeit ergab die Ratenkonstanten  $k_1 = 0,26 (\pm 0,02) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 6,3 \pm 1,2 \text{ s}^{-1}$ . Diese erste Phase ist nur durch die Diffusion limitiert und repräsentiert vermutlich die Bildung von unspezifischen Kollisionskomplexen zwischen hAgo2-D358A und der *guide* RNA. Die nachfolgenden Phasen sind langsamer und zeigen keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die dritte Phase ist dabei außerordentlich langsam und zeigt vermutlich die unspezifische Assoziation der *guide* RNA mit der basischen Proteinoberfläche. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass die Bildung ternärer Komplexe nicht gemessen werden kann (siehe unten).

<sup>2</sup>Klonierung wurde in Zusammenarbeit mit S. Hanika durchgeführt.



Ein Vergleich der zweiten Ratenkonstante mit jener der korrespondierenden mit Wildtyp hAgo2 gemessenen Phase zeigt, dass die Ratenkonstanten nahezu identisch sind (siehe Tabelle 4.16). Offenbar wird das *guide* Strang 5'-Ende auch im mutierten hAgo2 richtig inkorporiert. Erst die nachfolgende Positionierung in der Nukleinsäure-Bindungsfurche und die Assoziation mit der PAZ Domäne sind gestört.



**Abbildung 4.65: Pre-steady state Dissoziationskinetik der Dissoziation binärer Komplexe mit hAgo2-D358A.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. Binäre Komplexe aus 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) und 500 nM hAgo2-D358A wurden präassembliert und dann schnell mit 2 µM unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet, sodass sich folgende Ratenkonstanten ergaben:  $k_1 = 8,8 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,02 \pm 0,0007 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,0003 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ .

Untersuchungen der Dissoziation binärer Komplexe ergeben ebenfalls einen dreiphasigen Verlauf der Reaktion. Binäre Komplexe aus hAgo2-D358A und FAM-markierter *guide* RNA wurden präassembliert und schnell mit einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die mathematische Auswertung ergab drei Phasen, von denen wie im Fall der Assoziation die dritte Phase außerordentlich langsam ist. Sie repräsentiert, wie schon zuvor vermutet, wahr-

**Tabelle 4.16.: Zusammenfassung der pre-steady state Ratenkonstanten binärer Komplexe mit hAgo2-D358A und *guide* RNA.** \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

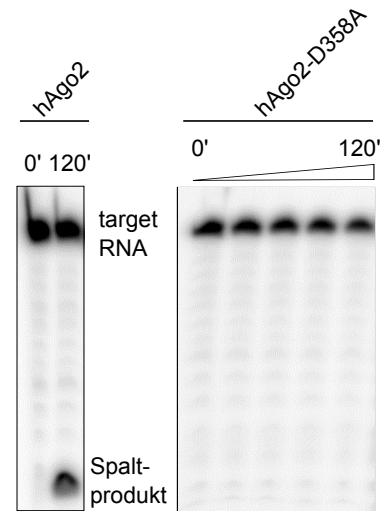
	$k_1 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$k_{-1} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
hAgo2-D358A	$0,3 \times 10^8$	8,8	0,4	0,016	—	—
hAgo2*	$0,6 \times 10^8$	6,2	0,26	0,17	0,012	0,007

scheinlich die Dissoziation der *guide* RNA von der hAgo2-D358A Proteinoberfläche. Der *guide* Strang wird vermutlich nicht in der richtigen Position gebunden. Auch die zweite Phase ist relativ langsam (siehe Tabelle 4.16). Dieses Phänomen konnte bereits mit anderen hAgo2 Mutanten beobachtet werden, deren Bindung an die PAZ Domäne gestört ist (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Um eine zügige Dissoziation der *guide* RNA zu ermöglichen, ist ein konsekutiver Ablauf der Transitionen der *guide* Strang Freisetzung notwendig, was im Fall der fehlenden PAZ Assoziation nicht möglich ist.

Eine Assoziation ternärer Komplexe konnte mit hAgo2-D358A nicht beobachtet werden. Da der *guide* Strang nicht korrekt positioniert und zu großen Teilen vermutlich nur locker mit der Oberfläche des Proteins assoziiert ist, ist nach dem Mischen präassemblierter binärer Komplexe aus FAM-markierter *guide* RNA und hAgo2-D358A mit *target* RNA eine Assoziation der beiden Nukleinsäuren zu beobachten, die aber nicht an das Protein gebunden stattfindet. Daher kann in Verdrängungsexperimenten keine Dissoziation gemessen werden (Daten nicht ge-

#### 4. Ergebnisse

**Abbildung 4.66: Spalttest mit hAgo2-D358A.** Der Standard Spalttest wurde mit hAgo2 und hAgo2-D358A durchgeführt. 2,5  $\mu$ M Protein wurden mit 100 nM *guide* RNA (as2b) präinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,5 nM radioaktiv markierter *target* RNA ( $^{32}$ P-s2b) gestartet, Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte über Autoradiographie.



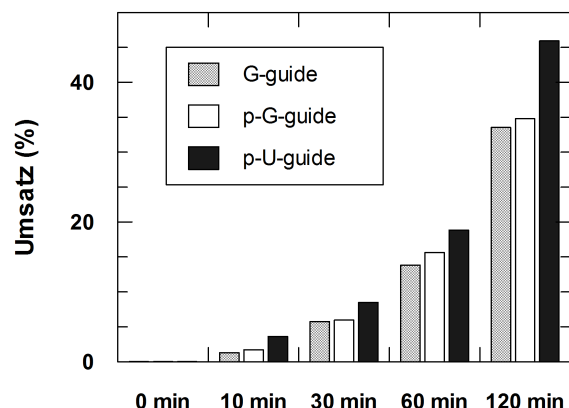
zeigt). Diese Annahme wird durch die Ergebnisse des Standard Spalttests mit hAgo2-D358A gestützt. Das mutierte Protein ist nicht in der Lage, die Spaltung von *target* RNAs zu katalysieren (siehe Abbildung 4.66), was auf die fehlende Bildung von funktionellen ternären Komplexen zurückzuführen ist.

#### Analyse der Bedeutung der Aminosäure K525 für die Funktion von hAgo2<sup>3</sup>

Um zu untersuchen, ob die mit hAgo2-D358A beobachteten Effekte nur auf das Fehlen der Salzbrücke zurückzuführen sind, oder ob das Aspartat 358 in der Helix 7 noch weitere Aufgaben erfüllt, wurde das Lysin 525 im NSL als Bindungspartner des Aspartats mutiert.

MD Simulationen im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. M. Kalia offenbarten eine perfekte Ausrichtung des aromatischen Rings des 5'-terminalen Guanins und der K525 Seitenkette, die zu Kationen- $\pi$ -Interaktionen führt, welche die Wechselwirkungen mit einem 5'-Guanin stabilisieren<sup>(220)</sup>. Deshalb soll die hAgo2-K525A Mutante auch dazu genutzt werden, den Mechanismus der Diskriminierung zwischen verschiedenen 5'-Nukleotiden besser zu verstehen.

**Abbildung 4.67: Spalttest mit hAgo2-K525A.** 2,5  $\mu$ M hAgo2-K525A wurden mit 100 nM *guide* RNA (as2b, G-as2b, OH-G-as2b) präinkubiert. Um die Reaktion zu starten, wurden 2,5 nM *target* RNA ( $^{32}$ P-s2b) hinzugegeben. Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten genommen, über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Autoradiographie visualisiert. Die Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen.



Zunächst wurde der Standard Spalttest mit Hilfe von hAgo2-K525A durchgeführt. Sollten die mit hAgo2-D358A beobachteten Effekte nur auf die fehlende Salzbrücke zwischen D358

<sup>3</sup>Klonierung, Expression und Reinigung wurden in Zusammenarbeit mit J. Ernesti durchgeführt.

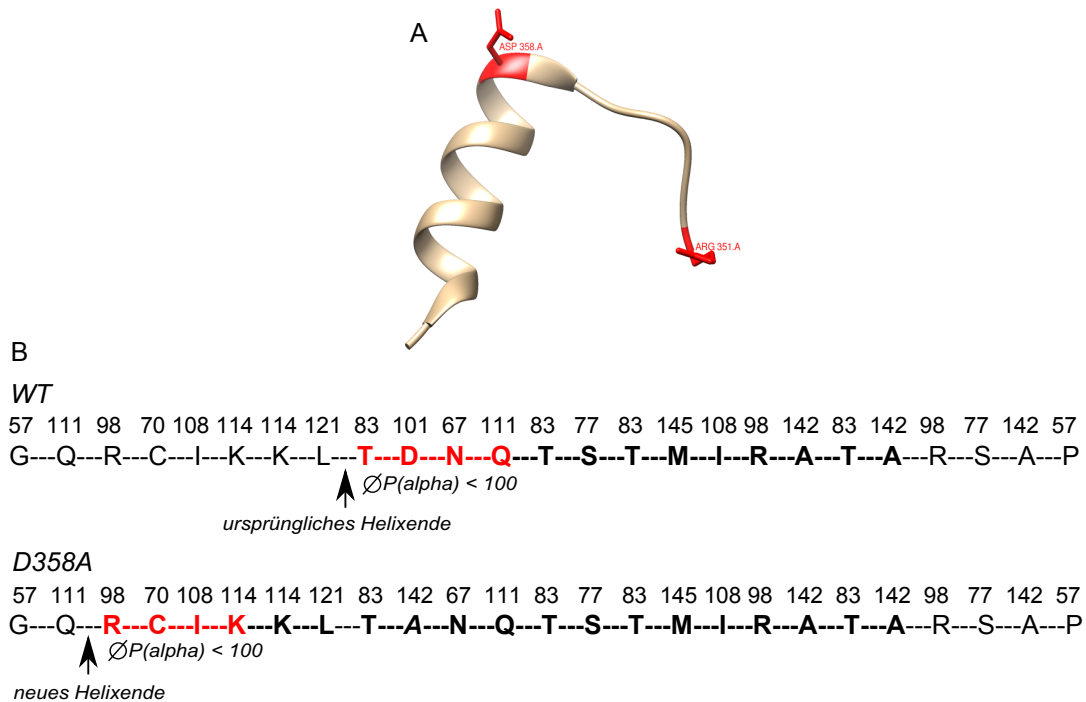
und K525 zurückzuführen sein, wäre zu erwarten, dass sich hAgo2-K525A vergleichbar erhält. Dies ist allerdings nicht der Fall. Im Standard-Spalttest ist mit hAgo2-K525A im Gegensatz zu hAgo2-D358A Spaltung von *target* RNAs detektierbar, die allerdings etwas ineffizienter als mit dem Wildtyp hAgo2 ist (siehe Abbildung 4.67).

Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Salzbrücke zwischen K525 und D358 nicht entscheidend für die von hAgo2-D358A bewirkten Resultate sind. Offenbar spielt das Aspartat noch eine weitere wichtige Rolle im hAgo2 Protein. D358 befindet sich am oberen Ende der Helix 7. Möglicherweise kann der Austausch gegen ein Alanin die Sekundärstruktur verändern. Um herauszufinden, welche Funktion das Aspartat in der Helix 7 hat, wurde mit Hilfe des Chou-Fasman-Algorithmus eine Sekundärstrukturvoraussage durchgeführt, die darauf beruht, auf Grund statistischer Auswertungen jeder Aminosäure ein Helixpotential zuzuordnen. Das Helixpotential reflektiert dabei die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Aminosäure zur Bildung einer Helix beiträgt. Aspartat hat ein relativ geringes Helixpotential, während Alanin zu einem der stärksten Helixbildner unter den Aminosäuren gezählt wird<sup>(222)</sup>. Wird das Aspartat gegen ein Alanin ausgetauscht, könnte es zu einer Verlängerung der Helix kommen (siehe Abbildung 4.68). Die Verlängerung würde in etwa 6 -7 Aminosäuren umfassen und würde die Helix so um etwa 2 Windungen verlängern.

Die Gruppe um McRae publizierte kürzlich Röntgenkristallstrukturen ternärer Komplexe von hAgo2, die zeigen, dass die Helix 7 und die PAZ Domäne sich zusammen in einer festen Einheit bewegen<sup>(142)</sup>. Möglicherweise führt eine Verlängerung der Helix zu einer Delokalisierung der PAZ Domäne, die zu einer Blockade der Bindung des *guide* Stranges an die PAZ Domäne führt. Eine fehlende PAZ Bindung ist jedoch nicht der einzige Grund für die hier beobachteten Effekte. Eine Mutation der PAZ Domäne verhindert die PAZ Assoziation sowie die Spaltung von *target* RNAs. Jedoch sind mindestens zwei Phasen der Assoziation ternärer Komplexe mit korrespondierenden Rückreaktionen zu beobachten, was hier nicht der Fall ist (siehe Abschnitt 4.2.1.2 und 4.3.2.1). Entweder die PAZ Domäne oder die Helix7 scheint sich derart zu bewegen, dass der Nukleinsäure-Bindungskanal blockiert wird, sodass tatsächlich nur das 5'-Ende gebunden wird und der Rest des *guide* Stranges unspezifisch mit der Proteinoberfläche assoziiert.

Neben der Information, dass die Salzbrücke zwischen der L2 Linker Region und der Mid Domäne nicht der einzige Grund für die mit hAgo2-D358A beobachteten Effekte ist, liefert hAgo2-K525A Aufschluss über den Mechanismus der Bindung verschiedener *guide* RNA 5'-Nukleotide. In Abschnitt 4.2.3.5 konnte gezeigt werden, dass mit dem si2b *guide-target* Konstrukt und dem Wildtyp hAgo2 kein Unterschied in der Bindung und Spaltung von *target* RNAs zu erkennen ist, unabhängig davon welche der beiden RNAs als *guide* Strang inkorporiert wird. Auch die unterschiedlichen 5'-Nukleotide führten zu keinerlei Veränderung in der Bildung ternärer Komplexe sowie der Effizienz und Genauigkeit der nachfolgenden *target* RNA Spaltung. Die mutierte Version des hAgo2 Proteins, hAgo2-K525A, zeigt jedoch klare Unterschiede in der Effizienz der *target* RNA Spaltung abhängig vom 5'-Nukleotid der *guide* RNA. Im Spalttest wurde ein *guide* Strang mit drei verschiedenen 5'-Enden verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die *target* RNA am effizientesten von den binären Komplexen umgesetzt werden kann, an deren 5'-Ende sich ein Uracil und ein Phosphat befinden. Die phosphorylierte wie auch die unphosphorylierte Version des *guide* Stranges mit einem Guanin am 5'-Ende führte zu einem

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.68.: Sekundärstruktur-Vorhersage für die Helix7.** (A) Darstellung der Helix 7. Rot markiert sind D358 und R351, die potentielle Endpunkte für die Helix darstellen. (B) Darstellung der Sequenzabschnitte im Bereich der Helix7 von hAgo2 (WT) und hAgo2-D358A (D358A). Mit Hilfe des Chou Fasman Algorithmus wurden die Wildtyp Sequenz und die Sequenz von hAgo2-D358A im Bereich der Helix 7 ausgewertet. Dieser beruht darauf, dass für die Helix ein Nukleationskern benötigt wird, in dem 4 von 6 Aminosäuren ein Helixpotential ( $P(\alpha)$ ) von über 100 aufweisen. Eine Verlängerung der Helix erfolgt bidirektional, bis eine Region mit vier Aminosäuren hintereinander identifiziert wird, deren mittleres Helixpotential geringer als 100 ist<sup>(222)</sup>. Rot markiert sind die Abschnitte, die potentielle Endpunkte für die Helix darstellen. In der Wildtyp hAgo2 Sequenz befindet sich die Aminosäure D358 in diesem rot markierten Abschnitt. Wird diese Aminosäure gegen ein Alanin ausgetauscht, verschiebt sich der potentielle Helix-Endpunkt, sodass das A358 nicht in der rot markierten Sequenz zu finden ist.

schlechteren Umsatz der *target* RNA. Vermutlich hat also der NSL nicht nur eine diskriminierende Wirkung auf die verschiedenen 5'-Nukleotide (siehe Abschnitt 2.3.4). Offenbar hat das K525 des NSL eine stabilisierende Wirkung auf ein 5'-Guanin, sodass *guide* Stränge sowohl mit einem Uracil als auch mit einem Guanin am 5'-Ende zu ähnlich effizienter *target* RNA Spaltung führen.

#### 4.3.2.2. Analysen zur Bedeutung der Aminosäure I365 für die korrekte Positionierung der *guide* RNA in hAgo2<sup>4</sup>

Auch die Bedeutung der Aminosäure I365 wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. M. Kalia mit Hilfe von MD Simulationen untersucht. Dazu wurde das Isoleucin gegen ein Alanin ausgetauscht. Die MD Simulationen mit dem veränderten hAgo2 zeigen, dass die Flexibilität der *guide* RNA stark erhöht wird. Dabei wird auch die Flexibilität des 5'-Endes beeinflusst. Die Unterbrechung der  $\pi - \pi$ -Interaktionen zwischen Nukleotid 6 und 7 der *guide* RNA geht verloren und die  $\pi - \pi$ -Interaktionen breiten sich über das Nukleotid 6 hinaus aus<sup>(220)</sup>.

<sup>4</sup>Klonierung, Expression, Reinigung und Spalttests in Zusammenarbeit mit J. Ernesti durchgeführt.

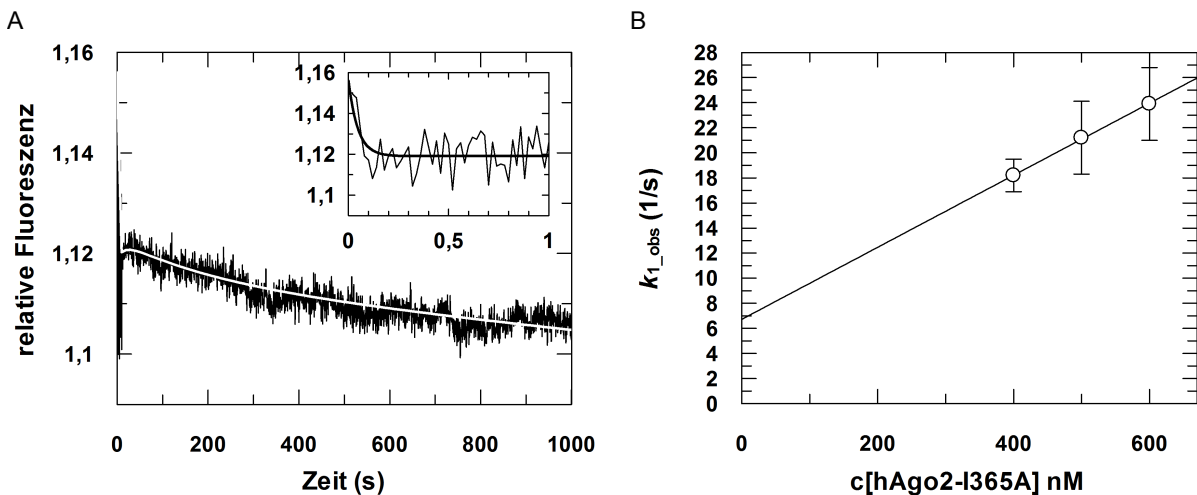
In der vorliegenden Arbeit wurde die Aminosäure I365 in hAgo2 zu einem Alanin mutiert. Das mutierte Protein wird nachfolgend hAgo2-I365A genannt.

### Kinetische Analyse der Bildung binärer Komplexe nach Mutation der Aminosäure I365

Die Bindung von hAgo2-I365A an verschiedene siRNA Substrate wurde mit Hilfe der *stopped flow* Methode (siehe Abschnitt 3.3.6) untersucht.

#### Bindung von hAgo2-I365A an einzelsträngige guide RNA

Zunächst wurde die Bindung von hAgo2-I365A an einzelsträngige *guide* RNA untersucht. Dazu wurde FAM-markierte *guide* RNA schnell mit verschiedenen Konzentrationen hAgo2-I365A gemischt und die Änderung der Fluoreszenz aufgezeichnet. Die Daten wurden durch eine dreifach exponentielle Gleichung am Besten beschrieben (siehe Abbildung 4.69 A). Die erste Phase ist sehr schnell und abhängig von der Konzentration des Proteins. Die Auswertung dieser linearen Abhängigkeit ergab eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,3 (\pm 0,007) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und eine korrespondierende Ratenkonstante  $k_{-1} = 6,7 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.69 B). Diese Ratenkonstanten beschreiben die Bildung von Kollisionskomplexen zwischen hAgo2-I365A und der *guide* RNA. Die nachfolgenden Phasen sind langsamer und nicht abhängig von der Proteinkonzentration. Ein Vergleich dieser beiden Ratenkonstanten mit denen, die mit Hilfe des Wildtyp hAgo2 bestimmt wurden, zeigt, dass die dritte Phase, welche die Assoziation mit der PAZ Domäne repräsentiert, sehr ähnlich ist. Die zweite Phase der Assoziation, die der Verankerung des 5'-Endes in der Mid Domäne entspricht, ist dagegen um Faktor 5 langsamer als mit dem Wildtyp hAgo2 (siehe Tabelle 4.17).

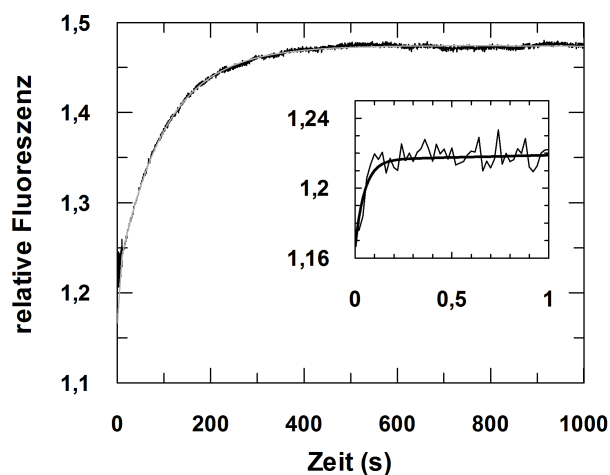


**Abbildung 4.69.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit hAgo2-I365A und einzelsträngiger *guide* RNA.** (A) Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) wurden schnell mit 500 nM hAgo2-I365A gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 21,2 \pm 2,9 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,07 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,004 \pm 0,0008 \text{ s}^{-1}$ . (B) Lineare Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten ersten Phase der Assoziation binärer Komplexe. Daraus ergab sich  $k_1 = 0,3 (\pm 0,007) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 6,7 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ .

#### 4. Ergebnisse

Um die Dissoziation binärer Komplexe zu messen, wurden binäre Komplexe aus hAgo2-I365A und FAM-markierte *guide* RNA präassembliert. Diese binären Komplexe wurden mit einem Überschuss unmarkierter *guide* RNA gemischt, um die Reassoziierung dissoziierter FAM-markierter *guide* RNAs zu verhindern. Die Daten wurden wie die Assoziation mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.70). Auch diese drei Phasen wurden mit denen verglichen, die in einer analogen Reaktion mit Hilfe des Wildtyp hAgo2 Proteins bestimmt wurden. Die dritte Phase, die der Freisetzung des 3'-Endes der *guide* RNA von der PAZ Domäne entspricht, ist im Vergleich zur korrespondierenden Phase mit Wildtyp hAgo2 nur um Faktor 3 verringert. Die zweite Phase, die mit der Entlassung des *guide* 5'-Endes von der Mid Domäne korrespondiert, ist dagegen um Faktor 17 langsamer als mit Wildtyp hAgo2.

**Abbildung 4.70: Pre-steady state Dissoziationskinetik der Dissoziation binärer Komplexe mit hAgo2-I365A.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. Binäre Komplexe aus 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) und 500 nM hAgo2-I365A wurden präassembliert und dann schnell mit 2  $\mu$ M unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet, sodass sich folgende Ratenkonstanten ergaben:  $k_{-1} = 20,4 \pm 2,4 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-2} = 0,01 \pm 0,00007 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-3} = 0,002 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$ .



Offenbar spielt das interkalierende I365 vor allem für die Bindung des 5'-Bereiches der *guide* RNA eine wichtige Rolle. Zum Einen wird die 5'-Region des *guide* Stranges etwas langsamer gebunden, zum Anderen ist aber vor allem die Dissoziation dieses Bereiches der *guide* RNA vom Protein stark verlangsamt. Die dritte Phase ist dagegen kaum verändert. Vermutlich ermöglicht das I365 eine erleichterte Dissoziation der *guide* RNA, wenn kein *target* Strang, der durch den binären *guide*-hAgo2 Komplex gebunden werden könnte, vorhanden ist.

**Tabelle 4.17.: Zusammenfassung der pre-steady state Ratenkonstanten binärer Komplexe mit hAgo2-I365A und *guide* RNA.** \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_{D\_cal}$  wurde mit Hilfe von Gleichung 4.1 berechnet.

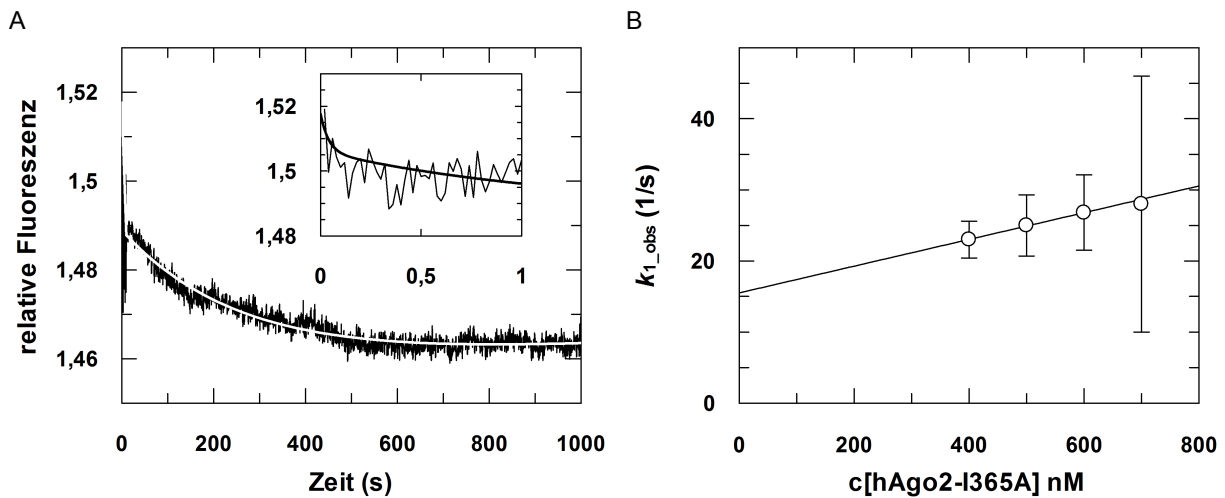
	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{D\_cal}$ (nM)
hAgo2-I365A	$0,3 \times 10^8$	20,4	0,05	0,01	0,006	0,002	45
hAgo2*	$0,6 \times 10^8$	6,2	0,26	0,17	0,012	0,007	37

#### **Bindung von hAgo2-I365A an doppelsträngige *guide* RNA**

In einem nächsten Schritt wurde die Bindung von hAgo2-I365A an doppelsträngige siRNA untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen hAgo2-I365A schnell mit FAM-markierter siRNA gemischt und die Daten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.71). Auch in diesem Experiment war die erste Phase abhängig von der Konzentration des Proteins und sehr schnell. Die lineare Auswertung der Konzentrationsabhän-



gigkeit ergab die Ratenkonstanten  $k_1 = 0,2 (\pm 0,008) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 15,5 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ . Die nachfolgenden Phasen dagegen waren langsamer und nicht abhängig von der Konzentration (siehe Abbildung 4.71).



**Abbildung 4.71.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit hAgo2-I365A und doppelsträngiger siRNA.** (A) Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 20 nM siRNA RNA (si2b<sup>FAM</sup>) wurden schnell mit 500 nM hAgo2-I365A gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 25,0 \pm 4,3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,86 \pm 0,14 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,004 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die lineare Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit der Ratenkonstante  $k_{1,obs}$  der Assoziation binärer Komplexe ergab  $k_1 = 0,2 (\pm 0,008) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 15,5 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ .

Ein Vergleich dieser Ratenkonstanten mit denen, die mit Hilfe des Wildtyp hAgo2 und doppelsträngiger siRNA ermittelt wurden, zeigt, dass der mit einzelsträngiger *guide* RNA beobachtete Unterschied in  $k_2$  mit doppelsträngiger siRNA nicht mehr erkennbar ist (siehe Tabelle 4.18). Auffällig ist dagegen, dass die dritte Phase, die die Verankerung des 3'-Endes in der PAZ Domäne repräsentiert, mit hAgo2-I365A um Faktor 5 langsamer ist als mit dem Wildtyp hAgo2. Offenbar beeinflusst das I365 die Positionierung des 3'-Endes doppelsträngiger siRNAs. Assoziation und Dissoziation des 5'-Endes wird dagegen nur im Fall der einzelsträngigen *guide* RNA durch I365 reguliert.

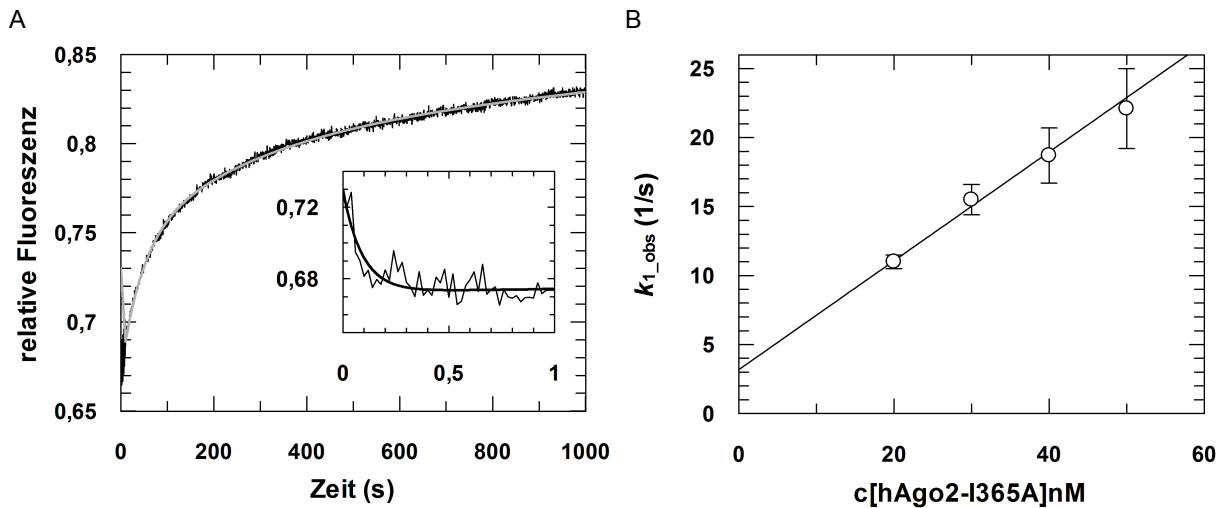
	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )
hAgo2-I365A	$0,2 \times 10^8$	0,74	0,006
hAgo2*	$1,2 \times 10^8$	0,48	0,028

**Tabelle 4.18: Zusammenfassung der pre-steady state Ratenkonstanten binärer Komplexe mit hAgo2-I365A und doppelsträngiger siRNA.** \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

### Kinetische Analyse der Bildung ternärer Komplexe nach Mutation der Aminosäure I365

Nachdem ein Einfluss der Aminosäure I365 auf die Assoziation und Dissoziation binärer Komplexe gezeigt werden konnte (siehe oben), wurde untersucht, ob diese Aminosäure auch eine Bedeutung für die Bildung ternärer Komplexe hat. Dazu wurden binäre Komplexe aus hAgo2-I365A und FAM-markierter *guide* RNA präassembliert und dann schnell mit verschiedenen

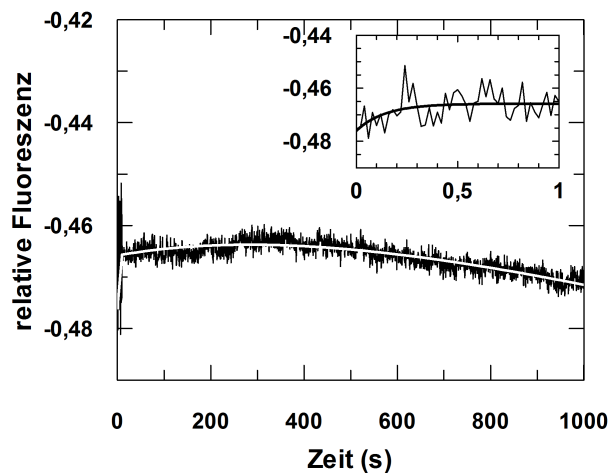
#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.72.: Pre-steady state Assoziationskinetik ternärer Komplexe mit hAgo2-I365A.** (A) Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. Binäre Komplexe aus 500 nM hAgo2-I365A und 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) werden präassembliert und dann schnell mit 20 nM *target* RNA (s2b) gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet. Die Ratenkonstanten betragen:  $k_1 = 11,0 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,02 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,004 \pm 0,00007 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die lineare Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit der Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  der Assoziation ternärer Komplexe ergab  $k_1 = 3,9 (\pm 0,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 3,2 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ .

Konzentrationen *target* RNA gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.72). Die erste Phase ist sehr schnell und abhängig von der Konzentration der *target* RNA. Die lineare Auswertung dieser Phase ergibt die Ratenkonstanten  $k_1 = 3,9 (\pm 0,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 3,2 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ .

**Abbildung 4.73: Pre-steady state Dissoziationskinetik ternärer Komplexe mit hAgo2-I365A.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. Ternäre Komplexe aus 500 nM hAgo2-I365A, 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) und 40 nM s2b wurden präassembliert. Diese wurden schnell mit 2  $\mu\text{M}$  unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die Daten wurden mittels einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet. Es ergaben sich folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 7,1 \pm 1,9 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,0014 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,0004 \pm 0,00009 \text{ s}^{-1}$ .



Die nachfolgenden Phasen sind langsamer und unabhängig von der Konzentration. Im Vergleich mit den Ratenkonstanten der Assoziation ternärer Komplexe mit Wildtyp hAgo2 zeigt, dass die ermittelten Ratenkonstanten nahezu identisch sind (siehe Tabelle 4.19).

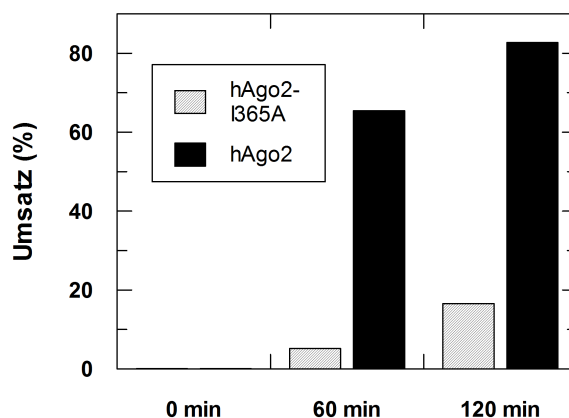
Die Dissoziation wurde untersucht, indem zunächst ternäre Komplexe aus hAgo2, FAM-markierter *guide* RNA und *target* RNA präassembliert wurden. Diese wurden schnell mit einem Überschuss unmarkierter *guide* RNA gemischt.



#### 4.3. Regulation der katalytischen Aktivität von hAgo2 durch die L2 Linker Region und das aktive Zentrum

Auch diese Daten wurden mathematisch mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet (siehe Abbildung 4.73). Die ermittelten Ratenkonstanten wurden mit denen des korrespondierenden Prozesses mit Wildtyp hAgo2 verglichen und zeigen keine größeren Abweichungen (siehe Tabelle 4.19). Die Bildung ternärer Komplexe wird somit durch das I365 nicht beeinflusst. Weder die Assoziationsratenkonstanten noch die Dissoziationsratenkonstanten ändern sich, wenn das I365 zu einem Alanin mutiert wird. Dies wird durch die Spaltexperimente mit hAgo2-I365A bestätigt. hAgo2-I365A ist dazu befähigt, *target* RNAs zu spalten (siehe Abbildung 4.74). Die niedrigeren Umsätze im Vergleich zu hAgo2 sind vermutlich durch die verstärkte Aggregationsneigung von hAgo2-I365A begründet.

mathematisch mit Hilfe einer dreifach



**Abbildung 4.74.: Spaltung mit hAgo2-I365A.** Der Standard Spalttest wurde mit hAgo2 und hAgo2-I365A durchgeführt. Im Graph sind die relativen Umsätze der *target* RNA Spaltung durch hAgo2 und hAgo2-I365A gegen die Zeit aufgetragen. Als *guide* Substrat diente as2b und als *target* RNA wurde s2b mit einer radioaktiven Markierung am 5'-Ende eingesetzt.

**Tabelle 4.19.: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten ternärer Komplexe mit hAgo2-I365A.** \* = Ratenkonstante wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deeb bestimmt<sup>(218)</sup>. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_{D\_cal}$  wurde mit Hilfe von Gleichung 4.1 berechnet.

	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-3}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{D\_cal}$ (nM)
hAgo2-I365A	$3,9 \times 10^8$	7,1	0,024	0,003	0,004	0,0005	0,28
hAgo2	$3,2 \times 10^8^*$	2,0	0,01	0,003	0,003	0,0003	0,19

## 4.4. Biochemische Charakterisierung des Effekts von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von RNAs

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von RNAs isoliert von im RLC vorhandenen Proteinen untersucht. Der folgende Teil der Arbeit beschäftigt sich damit, welche Rolle die als Bestandteil des RLC bekannten dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT (siehe Abschnitt 2.5) in diesen Prozessen spielen. Es ist bereits bekannt, dass sie die Prozessierung von Vorläufermolekülen der kurzen regulatorischen RNAs modulieren<sup>(202–204,212)</sup> und an der Selektion des *guide* Stranges beteiligt sind<sup>(53,54)</sup>. Für hTRBP konnten außerdem direkte Wechselwirkungen mit hAgo2 nachgewiesen werden<sup>(93)</sup>. Da sowohl hTRBP als auch hPACT Komponenten des minimalen RLC darstellen, ist zu vermuten, dass sie auch an der Beladung von hAgo2 beteiligt sein könnten. Ob und wie sie die Beladung von hAgo2 mit siRNA unterstützen und welchen Einfluss sie auf die hAgo2-vermittelte Spaltung von *target* und *passenger* RNAs haben, ist allerdings bisher unklar. Dies ist Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen.

### 4.4.1. Charakterisierung der Bindung von hTRBP und hPACT an siRNA<sup>5</sup>

Zunächst sollte die Wechselwirkung der beiden dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT mit siRNA charakterisiert werden. Dazu wurde die siRNA silam<sup>FAM</sup> verwendet. Die Fluoreszenz-Markierung dieser siRNA befindet sich am 5'-Ende der *guide* RNA und interferiert somit möglichst wenig mit der Bindung der dsRNA-bindenden Proteine an den Duplex.

#### 4.4.1.1. Kinetische Analyse der Assemblierung von siRNA und hTRBP bzw. hPACT

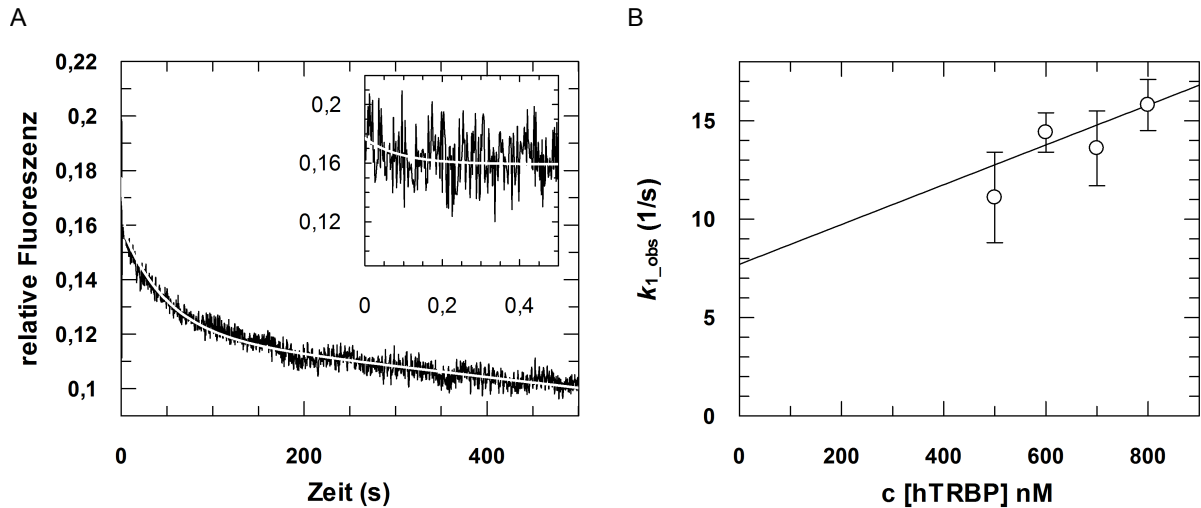
Die Bindung von hTRBP und hPACT wurde zunächst unter *pre-steady state* Bedingungen mit Hilfe der *stopped flow* Methode (siehe Abschnitt 3.3.6) untersucht. Jeweils 50 nM der FAM-markierten siRNA wurden schnell mit hTRBP oder hPACT gemischt. In beiden Fällen konnten die daraus erhaltenen Daten am Besten durch eine zweifach exponentielle Gleichung beschrieben werden (siehe Abbildung 4.75 A und 4.76 A).

Die erste Phase ist sowohl mit hTRBP als auch mit hPACT sehr schnell und abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Die Auswertung dieser linearen Abhängigkeit ergab im Fall von hTRBP eine erste Phase  $k_1 = 1 (\pm 0,6) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.75 B) und im Fall von hPACT  $k_1 = 5 (\pm 0,04) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (siehe Abbildung 4.76 B).

Diese erste Phase repräsentiert vermutlich die Bildung von Kollisionskomplexen zwischen den dsRNA-bindenden Protein hTRBP und hPACT mit der siRNA. Die nachfolgende Phase ist langsamer und für hTRBP und hPACT nahezu identisch (siehe Tabelle 4.20). Die Dissoziation der Komplexe aus dsRNA-bindenden Proteinen und siRNA wurde mit Hilfe präassemblierter Komplexe aus hTRBP bzw. hPACT und siRNA gemessen. Diese wurden schnell mit

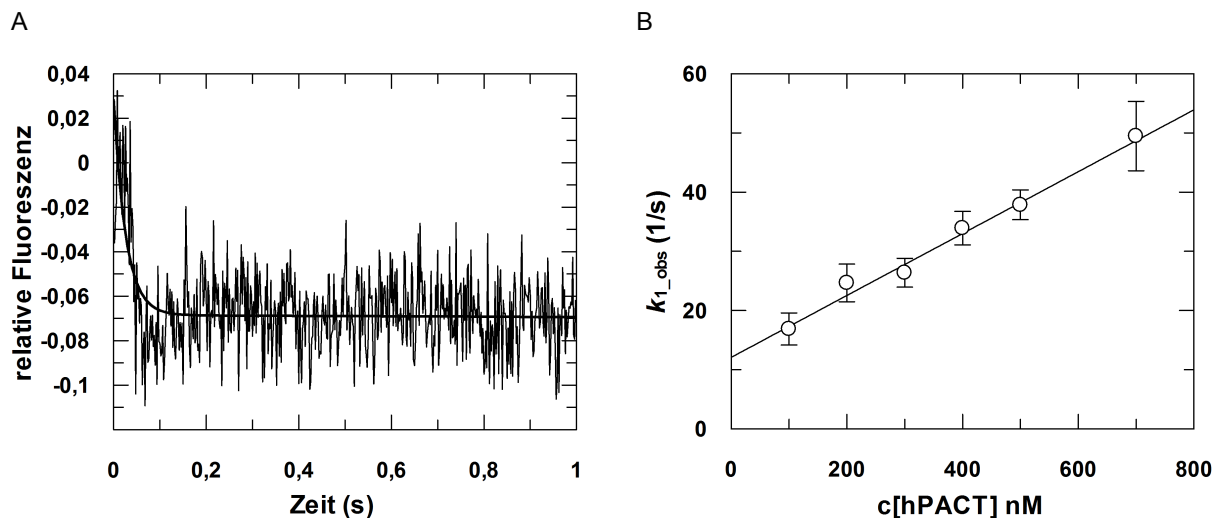
<sup>5</sup>Klonierung, Expression, Reinigung und Fluoreszenztitration von hTRBP-D12 wurden in Zusammenarbeit mit R. Hu und J. Meine durchgeführt. Klonierung, Expression, Reinigung und Bindungsexperimente mit hPACT wurden teilweise in Zusammenarbeit mit F. Flügge durchgeführt.

4.4. Effekt von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von RNAs



**Abbildung 4.75.: Pre-steady state Assoziationskinetik von hTRBP und siRNA.** (A) Ein repräsentativer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 500 nM hTRBP wurden schnell mit 50 nM silam<sup>FAM</sup> gemischt. Die Auswertung der Daten mit einer zweifach exponentiellen Gleichung ergab die Ratenkonstanten  $k_1 = 11,1 \pm 2,3 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2 = 0,02 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  von der Proteinkonzentration ergab die Ratenkonstante  $k_1 = 1 (\pm 0,6) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 7,7 \pm 3,8 \text{ s}^{-1}$ .

einem Überschuss unmarkierter siRNA gemischt, um eine Reassoziierung dissoziierter FAM-markierter siRNAs zu verhindern. Die mit hTRBP erhobenen Daten ließen sich am Besten mit Hilfe einer zweifach exponentiellen Gleichung auswerten (siehe Abbildung 4.77 A).

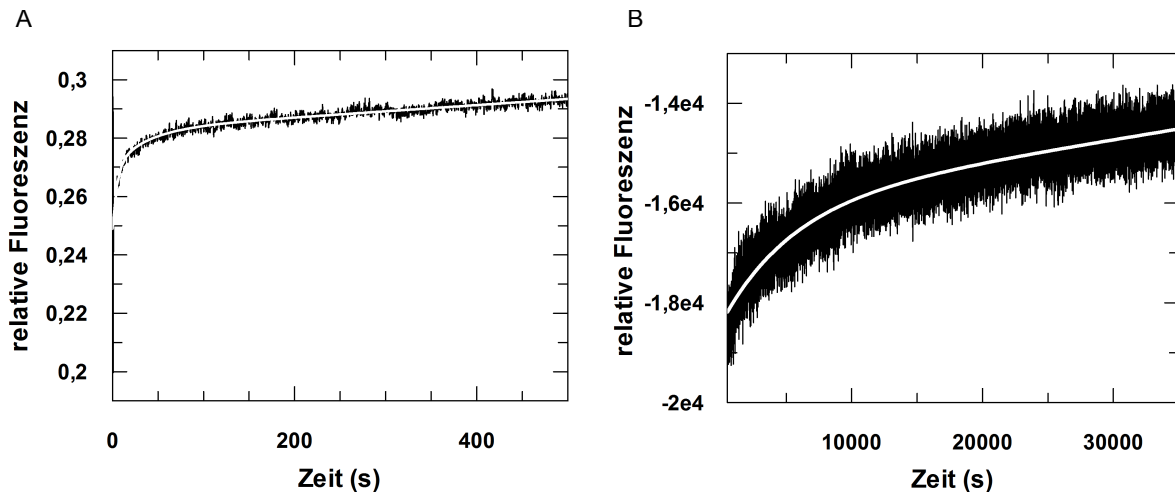


**Abbildung 4.76.: Pre-steady state Assoziationskinetik von hPACT und siRNA.** (A) Ein repräsentativer Graph ist gezeigt. 500 nM hPACT wurden schnell mit 50 nM silam<sup>FAM</sup> gemischt. Die Auswertung der Daten mit einer zweifach exponentiellen Gleichung ergab die Ratenkonstanten  $k_1 = 37,8 \pm 2,5 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2 = 0,04 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der Ratenkonstante  $k_{1\_obs}$  von der Proteinkonzentration ergab die Ratenkonstante  $k_1 = 5 (\pm 0,04) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer korrespondierenden Ratenkonstante  $k_{-1} = 12,1 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$ .

Mit hPACT war auf diese Weise eine Messung der Dissoziationsratenkonstanten mit Hilfe der *stopped flow* Methode nicht möglich. Das Protein zeigt eine Neigung zur Aggregation, die offenbar in Anwesenheit großer Mengen Nukleinsäure steigt. Somit war die Messung nur mit

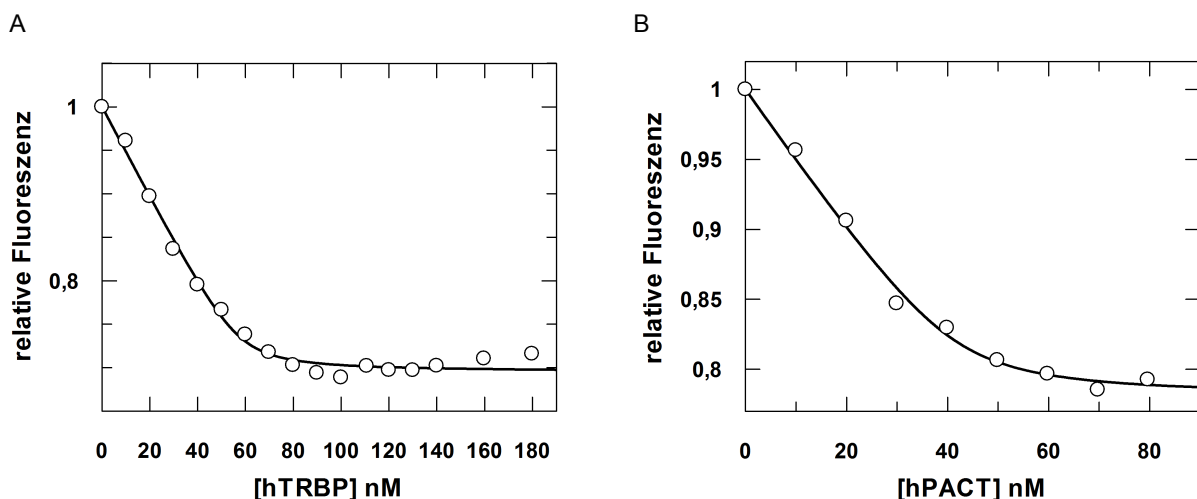
#### 4. Ergebnisse

Hilfe des FluoroMAX<sup>®</sup> Fluoreszenzspektrometers möglich. Hier wurde die Dissoziation binärer hPACT-siRNA Komplexe über einen Zeitraum von 36.000 s beobachtet. Es konnte unter diesen Bedingungen nur eine Ratenkonstante aufgelöst werden (siehe Abbildung 4.77 B). Ein Vergleich mit der zweiten Ratenkonstante, die mit hTRBP ermittelt werden konnte, zeigt, dass die Ratenkonstante mit hPACT um etwa zwei Logstufen langsamer ist (siehe Tabelle 4.20).



**Abbildung 4.77.: Pre-steady state Dissoziationskinetik von Komplexen mit dsRNA-bindenden Proteinen und siRNA.** (A) Dissoziation von präassemblierten Komplexen aus 500 nM hTRBP und 50 nM silam<sup>FAM</sup>. Diese Komplexe wurden schnell mit 2  $\mu$ M unmarkierter siRNA gemischt. Die zweifach exponentielle Auswertung ergab folgende Ratenkonstanten:  $k_{-1} = 0,2 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-2} = 0,03 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ . (B) Die Dissoziation präassemblierter Komplexe aus 500 nM hPACT und 50 nM silam<sup>FAM</sup> wurde mit Hilfe des FluoroMAX<sup>®</sup> Fluoreszenzspektrometers gemessen. Die Komplexe wurden mit 2  $\mu$ M unmarkierter siRNA gemischt. Die exponentielle Auswertung ergab eine Ratenkonstante  $k_{-2} = 0,0002 (\pm 3 \times 10^{-6}) \text{ s}^{-1}$ .

#### 4.4.1.2. Bestimmung der Affinität von hTRBP und hPACT für siRNA

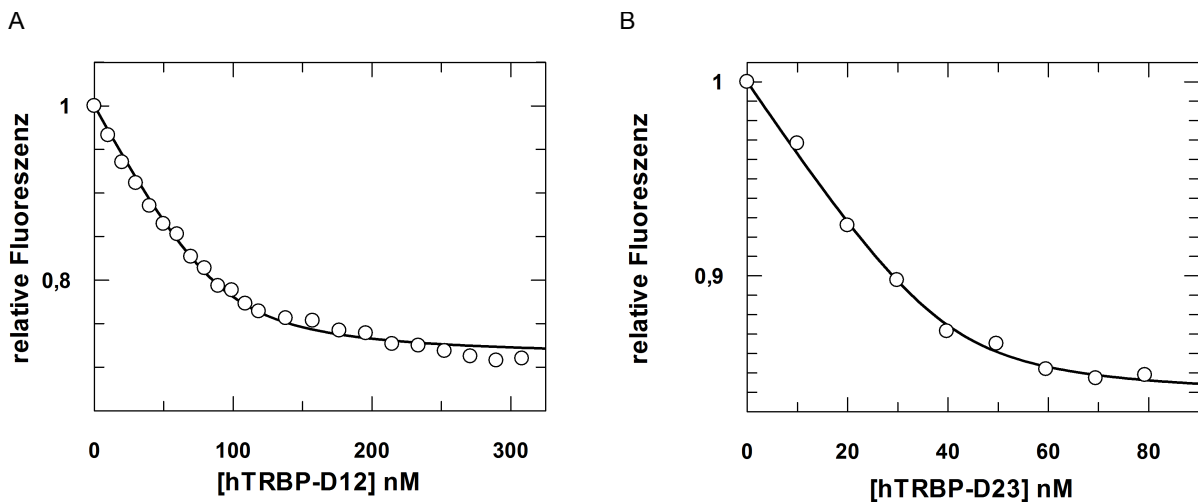


**Abbildung 4.78.: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von hTRBP und hPACT für siRNA.** 50 nM silam<sup>FAM</sup> wurden mit hTRBP (A) oder hPACT (B) titriert. Dabei ergab sich nach Auswertung mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 1,2 \pm 0,4 \text{ nM}$  (A) bzw.  $1,7 \pm 0,5 \text{ nM}$  (B). Die gleichzeitig berechneten Konzentrationen der eingesetzten siRNA betragen  $57,3 \pm 2,5 \text{ nM}$  (A) bzw.  $41,7 \pm 2,4 \text{ nM}$ .

#### 4.4. Effekt von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von RNAs

Die Assoziation der Komplexe aus dsRNA-bindenden Proteinen und siRNA wurde in einem nächsten Schritt unter Gleichgewichtsbedingungen untersucht. Die mit Hilfe des FluoroMAX<sup>®</sup> Fluoreszenzspektrometers durchgeführten Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen wurden nicht nur mit hTRBP und hPACT, sondern auch mit zwei Mutanten des hTRBP Proteins ausgeführt. Dabei handelte es sich zum Einen um hTRBP-D12, dem die dsRBD3 fehlt und zum Anderen um hTRBP-D23, dessen dsRBD1 entfernt wurde. Die Daten konnten mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ausgewertet werden.

Es zeigte sich, dass sowohl hTRBP als auch hPACT sehr fest an die siRNA binden. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D$  liegen für hTRBP mit 1,2 nM und 1,7 nM für hPACT in einer identischen Größenordnung (siehe Abbildung 4.78). Die beiden Mutanten hTRBP-D12 und hTRBP-D23 binden etwas schwächer. Für hTRBP-D12 konnte eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 9,9 nM ermittelt werden, während sich mit hTRBP-D23 eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 2,7 nM ergab. Dabei muss beachtet werden, dass die mit hTRBP-D12 bestimmte Konzentration der eingesetzten siRNA um das Doppelte von der tatsächlich eingesetzten Menge abwich (siehe Abbildung 4.79). Vermutlich tragen hier Aggregationsprobleme zu einer geringen Abweichung des Wertes für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante bei.



**Abbildung 4.79.: Gleichgewichtsfluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität von hTRBP-D12 und hTRBP-D23 für siRNA.** 50 nM silam<sup>FAM</sup> wurden mit hTRBP-D12 (A) oder hTRBP-D23 (B) titriert. Dabei ergab sich nach Auswertung mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 9,9 \pm 1,3$  nM (A) bzw.  $2,7 \pm 0,5$  nM (B). Die gleichzeitig berechneten Konzentrationen der eingesetzten siRNA betragen  $91,9 \pm 4,7$  nM (A) bzw.  $40,6 \pm 2,0$  nM.

Ein Vergleich der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten, die mit Hilfe der Ratenkonstanten der Assoziation und Dissoziation binärer Komplexe aus hTRBP und siRNA bzw. hPACT und siRNA berechnet wurden, mit den Gleichgewichtsdissoziationskonstanten, die mit Hilfe von Fluoreszenztitration bestimmt wurden, offenbart Unterschiede (siehe Tabelle 4.20). Diese resultieren vermutlich aus der Aggregationsneigung der beiden Proteine. Die Aggregation führt zu reduzierten Diffusionsraten und damit zu einer Unterschätzung der Assoziationsratenkonstante  $k_1$ . Die mit Hilfe dieser Assoziationsratenkonstante berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante ist somit zu hoch. Unter Gleichgewichtsbedingungen spielen die oben beschriebene

#### 4. Ergebnisse

nen Umstände keine Rolle, weshalb eine Diskrepanz in den aus *pre-steady state* Daten und Gleichgewichtsmessungen ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zu erkennen ist.

**Tabelle 4.20.: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten und Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von Komplexen mit dsRNA-bindenden Proteinen und siRNA.**  $K_{D\_cal}$  wurde aus den gezeigten Ratenkonstanten mit Hilfe der Gleichung 4.1 berechnet, während  $K_{D\_cal}$  mit Hilfe von Fluoreszenztitration bestimmt wurde. Die Ratenkonstante  $k_{-1}$  wurde im Fall von hPACT mit Hilfe der linearen Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit von  $k_{1\_obs}$  bestimmt, da eine direkte Messung im Dissoziationsexperiment auf Grund von Aggregationsproblemen nicht möglich war.

Protein	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{D\_cal}$ (nM)	$K_{D\_FT}$ (nM)
hTRBP	$1 \times 10^7$	0,2	0,03	0,03	19,8	1,2
hTRBP-D12						9,9
hTRBP-D23						2,7
hPACT	$5 \times 10^7$	12,1	0,01	0,0002	4,8	1,7

Die Untersuchung der Affinität von hTRBP und hTRBP-D12 für siRNA offenbart eine Differenz in den Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (siehe Tabelle 4.20), die zunächst unerwartet war. Die Affinität von hTRBP-D12 für siRNA ist schwächer als die von hTRBP. Da gezeigt werden konnte, dass nur die ersten beiden dsRBDs an doppelsträngige RNA binden (siehe Abschnitt 2.5.1) und diese beide vorhanden sind, überrascht dieses Ergebnis zunächst.

Um herauszufinden, wie sich die beiden Proteine in ihrer Bindung an siRNA unterscheiden, wurden DLS Messungen durchgeführt. Eine Störung der Messungen durch große Partikel wurde vermieden, indem die Proben zuvor bei 4 °C und 20.000 x g für 45 min abzentrifugiert wurden. Die DLS Messungen ergaben, dass die hydrodynamischen Radien von hTRBP und hTRBP-D12 schon in Abwesenheit von siRNA sehr unterschiedlich sind (siehe Tabelle 4.21). Die hTRBP Mutante hTRBP-D12 bildet Aggregate, die mehr als doppelt so groß wie die mit hTRBP beobachteten Aggregate sind. Das Fehlen der dsRBD3 führt vermutlich auf Grund einer gestörten Organisation der dsRBD1 und dsRBD2 zu einer verstärkten Aggregationsneigung von hTRBP-D12. Die mit hTRBP beobachteten Aggregate könnten auf Grund der theoretisch berechneten Radien linearen hTRBP Dimeren entsprechen. Für diese wurde ein theoretischer Radius von 7,5 nm bestimmt. Der mit hTRBP-D12 beobachtete Radius zeigt, dass es sich bei den Aggregaten um größere Multimere handelt. Wird hTRBP 1:1 mit siRNA gemischt, ist eine geringe Abnahme des hydrodynamischen Radius zu beobachten. Möglicherweise kann die Bindung von zwei oder drei hTRBP Monomeren an ein siRNA Molekül beobachtet werden. Eine Vernetzung findet unter diesen Bedingungen höchstwahrscheinlich nicht statt. Wird das Verhältnis von hTRBP zu siRNA auf 5:1 erhöht, ist auch eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius auf rund 25 nm zu beobachten. Diese starke Erhöhung des hydrodynamischen Radius kann auf zwei verschiedene Dinge zurückzuführen sein. Zum Einen ist es möglich, dass es zur Vernetzung durch die Bindung der dsRBDs an verschiedene siRNA Moleküle kommt. Zum Anderen ist es denkbar, dass sich die Anzahl der hTRBP Moleküle pro siRNA Molekül erhöht und damit verbunden vermehrt Aggregation auftritt.

Wenn allerdings eine Vernetzung stattfinden würde, könnte man dies vermutlich auch schon beim Verhältnis 1:1 erkennen. Somit ist eine Vergrößerung der Aggregate durch Erhöhung der Anzahl der hTRBP Moleküle je siRNA Molekül wahrscheinlicher. Mit hTRBP-D12 ist eine Er-

höhung des hydrodynamischen Radius schon bei einem Verhältnis hTRBP-D12 zu siRNA von 1:1 zu erkennen. Vermutlich sind durch das Fehlen der dsRBD3 die anderen beiden dsRBDs anders positioniert, sodass es zu einer Vernetzung von siRNA Molekülen durch hTRBP-D12 kommen kann. Wird die Konzentration von hTRBP-D12 im Vergleich zur siRNA auf 5:1 erhöht, kommt es zur weiteren Vernetzung sowie zur Bindung von mehr hTRBP-D12 Molekülen je siRNA Molekül. Dies könnte den weiteren Anstieg des hydrodynamischen Radius erklären. Weiterhin könnte dies den Grund für die mit Hilfe von Fluoreszenztitration bestimmte höhere Gleichgewichtsdissoziationskonstante darstellen (siehe oben).

Komponenten	hydrodynamischer Radius (nm)	Tabelle 4.21: Zusammenfassung der hydrodynamischen Radien von Apo-hTRBP und Apo-hTRBP-D12 bzw. hTRBP und hTRBP-D12 im Komplex mit siRNA. DLS Messungen wurden mit hTRBP und hTRBP-D12, teilweise im Komplex mit siRNA, durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen waren wie folgt: hTRBP allein (7,6 µM), hTRBP-D12 allein (7,7 µM), hTRBP und siRNA (1:1) (jeweils 5 µM), (5:1) (5 µM: 1 µM), hTRBP-D12 und siRNA (1:1) (jeweils 3 µM), (5:1) (4 µM: 0,8 µM). Die hydrodynamischen Radien wurden aus drei verschiedenen Messungen gemittelt und mit der Standardabweichung dargestellt.
<b>hTRBP</b>		
hTRBP	7,2 ± 1,1	
hTRBP, siRNA (1:1)	5,8 ± 0,9	
hTRBP, siRNA (5:1)	24,5 ± 0,4	
<b>hTRBP-D12</b>		
hTRBP-D12	17,5 ± 7,6	
hTRBP-D12, siRNA (1:1)	30,5 ± 9,6	
hTRBP-D12, siRNA (5:1)	56,9 ± 9,3	

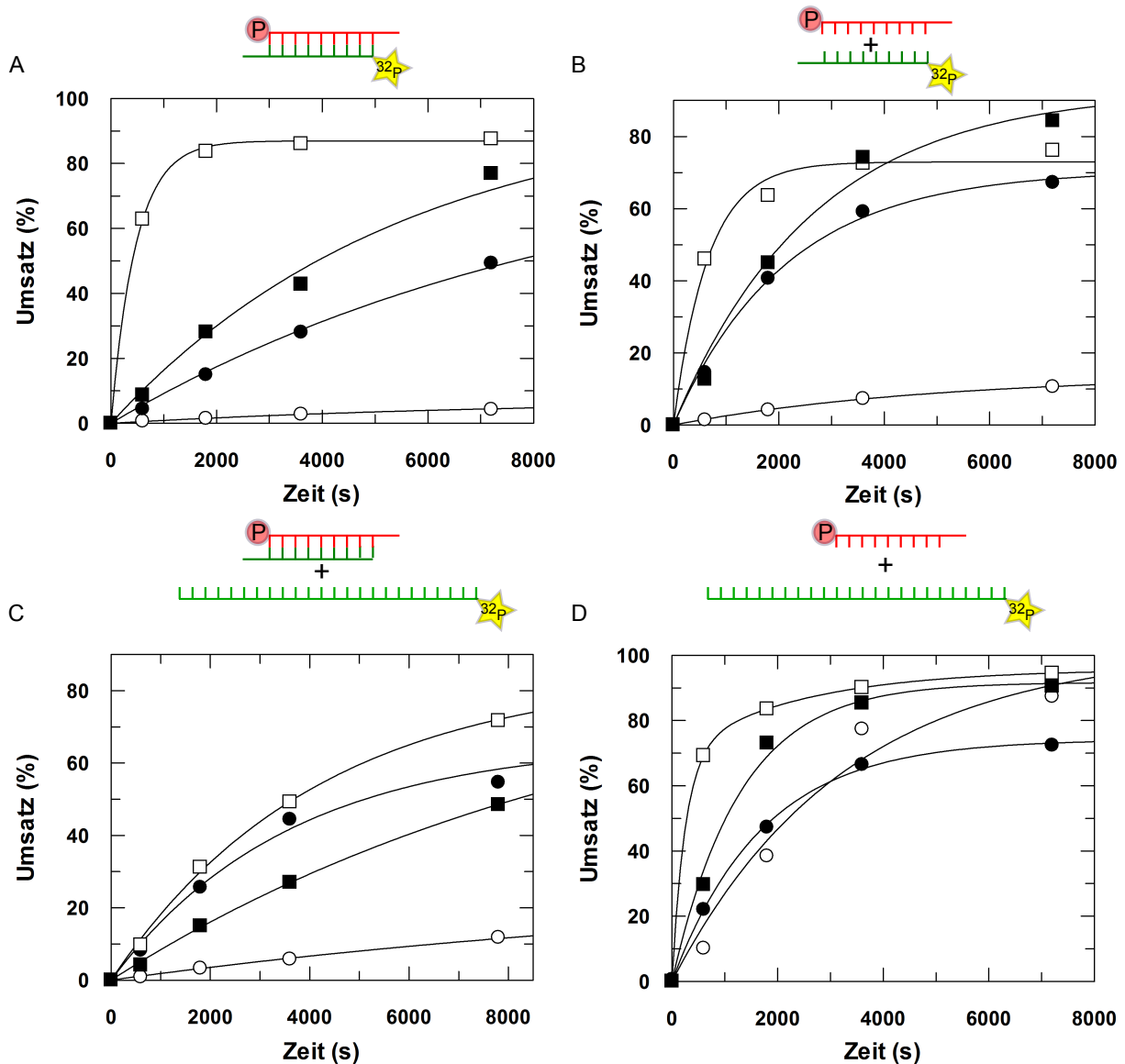
#### 4.4.2. Untersuchung des Einflusses von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Spaltung von RNAs

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Spaltung beschrieben und näher charakterisiert. Dazu wurde zunächst der Standard Spalttest unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. In diesen Untersuchungen wurde auch der Effekt der hTRBP Mutante hTRBP-D12 analysiert.

Zum Einen wurde untersucht, ob die dsRNA-bindenden Proteine einen Einfluss auf die *passenger* Spaltung haben. Dazu wurde eine siRNA mit einem radioaktiv markierten *passenger* Strang verwendet, sodass die Spaltung der *passenger* RNA detektiert werden konnte. Ohne die dsRNA-bindenden Proteine ist die Amplitude der Spaltung der *passenger* RNA mit unter 10 % sehr niedrig. Wird die Spaltreaktion jedoch in Anwesenheit eines der drei dsRNA-bindenden Proteine durchgeführt, wird die Amplitude um ein Vielfaches erhöht (siehe Abbildung 4.80 A und Tabelle 4.22). Die Ratenkonstante bleibt dabei nahezu unverändert. Einzig in Gegenwart von hTRBP-D12 wird die Ratenkonstante um eine Log-Stufe beschleunigt.

Eine signifikante Erhöhung der Amplitude der Spaltung in Anwesenheit aller drei dsRNA-bindenden Proteine und eine Beschleunigung der Ratenkonstante in Anwesenheit von hTRBP-D12 konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn hAgo2 mit einzelsträngiger *guide* RNA inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe einer 21 nt *target* RNA gestartet wurde (siehe Abbildung 4.80 B und Tabelle 4.22).

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.80.: hAgo2-vermittelte Strang Spaltung in Anwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen.** Es wurden in allen vier Beispielen die Bedingungen des Standard Spalttests verwendet. (A) Um *passenger* Spaltung zu untersuchen, wurden 30 nM siRNA (si2b) mit einem radioaktiv markierten *passenger* Strang (s2b) mit 3  $\mu$ M hAgo2 gemischt. In B,C und D wurde die Spaltung von *target* RNAs untersucht. Dazu wurden 3  $\mu$ M hAgo2 mit 100 nM einzelsträngiger *guide* RNA (as2b) (B,D) oder doppelsträngiger siRNA (si2b) (C) präassembliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von radioaktiv markierter 21 nt *target* RNA (s2b) (B) oder 140 nt *target* RNA (ICAM IVT) (C,D) gestartet. Alle vier Experimente wurden ohne Zusatz von dsRBPs (leere Kreise), in Anwesenheit von 3  $\mu$ M hTRBP (gefüllte Kreise), hTRBP-D12 (leere Quadrate) oder hPACT (gefüllte Quadrate) durchgeführt. Nach 0', 10', 30', 60' und 120' wurden Proben entnommen, über 8 % (C,D) oder 20 % (A,B) denaturierende PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Die relativen Umsätze wurden bestimmt und die Daten mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet. Die dabei ermittelten Ratenkonstanten und Amplituden sind in Tabelle 4.22 aufgelistet.

Zum Anderen wurden Untersuchungen mit einer 140 nt langen *target* RNA (ICAM IVT) durchgeführt. Auch mit dem langen *target* Strang wurde zunächst hAgo2 mit einer doppelsträngigen siRNA inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des radioaktiv markierten ICAM IVTs gestartet. Der Umsatz ohne dsRNA-bindende Proteine beträgt 27,9 %. Alle drei dsRNA-



#### 4.4. Effekt von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Bindung und Spaltung von RNAs

bindenden Proteine führen zu einer starken Erhöhung der Amplitude der hAgo2-vermittelten Spaltung. Im Unterschied zu den mit kurzer *target* RNA durchgeführten Spalttests konnte jedoch keine Steigerung der Ratenkonstante der Spaltung in Anwesenheit von hTRBP-D12 beobachtet werden (siehe Abbildung 4.80 C und Tabelle 4.22).

Das gleiche Experiment wurde nach Programmierung von hAgo2 mit einzelsträngiger *guide* RNA durchgeführt. Nach Programmierung mit einzelsträngiger *guide* RNA erreichte hAgo2 in Abwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen einen *target* RNA Umsatz, der vergleichbar mit den Umsätzen ist, die in den anderen Experimenten nur mit dsRNA-bindenden Proteinen erreicht werden konnte. Die Effizienz von hAgo2 ist sehr viel höher, wenn ein einzelsträngiger *guide* Strang und eine lange *target* RNA verwendet wurden. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass hAgo2 fester an einzelsträngige *guide* Stränge als an doppelsträngige siRNAs bindet<sup>(218)</sup>. Die beiden Proteine hPACT und hTRBP-D12 zeigen keinen Einfluss auf die Amplitude der *guide* Strang-abhängigen Spaltung des ICAM IVT. Das Protein hTRBP dagegen führt zu einer Verringerung der Amplitude der hAgo2-vermittelten Spaltung.

Obwohl hTRBP-D12 keinen Einfluss auf die Amplitude der Spaltung zeigt, ist ein Einfluss auf die Ratenkonstante der Spaltung zu erkennen. Es ist in Gegenwart von hTRBP-D12 ein zweiphasiger Verlauf der *guide* RNA abhängigen hAgo2-vermittelten Spaltung der langen *target* RNA zu beobachten. Offenbar stabilisiert hTRBP-D12 hAgo2, sodass eine *burst* Amplitude beobachtet werden kann. Die Ratenkonstante der *burst* Phase ist um eine Logstufe schneller als die unter *multiple turnover* Bedingungen gemessene Ratenkonstante (siehe Abbildung 4.80 D und Tabelle 4.22).

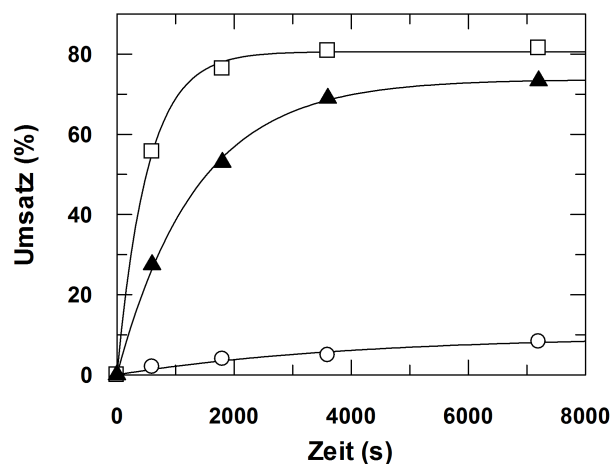
**Tabelle 4.22.: Ratenkonstanten und Amplituden der hAgo2-vermittelten RNA Spaltung in Anwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen.** Graphen siehe Abbildung 4.80.  $k_S = k_{\text{Spaltung}}$ ; A = Amplitude; 21 nt *target* RNA = s2b; 140 nt *target* RNA = ICAM IVT.

	<i>passenger</i> Spaltung	<i>ss guide</i> 21 nt <i>target</i>	<i>ds-siRNA</i> 140 nt <i>target</i>	<i>ss guide</i> 140 nt <i>target</i>
<b>ohne dsRBP</b>				
$k_S$ (s <sup>-1</sup> )	0,0001 ± 9x10 <sup>-6</sup>	0,0002 ± 1x10 <sup>-5</sup>	0,0001 ± 1x10 <sup>-5</sup>	0,0003 ± 1x10 <sup>-4</sup>
A (%)	7,4 ± 0,3	13,9 ± 0,5	27,9 ± 3,3	102,2 ± 15,5
<b>mit hTRBP</b>				
$k_S$ (s <sup>-1</sup> )	0,0001 ± 8x10 <sup>-6</sup>	0,0005 ± 4x10 <sup>-5</sup>	0,0003 ± 4x10 <sup>-5</sup>	0,0006 ± 2x10 <sup>-5</sup>
A (%)	87,7 ± 3,6	70,7 ± 2,5	65,7 ± 3,3	74,2 ± 1,1
<b>mit hTRBP-D12</b>				
$k_S$ (s <sup>-1</sup> )	0,0021 ± 6x10 <sup>-5</sup>	0,0015 ± 2x10 <sup>-4</sup>	0,0002 ± 1x10 <sup>-5</sup>	$k_1$ : 0,004 ± 2x10 <sup>-5</sup> $k_2$ : 0,0004 ± 3x10 <sup>-6</sup>
A (%)	87,0 ± 0,4	73,0 ± 2,4	84,9 ± 1,7	A <sub>1</sub> : 69,7 ± 0,2 A <sub>2</sub> : 26,1 ± 0,1
<b>mit hPACT</b>				
$k_S$ (s <sup>-1</sup> )	0,0002 ± 8x10 <sup>-5</sup>	0,0004 ± 7x10 <sup>-5</sup>	0,0001 ± 6x10 <sup>-6</sup>	0,0008 ± 1x10 <sup>-4</sup>
A (%)	98,6 ± 4,6	92,9 ± 7,6	92,6 ± 3,9	91,7 ± 3,1

#### 4. Ergebnisse

Ein Vergleich der Amplituden nach Zugabe von dsRNA-bindenden Proteine aller vier Spaltbedingungen zeigt, dass eine Erhöhung unabhängig von der Amplitude ist, die ohne dsRNA-bindende Proteine bestimmt wurde.

Interessanterweise unterscheiden sich die beobachteten Effekte mit der langen *target* RNA je nachdem, ob eine einzelsträngige *guide* RNA oder eine doppelsträngige siRNA zur Programmierung von hAgo2 verwendet wurde. Der verstärkende Effekt der dsRNA-bindenden Proteine scheint spezifisch nach Programmierung von hAgo2 mit doppelsträngiger siRNA aufzutreten. Mit einer kurzen *target* RNA, die in ihrer Länge der *passenger* RNA entspricht, ist diese Unterscheidung nicht möglich. Dies unterstützt die bereits in Abschnitt 4.2.4 aufgestellte Hypothese, dass kurze *target* Stränge auf andere Art und Weise an binäre hAgo2-*guide* Strang Komplexe gebunden werden.



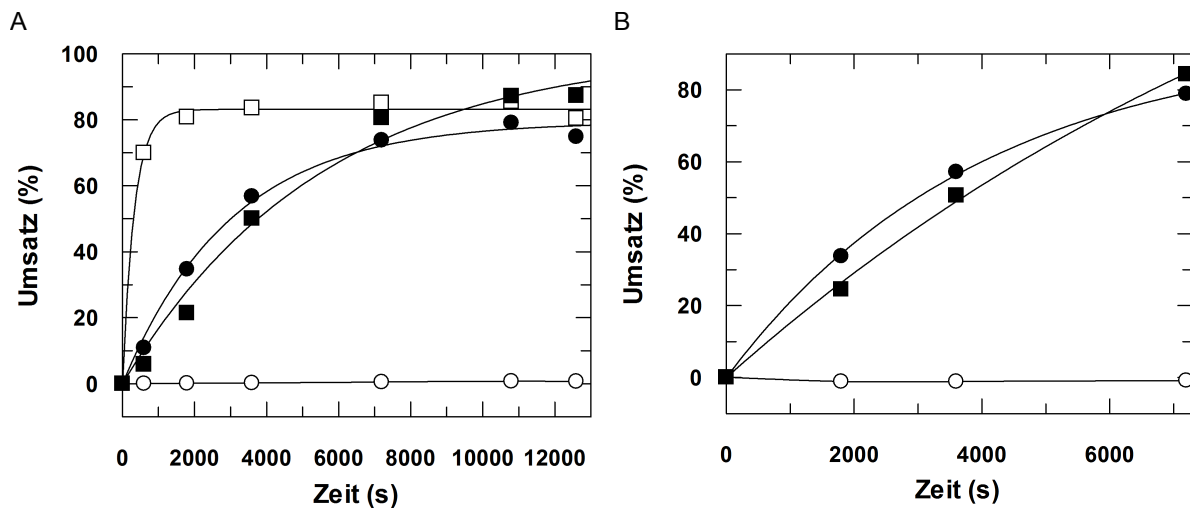
**Abbildung 4.81.: Vergleich des Effekts von hTRBP-D12 und hTRBP-D23 auf die hAgo2-vermittelte *passenger* Spaltung.** Der Versuch wurde unter Bedingungen des Standard Spalttests ohne dsRNA-bindende Proteine (leere Kreise), mit hTRBP-D12 (leere Quadrate) und mit hTRBP-D23 (leere Dreiecke) durchgeführt. Nach 0', 10', 30', 60' und 120' wurden Proben entnommen, über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Die relativen Umsätze wurden bestimmt und die Daten mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet. Es ergaben sich folgende Amplituden und Ratenkonstanten: ohne dsRNA-bindende Proteine  $k_{\text{Spaltung}} = 0,0002 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$  bei einer Amplitude von  $9,7 \pm 1,9 \%$ , mit hTRBP-D12  $k_{\text{Spaltung}} = 0,0019 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$  bei einer Amplitude von  $80,6 \pm 0,7 \%$  und mit hTRBP-D23  $k_{\text{Spaltung}} = 0,0007 \pm 0,00003 \text{ s}^{-1}$  bei einer Amplitude von  $73,7 \pm 0,9 \%$ .

Unter *multiple turnover* Bedingungen konnte mit kurzer *target* RNA eine Erhöhung der Ratenkonstante durch hTRBP-D12 festgestellt werden. Unter *multiple turnover* Bedingungen ist die Dissoziation der ternären Komplexe mit kurzen, nicht aber mit langen *target* RNAs geschwindigkeitsbestimmend (siehe Abschnitt 4.2.4). Daher wird angenommen, dass hTRBP-D12 einen beschleunigenden Effekt auf die Spaltproduktfreisetzung ausübt. Diese Vermutung wird in Abschnitt 4.4.3.2 näher beleuchtet. Dem Protein hTRBP-D12 fehlt die dsRBD3. Somit wird die Hypothese aufgestellt, dass diese Domäne einen regulierenden Einfluss auf den hTRBP-vermittelten Effekt hat. Diese Vermutung wird dadurch erhärtet, dass in Anwesenheit von hTRBP-D12 in allen Fällen die Amplitude der hAgo2-vermittelten Spaltung wesentlich höher war als in Anwesenheit von hTRBP.

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, welche Domänen von hTRBP in die Beschleunigung der Dissoziation der Spaltprodukte involviert sein könnten. Zu diesem Zweck

wurde die dsRBD1 deletiert (hTRBP-D23). Im Spalttest zeigte sich, dass die Amplitude der *passenger* Spaltung in Anwesenheit von hTRBP-D23 ebenfalls stark erhöht war. Allerdings ist die Ratenkonstante nur um Faktor 3 beschleunigt (siehe Abbildung 4.81). Somit scheint die Beschleunigung der Ratenkonstante unter *multiple turnover* Bedingungen vor allem durch die dsRBD1 vermittelt zu werden. Die Erhöhung der Spaltamplitude dagegen ist vermutlich vor allem auf die dsRBD2 und die umgebenden Linker Regionen zurückzuführen.

In weiteren Spalttests sollte geklärt werden, auf welche Art und Weise eine Erhöhung der Spaltamplitude durch die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT erreicht werden kann. Die Auswertung der Ratenkonstanten der Spalttests (siehe Tabelle 4.22) zeigte, dass diese bei Zugabe von dsRNA-bindenden Proteinen im Allgemeinen im Rahmen der Messgenauigkeit relativ stabil bleiben. Eine Beschleunigung der Spaltung ist somit nicht der Grund für den gesteigerten Umsatz. Eine andere Möglichkeit für die erhöhten Amplituden in Anwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen könnte eine Stabilisierung der Bindung von hAgo2 an doppelsträngige Substrate sein. Dies wurde in einem Spalttest mit Hilfe der hAgo2 Mutanten hAgo2-PAZ9 und hAgo2-Mid3 überprüft. Beide hAgo2 Mutanten sind auf Grund ihrer verminderten Fähigkeit, korrekt an siRNA-Substrate zu binden, spaltungsdefizient (siehe Abschnitt 4.2.1).



**Abbildung 4.82.: Der Effekt von dsRNA-bindenden Proteinen auf die RNA Spaltung von bindingsdefizienten hAgo2 Mutanten.** Beide Experimente wurden ohne Zusatz von dsRBPs (leere Kreise), in Anwesenheit von 3  $\mu$ M hTRBP (gefüllte Kreise), hTRBP-D12 (leere Quadrate) (nur A) oder hPACT (gefüllte Quadrate) durchgeführt. In beiden Fällen wurde der Standard Spalttest ausgeführt. Dazu wurden 2,5  $\mu$ M hAgo2-PAZ9 (A) oder hAgo2-Mid3 (B) in An- oder Abwesenheit der dsRNA-bindenden Proteine mit 30 nM radioaktiv markierter *passenger* RNA gemischt. Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen, über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Autoradiographie visualisiert. Die relativen Umsätze wurden gegen die Zeit aufgetragen und mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ausgewertet. Die ermittelten Ratenkonstanten sind in Tabelle 4.23 aufgelistet.

Es wurde wieder der Standard Spalttest zur Überprüfung der *passenger* Spaltung durchgeführt. An Stelle des Wildtyp hAgo2 Proteins wurden die mutierten Varianten eingesetzt und ihre Spaltaktivität in An- und Abwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen getestet. Es stellte sich heraus, dass in Anwesenheit der dsRNA-bindenden Proteine die Spaltaktivität der mutierten hAgo2 Proteine vollständig wieder hergestellt werden konnte (siehe Abbildung 4.82). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass hTRBP und hPACT die Bindung von hAgo2 an die doppel-

#### 4. Ergebnisse

strängigen Substrate stabilisieren. Die bestimmten Ratenkonstanten und Amplituden stimmen gut mit den für Wildtyp hAgo2 bestimmten Werten überein. Einzig hAgo2-Mid3 in Gegenwart von hPACT zeigte durch Aggregationsprobleme eine fehlerhaft hohe Amplitude (siehe Tabelle 4.23).

Die Rekonstitution der Spaltaktivität der bindingsdefizienten hAgo2 Mutanten durch hTRBP und hPACT weist stark darauf hin, dass die dsRNA-bindenden Proteine dabei assistieren, die siRNA in der richtigen Position zu fixieren. Dabei ist es offenbar unerheblich, ob die Bindung im Bereich des C-terminalen oder des N-terminalen Lappens von hAgo2 gestört ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen eines aus TRBP, Dicer und Ago2 rekonstruierten RLC ermöglichten 2009 erste Einblicke in die Struktur des RLC. Die Gruppe um Doudna und Nogales vermutete damals, dass hTRBP auf Grund seiner hohen Flexibilität die PAZ Domäne von hAgo2 erreichen und dort bei der optimalen Orientierung der siRNA assistieren könnte<sup>(48)</sup>. Die hier gezeigten Experimente belegen allerdings, dass sich die hTRBP-assistierte Positionierung der siRNA zum Einen nicht nur auf die PAZ Domäne beschränkt und zum Anderen hTRBP offenbar wie eine Art Klammer die siRNA in hAgo2 fixiert, auch wenn dieses auf Grund von Mutationen nicht in der Lage ist, die siRNA autark zu binden.

**Tabelle 4.23.: Ratenkonstanten und Amplituden der durch Mutanten des hAgo2 Proteins vermittelten RNA Spaltung in Anwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen.**  $k_S = k_{\text{Spaltung}}$ ; A = Amplitude. Graphen siehe Abbildung 4.82.

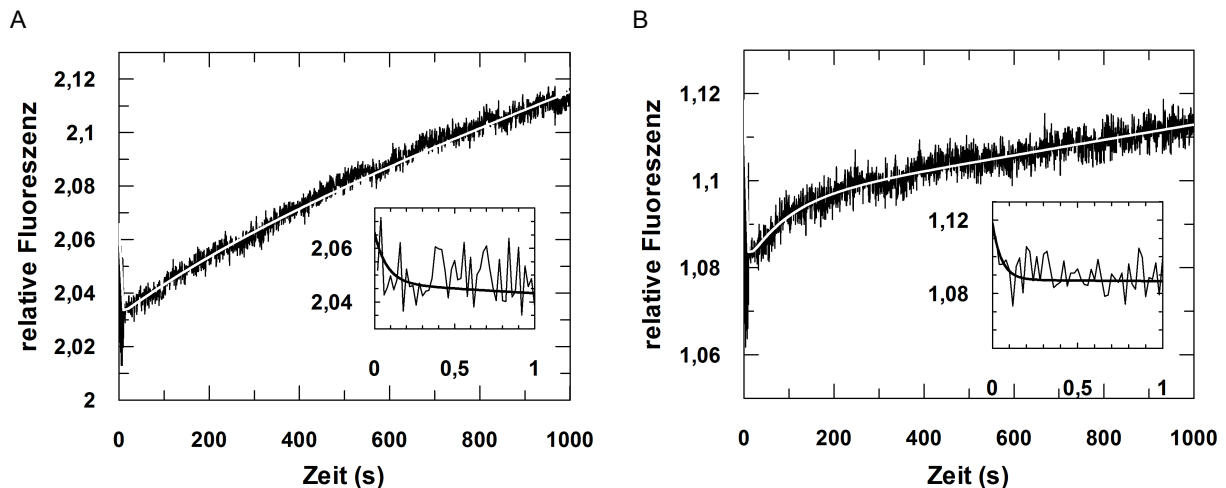
	ohne dsRBP	mit hTRBP	mit hTRBP-D12	mit hPACT
<b>hAgo2-PAZ9</b>				
$k_S$ ( $s^{-1}$ )	—	$0,0003 \pm 3 \times 10^{-5}$	$0,003 \pm 0,0003$	$0,0002 \pm 4 \times 10^{-5}$
A (%)	0	$79,4 \pm 2,0$	$83,2 \pm 0,9$	$101,5 \pm 8,5$
<b>hAgo2-Mid3</b>				
$k_S$ ( $s^{-1}$ )	—	$0,0003 \pm 2 \times 10^{-5}$	n.b.	$0,0001 \pm 1 \times 10^{-5}$
A (%)	0	$94,5 \pm 2,4$	n.b.	$180,2 \pm 33,1$

#### 4.4.3. Untersuchung des Einflusses von hTRBP und hPACT auf die Bindung von RNAs durch hAgo2

Auf Grund der durchgeführten Spaltexperimente konnte postuliert werden, dass die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT eine entscheidende Rolle in der Positionierung und Fixierung der siRNA im hAgo2 Protein spielen. Dies führt zu einer effizienteren Spaltung von *passenger* und *target* RNAs. Neben einer Erhöhung der Effizienz konnte mit einer hTRBP Mutante auch eine Erhöhung der Spaltgeschwindigkeit mit kurzer *target* RNA beobachtet werden. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass unter *multiple turnover* Bedingungen mit kurzer *target* RNA die Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend ist, wurde vermutet, dass hTRBP und hPACT auch einen Einfluss auf die Freisetzung der Spaltprodukte haben könnten. In den folgenden Abschnitten soll daher die Bildung binärer Komplexe in Anwesenheit der dsRNA-bindenden Proteine untersucht werden. Außerdem wird der Effekt dieser Proteine auf die Dissoziation von Spaltprodukten analysiert.

#### 4.4.3.1. Analyse des Effekts der dsRNA-bindenden Proteine auf die Bildung binärer Komplexe aus hAgo2 und siRNA

Untersuchungen der Bildung binärer Komplexe in Abwesenheit von hTRBP und hPACT ergaben, dass die siRNA in einem dreiphasigen Prozess an hAgo2 gebunden wird (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Diese Experimente wurden in Anwesenheit von hTRBP und hPACT mit Hilfe der *stopped flow* Methode (siehe Abschnitt 3.3.6) wiederholt. Dazu wurde die FAM-markierte siRNA mit hTRBP oder hPACT präinkubiert und dann schnell mit hAgo2 gemischt. In beiden Fällen ließen sich die Daten am besten mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung auswerten.



**Abbildung 4.83.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe in Anwesenheit von hTRBP und hPACT.** Typische Graphen sind gezeigt. Die Inserts zeigen jeweils die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 600 nM hTRBP (A) bzw. hPACT (B) wurden mit 20 nM si2b<sup>FAM</sup> präinkubiert und dann schnell mit 400 nM (A) bzw. 600 nM (B) hAgo2 gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und folgende Ratenkonstanten ermittelt: (A)  $k_1 = 12,9 \pm 2,0 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,3 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,003 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  (B)  $k_1 = 18,6 \pm 3,5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,13 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,01 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ .

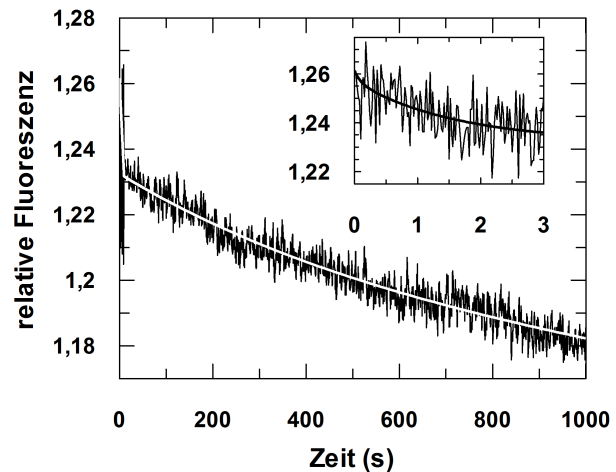
Die erste Ratenkonstante ist sehr schnell und abhängig von der hAgo2 Konzentration. Die Auswertung der linearen Abhängigkeit der beobachteten ersten Ratenkonstante von der Konzentration ergab für die Assoziation binärer Komplexe in Anwesenheit von hTRBP eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und in Anwesenheit von hPACT  $k_1 = 0,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Daten nicht gezeigt). Die Ratenkonstante  $k_2$ , welche der Assoziation des *guide* Strang 5'-Endes mit der Mid Domäne entspricht, ist im Rahmen eines gewissen Fehlers, der durch das niedrige Signal-Rausch-Verhältnis verursacht wird, vergleichbar mit der Assoziation binärer Komplexe in Abwesenheit der dsRNA-bindenden Proteine. Die Ratenkonstante  $k_3$ , welche die Bindung des *guide* Strang 3'-Endes an die PAZ Domäne repräsentiert, ist insbesondere mit hTRBP langsamer als in Abwesenheit der dsRNA-bindenden Proteine. In Anwesenheit von hTRBP ist die Phase um Faktor 8 verlangsamt (siehe Tabelle 4.24).

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der hTRBP Mutante hTRBP-D12 auf die Assoziation von binären Komplexen analysiert, um zu untersuchen, ob die dsRNA-bindenden Domänen ausreichen, um die dritte Phase der Assoziation zu verändern. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie mit hTRBP. Die erste Phase ist wieder sehr schnell und abhängig von der

#### 4. Ergebnisse

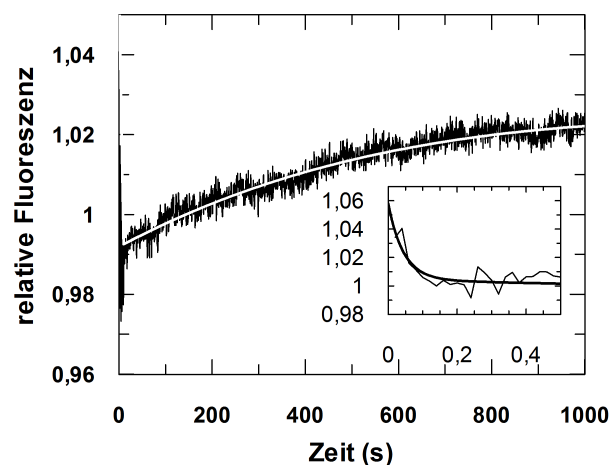
hAgo2 Konzentration. Die lineare Auswertung ergibt eine Ratenkonstante  $k_1 = 0,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie mit hTRBP ist kaum eine Abweichung von der zweiten Ratenkonstante  $k_2$  in Abwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen zu beobachten. Die dritte Phase ist ebenfalls wie mit hTRBP im Vergleich zur Assoziation binärer Komplexe stark verlangsamt (siehe Tabelle 4.24). Die Bindung von hTRBP an hAgo2 oder die siRNA scheint die PAZ Assoziation zu verzögern. Mit hPACT konnte dies nicht beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass hTRBP und hPACT an unterschiedlichen Positionen an den binären Komplex binden.

**Abbildung 4.84: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe in Anwesenheit von hTRBP-D12.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 600 nM hTRBP-D12 wurden mit 20 nM si2b<sup>FAM</sup> präinkubiert und dann schnell mit 600 nM hAgo2 gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und folgende Ratenkonstanten ermittelt:  $k_1 = 10,1 \pm 4,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,6 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,002 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$



Die Spaltexperimente mit hAgo2 Mutanten, die auf Grund ihrer gestörten Bindung an siRNAs spaltungsdefizient sind, zeigten, dass die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT die Spaltaktivität der Proteine wiederherstellen (siehe Abschnitt 4.4.2). Hier wird beispielhaft die Situation mit hAgo2-PAZ9 erläutert. In Abwesenheit von hTRBP und hPACT ist die Assoziation binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 im Gegensatz zum Wildtyp hAgo2 ein biphasischer Prozess (siehe Abbildung 4.85). Dabei wird eine schnelle konzentrationsabhängige Phase detektiert,

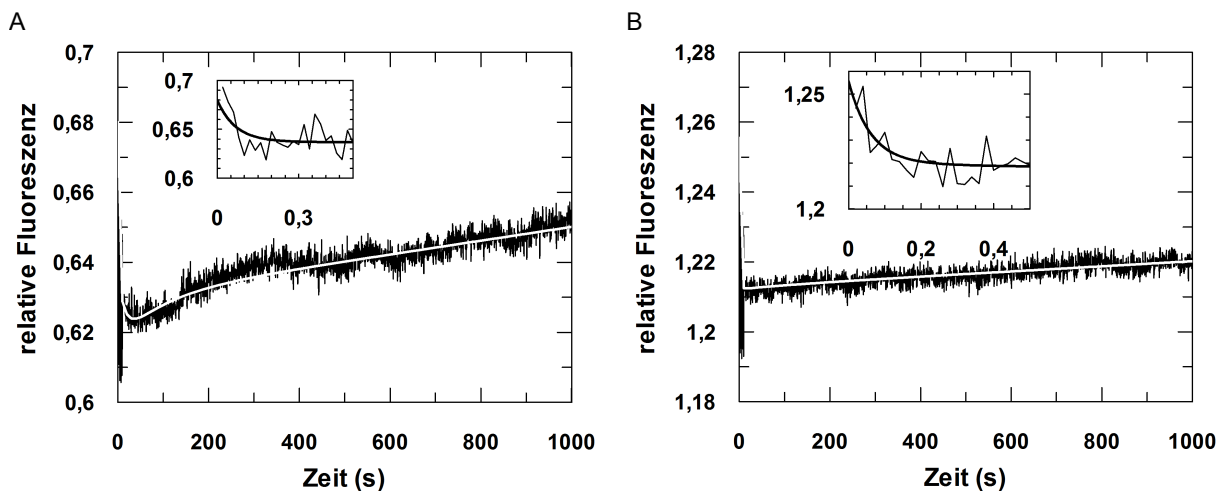
**Abbildung 4.85: Pre-steady state Assoziationskinetik von hAgo2-PAZ9 und siRNA.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert zeigt die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 600 nM hAgo2-PAZ9 wurden schnell mit 20 nM si2b<sup>FAM</sup> gemischt. Die Daten wurden dreifach exponentiell ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 22,7 \pm 3,1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,5 \pm 0,07 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,001 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$



gefolgt von einer langsameren nicht konzentrationsabhängigen Phase. Die zweite Phase ist vergleichbar mit der mit dem Wildtyp hAgo2 bestimmten zweiten Phase und entspricht somit vermutlich der Verankerung des *guide* Strang 5'-Ende in der Mid Bindungstasche. Es war auch eine dritte Phase detektierbar, die jedoch eine um eine Log-Stufe langsamere Ratenkonstante

aufwies als die korrespondierende Phase mit Wildtyp hAgo2. Diese Phase repräsentiert vermutlich die unspezifische Assoziation des *guide* Stranges mit der basischen Oberfläche des Proteins und nicht die Assoziation des 3'-Endes der *guide* RNA mit der PAZ Domäne und wird daher nicht der binären Komplexbildung zugeordnet.

In Anwesenheit von hTRBP und hPACT kann der dreiphasige Prozess der binären Komplexbildung mit hAgo2-PAZ9 wiederhergestellt werden. Dazu wurden hTRBP bzw. hPACT mit FAM-markierter siRNA präinkubiert und dann schnell mit hAgo2-PAZ gemischt. Die erhaltenen Daten konnten mit einer dreifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet werden. Die dadurch ermittelten Ratenkonstanten sind in einer ähnlichen Größenordnung wie die Ratenkonstanten, die mit Wildtyp hAgo2 ermittelt werden konnten (siehe Tabelle 4.24). Dabei ist



**Abbildung 4.86.: Pre-steady state Assoziationskinetik binärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 in Anwesenheit von hTRBP und hPACT.** Typische Graphen sind gezeigt. Die Inserts zeigen jeweils die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. 600 nM hTRBP (A) bzw. hPACT (B) wurden mit 20 nM si2b<sup>FAM</sup> präinkubiert und dann schnell mit 600 nM hAgo2 gemischt. Die Daten wurden mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung ausgewertet und folgende Ratenkonstanten ermittelt: (A)  $k_1 = 14,9 \pm 2,7 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,07 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,01 \pm 0,0009 \text{ s}^{-1}$  (B)  $k_1 = 16,2 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,4 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,007 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ .

auffällig, dass die Ratenkonstante  $k_3$  im Gegensatz zur Bildung binärer Komplexe mit Wildtyp hAgo2 in Anwesenheit von hTRBP etwas schneller ist. Da das Signal-Rausch-Verhältnis nicht optimal ist, sollte die Beobachtung jedoch mit Vorsicht behandelt werden. Die zweite Phase ist mit hTRBP und hAgo2-PAZ9 relativ langsam. Die Abweichung von der korrespondierenden Ratenkonstante mit hTRBP und Wildtyp hAgo2 ist allerdings nur ein Faktor 2. Dieses könnte ebenfalls auf das schlechte Signal-Rausch Verhältnis der Messung zurückzuführen sein (siehe Abbildung 4.86 A). Im Vergleich zur in Abwesenheit von hTRBP bestimmten Ratenkonstante  $k_2$  mit hAgo2 und hAgo2-PAZ9 ist jedoch eine Abweichung um Faktor 5 - 7 zu erkennen (siehe Tabelle 4.24). Möglicherweise gibt diese Abweichung Hinweise auf die Positionierung von hTRBP im binären Komplex.

Zusammen mit den Spaltexperimenten mit hAgo2 in Anwesenheit von hTRBP und hPACT kann postuliert werden, dass hTRBP und hPACT bei der Bindung von siRNA an hAgo2 nicht nur assistieren, sondern die siRNA wie eine Klammer auch an einem partiell bindungsdefizienten hAgo2 in Position halten.



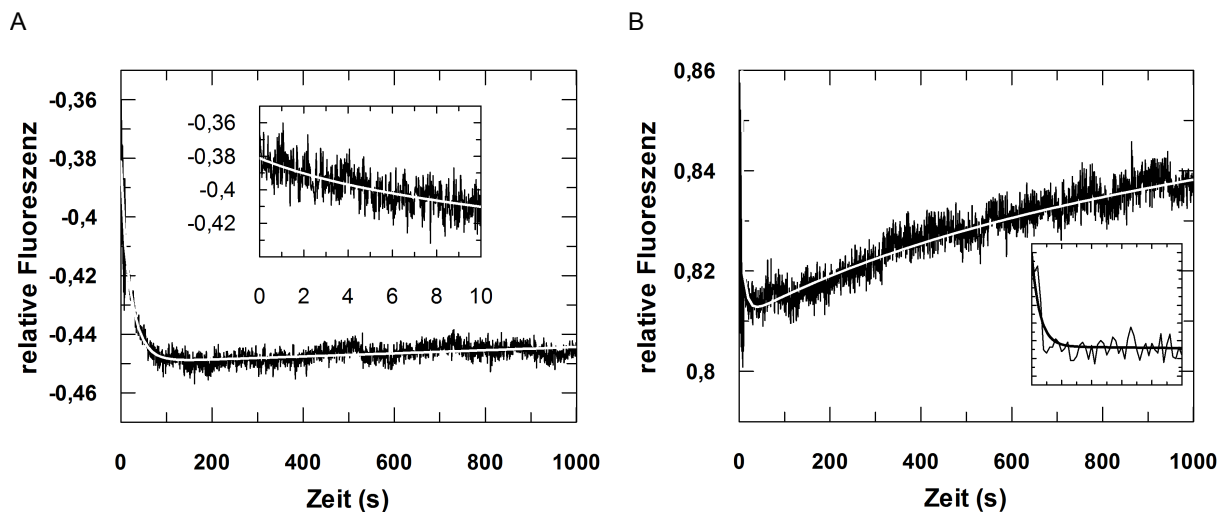
#### 4. Ergebnisse

**Tabelle 4.24: Zusammenfassung der *pre-steady state* Ratenkonstanten der Assoziation binärer Komplexe mit hAgo2 und hAgo2-PAZ9 in Anwesenheit von hTRBP bzw. hPACT.** n.b. = nicht bestimmt. \* = Ratenkonstanten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg bestimmt<sup>(218)</sup>.

	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )
hAgo2*	$1 \times 10^8$	0,48	0,03
hAgo2 mit hTRBP	$0,2 \times 10^8$	0,15	0,004
hAgo2 mit hTRBP-D12	$0,3 \times 10^8$	0,4	0,002
hAgo2 mit hPACT	$0,5 \times 10^8$	0,12	0,008
hAgo2-PAZ9	$0,2 \times 10^8$	0,36	—
hAgo2-PAZ9 mit hTRBP	n.b.	0,07	0,01
hAgo2-PAZ9 mit hPACT	n.b.	0,38	0,007

#### 4.4.3.2. Analyse der Dissoziation ternärer Komplexe in Gegenwart dsRNA-bindender Proteine

Im Rahmen der Spaltexperimente wurde neben einer erhöhten Effizienz der hAgo2-vermittelten Spaltung mit hTRBP-D12 auch eine Beschleunigung der Spaltung mit kurzer *target* RNA beobachtet (siehe Abschnitt 4.4.2). Diese Beobachtung gibt Hinweise darauf, dass hTRBP und hPACT nicht nur einen Einfluss auf die Bindung von siRNAs an hAgo2 haben, sondern auch an der Dissoziation der Spaltprodukte beteiligt sind. Um dies genauer zu überprüfen, wurden *pre-steady state* Dissoziationsexperimente mit hAgo2 in Anwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen durchgeführt.



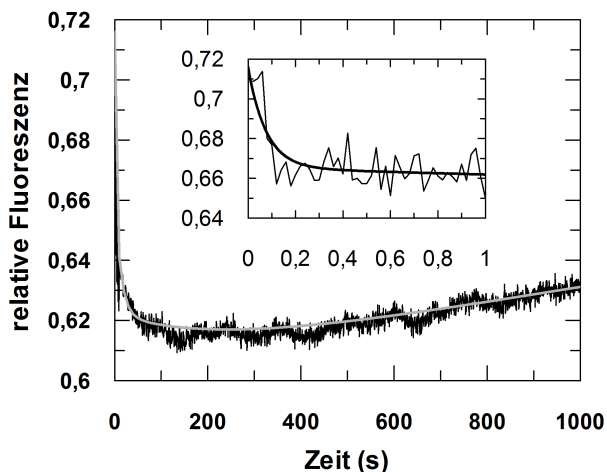
**Abbildung 4.87.: *Pre-steady state* Dissoziationskinetik ternärer Komplexe in Anwesenheit von hTRBP und hTRBP-D12.** Typische Graphen sind dargestellt. Das Insert zeigt die Reaktion auf einer kürzeren Zeitskala. Ternäre Komplexe wurden aus 500 nM hAgo2, 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) und 40 nM *target* RNA (s2b) präassembliert. Diese wurden schnell mit 2  $\mu$ M unmarkierter *guide* RNA und 500 nM hTRBP (A) bzw. hTRBP-D12 (B) gemischt. Die Daten wurden dreifach exponentiell mathematisch ausgewertet und ergaben folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 0,3 \pm 0,06 s^{-1}$ ,  $k_2 = 0,04 \pm 0,001 s^{-1}$  und  $k_3 = 0,0002 \pm 8 \times 10^{-5} s^{-1}$  (B)  $k_1 = 18,4 \pm 1,2 s^{-1}$ ,  $k_2 = 0,1 \pm 0,007 s^{-1}$  und  $k_3 = 0,002 \pm 0,0005 s^{-1}$ .

Dazu wurden binäre Komplexe aus hAgo2 und FAM-markierter *guide* RNA mit *target* RNA präassembliert. Diese ternären Komplexe wurden schnell mit einem der dsRNA-bindenden Proteine und einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA gemischt. Im Fall von hTRBP ist zu erkennen, dass die geschwindigkeitsbestimmende Ratenkonstante  $k_3$ , welche die Dis-



soziation im 3'-Bereich der *guide* RNA repräsentiert, unverändert bleibt (siehe Abbildung 4.87 A und Tabelle 4.25). Die Ratenkonstante  $k_{-2}$  dagegen, die zur Entwindung der *guide-target* Basenpaarung im 5'-Bereich des *guide* Stranges korrespondiert, ist um Faktor 20 beschleunigt. Mit hTRBP-D12 ist ebenfalls eine Beschleunigung der Ratenkonstante  $k_{-2}$  festzustellen. Allerdings ist die Ratenkonstante nicht nur um Faktor 20, sondern um Faktor 50 beschleunigt (siehe Abbildung 4.87 B und Tabelle 4.25).

Sowohl hTRBP als auch hTRBP-D12 scheinen also die Dissoziation des *target* Strangs in der 5'-Region der *guide* RNA substantiell zu beschleunigen. Im Gegensatz zu hTRBP hat hTRBP-D12 diesen Effekt auch auf die Dissoziation der *target* RNA im 3'-Bereich der *guide* RNA. Die in Gegenwart von hTRBP-D12 bestimmte Ratenkonstante  $k_{-3}$  ist im Vergleich zur Dissoziation ternärer Komplexe in Abwesenheit dsRNA-bindender Proteine um eine Logstufe beschleunigt (siehe Tabelle 4.25). Dies erklärt die in Abschnitt 4.4.2 beobachtete beschleunigte Ratenkonstante  $k_{\text{Spaltung}}$  in Gegenwart von hTRBP-D12 mit kurzer *target* RNA unter *multiple turnover* Bedingungen. Weiterhin gibt die Analyse der Ratenkonstanten der Dissoziation ternärer Komplexe Hinweise auf die Bindungsstellen von hTRBP und hTRBP-D12 im ternären Komplex. Im Rahmen der Spaltexperimente konnte gezeigt werden, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die dsRBD1 ursächlich an der Beschleunigung der Spaltproduktdissoziation beteiligt ist (siehe Abschnitt 4.4.2). Da hTRBP nur die Dissoziation im 5'-Bereich beschleunigt, ist zu vermuten, dass die dsRBD1 im C-terminalen Bereich von hAgo2 gebunden wird. Die hTRBP Mutante hTRBP-D12 scheint die dsRBD1 dagegen auch im N-terminalen Bereich von hAgo2 positionieren zu können. Dies gibt Hinweise darauf, dass die dsRBD3 einen wichtigen Faktor für die Positionierung von hTRBP im hAgo2-siRNA Komplex darstellt.



**Abbildung 4.88: Pre-steady state Dissoziationskinetik ternärer Komplexe mit langer *target* RNA in Anwesenheit von hTRBP-D12.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Inset präsentiert die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. Ternäre Komplexe wurden aus 500 nM hAgo2, 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) und 40 nM *target* RNA (ICAM IVT) präassembliert. Diese wurden schnell mit 2  $\mu$ M unmarkierter *guide* RNA und 500 nM hTRBP-D12 gemischt. Die Auswertung mit einer dreifach exponentiellen Gleichung ergab folgende Ratenkonstanten:  $k_1 = 13,1 \pm 1,1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,1 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$  und  $k_3 = 0,005 \pm 8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Die in Abschnitt 4.4.2 beobachtete beschleunigte Ratenkonstante  $k_{\text{Spaltung}}$  in Anwesenheit von hTRBP-D12 konnte nur mit kurzer, nicht aber mit langer *target* RNA detektiert werden. Zuvor konnte gezeigt werden, dass mit langer *target* RNA die Spaltrate nicht durch die Dissoziation, sondern durch die Assoziation der *target* RNA an binäre hAgo2-*guide* RNA Komplexe limitiert wird. Somit ist es also möglich, dass hTRBP-D12 die beschleunigende Wirkung auch auf ternäre Komplexe mit langer *target* RNA hat. Um dies zu überprüfen, wurden ternäre Komplexe mit langer *target* RNA präassembliert und schnell mit hTRBP-D12 und einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA gemischt (siehe Abbildung 4.88). Die Daten wurden mit

#### 4. Ergebnisse

Hilfe einer dreifach exponentiellen Gleichung mathematisch ausgewertet. Die Ratenkonstanten zeigen im Vergleich zur Dissoziation ternärer Komplexe in Abwesenheit von hTRBP-D12, dass hTRBP-D12 auch die Dissoziation langer *target* RNAs beschleunigt (siehe Tabelle 4.25). Dabei sind die Ratenkonstanten  $k_{-2}$  und  $k_{-3}$  nahezu identisch mit denen, die für kurze *target* RNAs in Anwesenheit von hTRBP-D12 bestimmt wurden. Der hTRBP-D12 vermittelte Effekt auf die Dissoziation ternärer Komplexe scheint also unabhängig von der Länge der *target* RNA zu sein.

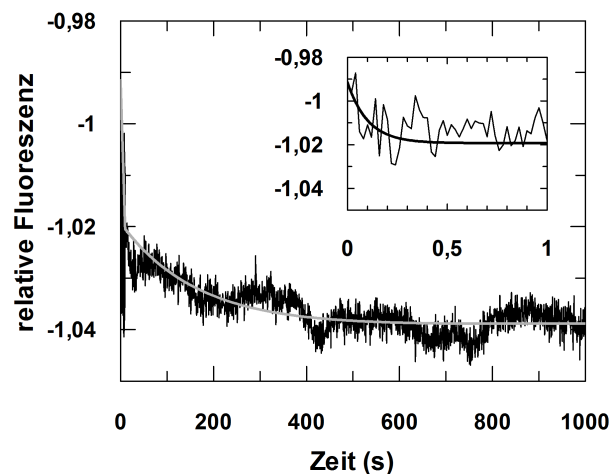
**Tabelle 4.25: Zusammenfassung der pre-steady state Ratenkonstanten der Dissoziation ternärer Komplexe in Anwesenheit von hTRBP bzw. hTRBP-D12.**

\* = siehe Abschnitt 4.2.1.2. # = siehe Abschnitt 4.2.4.1.

	$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{-2}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{-3}$ (s <sup>-1</sup> )
<b>kurze target RNA</b>			
ohne dsRBPs*	2,0	0,002	0,0002
mit hTRBP	0,3	0,04	0,0002
mit hTRBP-D12	18,4	0,1	0,002
<b>lange target RNA</b>			
ohne dsRBPs#	0,6	0,01	0,002
mit hTRBP-D12	13,1	0,1	0,005

Nachdem für hTRBP und hTRBP-D12 gezeigt werden konnte, dass die Dissoziation ternärer Komplexe durch dsRNA-bindende Proteine beschleunigt werden kann, sollte überprüft werden, ob hPACT diesen Effekt ebenfalls zeigt. Dazu wurden wieder ternäre Komplexe mit kurzer *tar-*

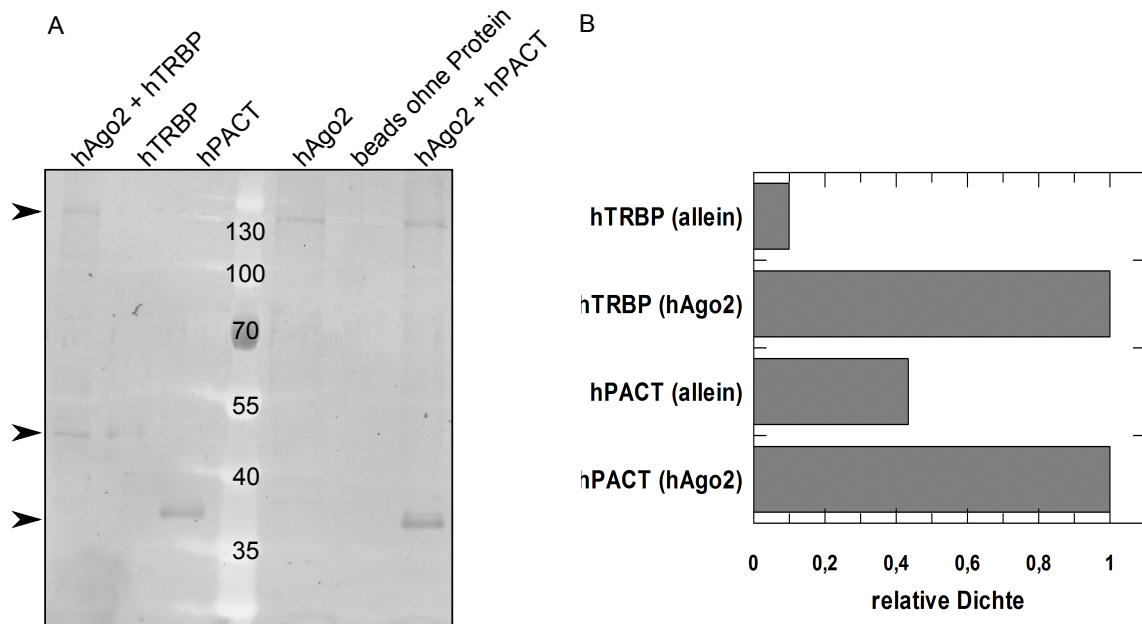
**Abbildung 4.89: Pre-steady state Dissoziationskinetik ternärer Komplexe in Anwesenheit von hPACT.** Ein typischer Graph ist gezeigt. Das Insert präsentiert die Reaktion mit einer kürzeren Zeitskala. Ternäre Komplexe wurden aus 500 nM hAgo2, 20 nM *guide* RNA (as2b<sup>FAM</sup>) und 40 nM *target* RNA (s2b) präassembliert. Diese wurden schnell mit 2 μM unmarkierter *guide* RNA und 500 nM hPACT gemischt. Die Auswertung mit einer zweifach exponentiellen Gleichung ergab folgende Ratenkonstanten:  $k_{-1} = 9,8 \pm 2,7$  s<sup>-1</sup> und  $k_{-2} = 0,006 \pm 0,0004$  s<sup>-1</sup>.



*get* RNA präassembliert und schnell mit hPACT und einem Überschuss an unmarkierter *guide* RNA gemischt. Die Daten wurden mathematisch am Besten durch eine zweifach exponentielle Gleichung beschrieben. Dabei wurde eine Ratenkonstante  $k_{-1} = 9,8$  s<sup>-1</sup> und  $k_{-2} = 0,006$  s<sup>-1</sup> ermittelt. Weiterhin fällt das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis der Messung auf (siehe Abbildung 4.89). Offenbar stört hPACT die Dissoziation ternärer Komplexe. Die Homologie zwischen den dsRBDs von hTRBP und hPACT ist sehr groß. Da hPACT jedoch keinen beschleunigenden Effekt auf die Freisetzung der Spaltprodukte hat, ist davon auszugehen, dass die Linkerregionen, welche sich zwischen hTRBP und hPACT stark unterscheiden, involviert sind.

#### 4.4.4. Charakterisierung der Komplexe aus hAgo2, siRNA und dsRNA-bindenden Proteinen

An Hand der vorhergehenden Untersuchungen wird klar, dass hTRBP und hPACT eine wichtige Rolle für die Bindung der siRNA und die Spaltproduktfreisetzung aus dem ternären Komplex spielen. Um ihre Funktionen ausführen zu können, ist eine Assoziation von hTRBP bzw. hPACT mit dem hAgo2-siRNA Komplex notwendig. Die sich bildenden Komplexe aus hAgo2, siRNA und dsRNA-bindenden Proteinen werden in diesem Abschnitt näher charakterisiert.

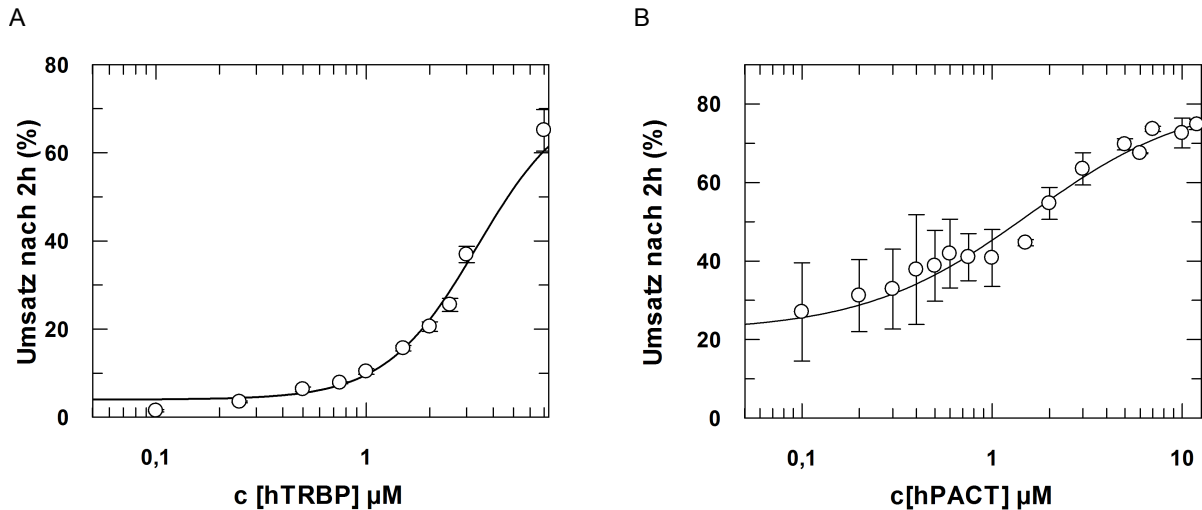


**Abbildung 4.90.: Pull down Experiment als Nachweis der Komplexbildung zwischen hAgo2 und hTRBP bzw. hPACT.** (A) 8 % SDS-PAGE, Färbung mit Sypro Ruby. Gleiche Mengen GST-hAgo2 wurden mit hTRBP oder hPACT mit GST High Performance Sepharose *beads* inkubiert. Zur Kontrolle wurden gleiche Mengen hTRBP bzw. hPACT in Abwesenheit von hAgo2 mit den *beads* inkubiert. (B) Dichteauswertung der hTRBP bzw. hPACT Banden in Abwesenheit von hAgo2. Es wurde jeweils die Dichte von hTRBP bzw. hPACT in Abwesenheit in Relation zur Dichte in Anwesenheit von hAgo2 gesetzt.

Mit Hilfe eines *pull down* Experiments konnte nachgewiesen werden, dass hTRBP bzw. hPACT auch in Abwesenheit von siRNA mit hAgo2 interagieren können (siehe Abbildung 4.90). Kontrollen zeigen, dass nicht etwa eine unspezifische Assoziation der Proteine mit den *beads* stattfindet, sondern hTRBP und hPACT spezifisch an hAgo2 binden können (siehe Abbildung 4.90 B).

Um diese Interaktion genauer zu untersuchen, wurden Spaltexperimente durchgeführt, bei denen hTRBP bzw. hPACT in aufsteigenden Konzentrationen zugesetzt wurden. Die relativen Umsätze nach 2 h wurden gegen die jeweilige Konzentration des dsRNA-bindenden Proteins aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe der Hill Gleichung mathematisch ausgewertet. Dadurch ergab sich für die Assoziation von hTRBP an hAgo2-siRNA Komplexe eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 3,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$ . Im analogen Versuch mit hPACT ergab sich eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$  (siehe Abbildung 4.91). Damit liegen die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für beide Komplexe in einer ähnlichen Größenordnung.

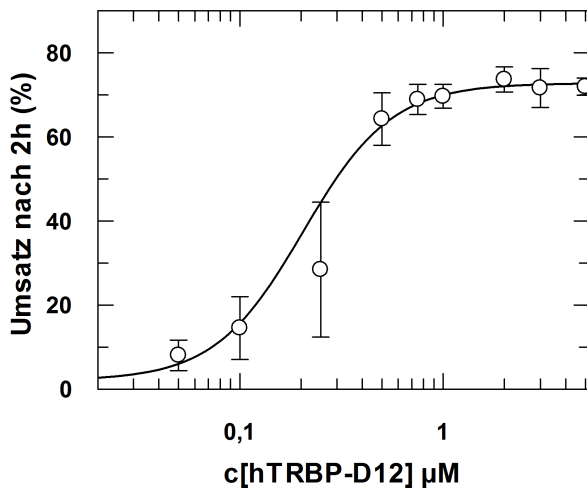
#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.91.: hAgo2-vermittelte Spaltung von RNA in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von hTRBP und hPACT.** 3 µM hAgo2 wurden mit aufsteigenden Konzentrationen hTRBP (A) bzw. hPACT (B) präinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von siRNA mit  $^{32}\text{P}$  markierter *passenger* RNA gestartet. Proben wurden nach 2 h entnommen, über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Die relativen Umsätze nach 2 h wurden zusammen mit der Standardabweichung gegen die hTRBP (A) bzw. hPACT (B) Konzentration aufgetragen und mit Hilfe der Hill Gleichung mathematisch ausgewertet. Die dargestellten Werte sind aus drei verschiedenen Messungen gemittelt. (A) Es ergab sich bei einem Hill Koeffizienten von 2 mit hTRBP  $K_D = 3,4 \pm 0,9$  µM. (B) Bei einem Hill Koeffizienten von 1 wurde ein  $K_D = 1,6 \pm 0,2$  µM mit hPACT ermittelt.

Trotz ihrer ähnlichen Affinität unterscheiden sich die Komplexe in einem wichtigen Punkt. Die Art der Bindung und die Stöchiometrie der sich bildenden Komplexe aus dsRNA-bindenden Proteinen, hAgo2 und siRNA ist verschieden. Die mit hTRBP erhaltenen Daten wurden mit Hilfe eines Hill Koeffizienten von 2 ausgewertet, während dieser mit hPACT nur 1 betrug. Dies gibt Rückschlüsse darauf, dass hTRBP positiv kooperativ an den hAgo2-siRNA Komplex bindet, während die Bindung von hPACT keine Charakteristika einer kooperativen Bindung zeigt. Dieses Resultat indiziert, dass für hTRBP mehrere Bindungsstellen im hAgo2-siRNA Komplex existieren, die sich gegenseitig beeinflussen. Ist das erste hTRBP-Molekül an den Komplex gebunden, so wird die Bindung weiterer hTRBP Moleküle erleichtert. Existieren dagegen für hPACT mehrere Bindungsstellen, so beeinflussen diese sich gegenseitig nicht. Wie allerdings in vorhergehenden Experimenten gezeigt wurde, spielt die Nukleinsäure für den Effekt der dsRNA-bindenden Proteine eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 4.80). Dies impliziert, dass neben der Bindung an hAgo2 eine Assoziation mit der Nukleinsäure eine wichtige Rolle spielt. Bindungsexperimente konnten diese Vermutung erhärten, da diese zeigten, dass hTRBP und hPACT die Bindung der siRNA an bindingsdefiziente hAgo2 Proteine wiederherstellen können (siehe Abschnitt 4.4.3.1). Somit wird vermutet, dass sich der Ort der Wechselwirkung zwischen hTRBP bzw. hPACT im Bereich der Interaktion zwischen hAgo2 und der siRNA befindet. Auf Grund der geringen Größe der möglichen Interaktionsfläche ist eine Interaktion mehrerer hPACT Moleküle mit einem hAgo2-siRNA Komplex ohne gegenseitige Beeinflussung relativ unwahrscheinlich.

In vorhergehenden Experimente wurde eine Mutante des hTRBP Proteins verwendet, der die dsRBD3 fehlt (hTRBP-D12). Es konnte gezeigt werden, dass die dsRBD3 eine wichtige



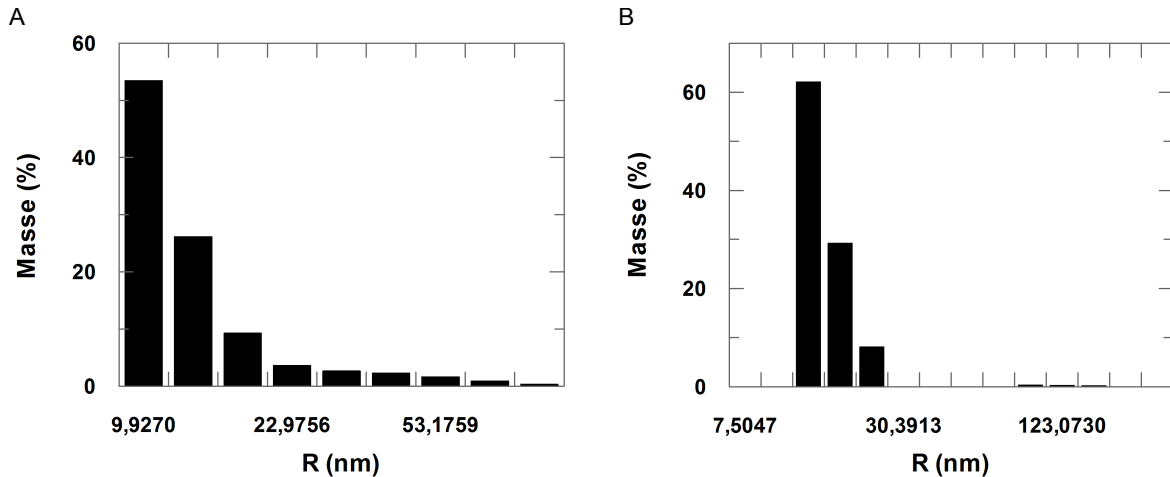
**Abbildung 4.92: hAgo2-vermittelte Spaltung von RNA in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von hTRBP-D12.** 3  $\mu\text{M}$  hAgo2 wurden mit aufsteigenden Konzentrationen hTRBP-D12 präinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von siRNA mit  $^{32}\text{P}$  markierter *passenger* RNA gestartet. Proben wurden nach 2 h entnommen, über 20 % denaturierende PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. Die relativen Umsätze nach 2 h wurden zusammen mit der Standardabweichung gegen die hTRBP-D12 Konzentration aufgetragen und mit Hilfe der Hill Gleichung mathematisch ausgewertet. Die dargestellten Werte sind aus drei verschiedenen Messungen gemittelt. Es ergab sich bei einem Hill Koeffizienten von zwei  $K_D = 0,3 \pm 0,03 \mu\text{M}$ .

Rolle für die Regulation des hTRBP vermittelten Effekts spielt. Daher wird hier auch die Komplexbildung mit hTRBP-D12 betrachtet. Das Spaltexperiment mit hTRBP-D12 wurde analog zu den Experimenten mit hTRBP und hPACT durchgeführt. Die Hill Gleichung beschreibt wie mit hTRBP die ermittelten Datenpunkte am Besten mit einem Hill Koeffizienten von 2. Offenbar bindet auch hTRBP-D12 auf positiv kooperative Weise an den hAgo2-siRNA Komplex. Allerdings ist die Affinität von hTRBP-D12 im Vergleich zu hTRBP für die hAgo2-siRNA Komplexe um Faktor 10 höher. Dies bekräftigt die Vermutung, dass die dsRBD3 eine regulierende Wirkung auf den hTRBP vermittelten Effekt hat. Weiterhin kann der Schluss gezogen werden, dass die kooperative Bindung an den hAgo2-siRNA Komplex über die dsRBD1 und dsRBD2 und die assoziierten Linker Regionen vermittelt wird. Dieses Ergebnis unterstreicht insbesondere die Bedeutung der Linker Domänen, da hTRBP und hPACT im Bereich der dsRBDs eine sehr hohe Homologie aufweisen. Die Linkerregionen von hTRBP und hPACT unterscheiden sich dagegen stark und könnten so der Grund dafür sein, dass die Bindungsmodi von hTRBP und hPACT an hAgo2-siRNA Komplexe differieren.

DLS Messungen mit hTRBP und hTRBP-D12 in Abwesenheit von hAgo2 konnten zeigen, dass hTRBP-D12 wesentlich größere Aggregate mit und ohne siRNA bildet als hTRBP (siehe Tabelle 4.21). Die Art der Bindung an siRNAs scheint sich also durch eine unterschiedliche Anordnung der dsRBD1 und dsRBD2 in Abwesenheit der dsRBD3 voneinander abzugrenzen. Weiterhin implizieren Messungen zur Dissoziation ternärer Komplexe in Anwesenheit von hTRBP oder hTRBP-D12 unterschiedliche Positionen der dsRBDs (siehe Abschnitt 4.4.3.2). Es wird vermutet, dass ein hTRBP-D12 Molekül an mehrere siRNA Moleküle gleichzeitig binden kann und so zu einer Vernetzung führt. Die Stöchiometrie der hAgo2-siRNA-hTRBP und hAgo2-siRNA-hTRBP-D12 scheint sich jedoch sehr ähnlich zu sein, wie an Hand der Spaltexperimente gezeigt werden konnte (siehe oben).

DLS Messungen der Komplexe aus hTRBP bzw. hTRBP-D12 und hAgo2-siRNA zeigen, dass sich die hydrodynamischen Radien der zwei Hauptpopulationen der verschiedenen Komplexe kaum unterscheiden. In Anwesenheit von hAgo2 dissoziieren die großen hTRBP-D12-siRNA- sowie hTRBP-siRNA-Aggregate, um mit hAgo2 und siRNA kleinere Komplexe zu bilden. Dies

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.93.: DLS Messungen ternärer Komplexe aus hAgo2, siRNA und hTRBP bzw. hTRBP-D12.** Komplexe aus 5  $\mu\text{M}$  hAgo2, 5  $\mu\text{M}$  hTRBP und 1  $\mu\text{M}$  siRNA (A) bzw. 3  $\mu\text{M}$  hAgo2, 3  $\mu\text{M}$  hTRBP-D12 und 0,4  $\mu\text{M}$  siRNA (B) wurden präassembliert und dann im DLS gemessen. Es ergaben sich hydrodynamische Radien  $R = 14,6 \text{ nM}$  (100 % Massenanteil) (A) und  $R = 119,9 \text{ nM}$  (0,7 % Massenanteil) (B). Dabei ergaben sich folgende Polydispersitäten  $\text{PD} = 70,2 \%$  (A) und  $\text{PD} = 19,7 \%$ , sowie  $\text{PD} = 22,3 \%$  (B).

bekräftigt die in den Spaltexperimenten getroffene Annahme, dass hTRBP und hTRBP-D12 trotz der unterschiedlichen Bindung an siRNAs in ähnlicher Stöchiometrie an hAgo2-siRNA Komplexe binden. Auch ist mit hTRBP-D12 in Anwesenheit von hAgo2 keine Vernetzung verschiedener Komplexe möglich. Dies lässt darauf schließen, dass hTRBP in einer anderen Konformation an siRNA als an hAgo2-siRNA Komplexe bindet. Dies liegt vermutlich daran, dass zum Einen Protein-Protein Interaktionen zwischen hAgo2 und hTRBP stattfinden und zum Anderen der Raum für Bindung an die siRNA durch die Bindung der siRNA an hAgo2 limitiert wird. Offenbar werden dadurch die dsRBD1 und die dsRBD2 beider Proteine in ähnlicher Art und Weise organisiert, was in Abwesenheit von hAgo2 nicht der Fall ist.

Auffällig ist, dass die Komplexe mit hTRBP mit 70 % eine relative hohe Polydispersität zeigen. 89 % der Komplexe sind kleiner als 17 nm, während die restlichen Komplexe mit abnehmender Anzahl Größen von 22 nm bis 93 nm aufweisen. Die Probe ist somit sehr inhomogen und eine Vielzahl größerer Komplexe ist erkennbar. Dies lässt auf eine erhöhte Aggregationsneigung der Komplexe mit hTRBP schließen. Die Polydispersität der Komplexe mit hTRBP-D12 liegt dagegen unter 20 %, was zeigt, dass die Probe monodispers ist und somit hauptsächlich Komplexe einer Population aufweist.



## 5. Diskussion

Die RNAi spielt in den verschiedensten Organismen eine wichtige Rolle für die Regulation der Genexpression und die Abwehr fremder genetischer Elemente. Obwohl sie erst 1998 durch C. Mello und A. Fire initial beschrieben wurde, kam es bereits 2006 zur Auszeichnung der beiden Wissenschaftler mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie. Dies unterstreicht die Bedeutung der RNAi für das Verständnis fundamentaler biologischer Prozesse.

Als Schlüssel-Enzym der RNAi wurde schon früh das Ago Protein identifiziert, welches an kleine regulatorische *guide* Stränge gebunden die Menge komplementärer *target* Stränge reguliert. Ago Proteine existieren in allen drei Domänen des Lebens und sind strukturell hoch konserviert. Die eukaryotischen Vertreter binden dabei RNA sowohl als *guide* als auch als *target* Substrat, während bei den prokaryotischen Ago Proteinen DNA und RNA möglich sind. Die *target* Substrate können sehr vielfältig sein und werden abhängig vom Ago Protein und je nach Grad der Komplementarität zum *guide* Strang entweder gespalten oder so gebunden, dass die Translation eines RNA *target* Substrates nicht mehr möglich ist. Die Bindung von Nucleinsäuren an Ago Proteine erfolgt sequenzunabhängig, sodass theoretisch jeder *target* Strang durch Ago Proteine reguliert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus des humanen Ago2 und des aus einem archaischen Organismus stammenden MjAgo besser zu verstehen. Obwohl bereits einige Studien zum Mechanismus von hAgo2 und MjAgo existieren, ist der genaue Ablauf wesentlicher Schritte der Ago-vermittelten Bindung und Spaltung von Nucleinsäuren unbekannt. Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit der biochemischen und kinetischen Charakterisierung des Ago-vermittelten *silencing* beschäftigen. Diese jedoch bilden neben den aus Röntgenkristallstrukturen gewonnenen Erkenntnissen die Grundlage für das Verständnis der Selektion und Bindung von *guide* Strängen durch hAgo2 als Basis für die Erkennung und Assoziation mit *target* Substraten.

Aufbauend auf der bereits vorhandenen initialen Charakterisierung der hAgo2-vermittelten Bindung von *guide* und *target* RNAs<sup>(218)</sup> wurde in dieser Arbeit eine genaue Zuordnung der kinetisch voneinander unterscheidbaren Prozesse zu strukturellen Transitionen im Rahmen der Bindung von *guide* und *target* RNA an hAgo2 vorgenommen. Diese Arbeit konnte somit entscheidend dazu beitragen, ein minimal mechanistisches Modell der siRNA-abhängigen hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung zu etablieren. In diesem Kontext wurden in einem weiteren Schritt Analysen mit MjAgo und DNA Substraten durchgeführt. Die vorliegende Promotionsarbeit zeigt erstmals eine vergleichende kinetische Analyse eines humanen und eines archaischen Ago Proteins. Darauf basierend wurden Erkenntnisse zur Bedeutung des 5'-Nucleotids in beiden Proteinen sowie der *guide* Sequenz für die Bildung binärer und ternärer Komplexe

gewonnen. Außerdem konnte der Einfluss des *target* Strangs in Abhängigkeit seiner Länge auf die Bildung ternärer Komplexe geklärt werden.

Das Modell bildete weiterhin die Grundlage, den Effekt von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Bindung von siRNA Substraten und die nachfolgende Spaltung der *target* RNA zu klären. Diese Untersuchungen wurden kombiniert mit Erkenntnissen zur Bindung der beiden dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT an siRNAs und geben so Aufschluss über die Art der Bindung von dsRNA-bindenden Proteinen an hAgo2-siRNA Komplexe.

### 5.1. Molekulare Mechanismen der *guide* Strang-abhängigen Ago-vermittelten *target* Strang Spaltung

#### 5.1.1. Die Assoziation des *guide* Strangs mit der Mid und der PAZ Domäne des Ago Proteins ist ein universelles Kennzeichen für die korrekte Positionierung des *guide* Strangs im binären Komplex

Um Sequenz-spezifisch komplementäre *target* Stränge zu binden und zu spalten, muss das Ago Protein zunächst einen *guide* Strang binden. Transientenkinetische Analysen der *guide* RNA Bindung im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg haben ergeben, dass es sich bei der Bildung binärer hAgo2-*guide* Komplexe um einen dreiphasigen Prozess handelt. Dabei wurde eine erste Phase identifiziert, die klar der Bildung von Kollisionskomplexen zuzuordnen ist. Die Bildung dieser Komplexe ist durch die Diffusion limitiert und somit von der Konzentration der Bindungspartner abhängig. Die Untersuchungen zeigten zusätzlich zwei weitere Phasen, welche spezifische Bindungsprozesse an hAgo2 repräsentieren. Es wurde an Hand der strukturellen Informationen aus Röntgenkristallstrukturen binärer TtAgo-*guide* Komplexe<sup>(166)</sup> vermutet, dass es sich bei diesen Phasen um die Verankerung des *guide* RNA 5'-Endes in der Mid Domäne, gefolgt von der Assoziation des 3'-Endes der *guide* RNA mit der PAZ Domäne handelt<sup>(218)</sup>. Die vorliegende Arbeit stellt transientenkinetische Untersuchungen mit mutierten hAgo2 Proteinen zur zweifelsfreien Zuordnung dieser zwei Phasen vor.

Röntgenkristallstrukturen verschiedener Ago Proteine bakteriellen und eukaryotischen Ursprungs zeigen, dass die Verankerung des 5'-Endes mit Hilfe der Phosphatgruppe in der Bindungstasche der Mid Domäne ein universelles Kennzeichen der Bindung des *guide* Stranges an Ago Proteine ist<sup>(123,140,144,151,163,166,223)</sup>. Weiterhin wird vermutet, dass die feste Verankerung des *guide* 5'-Endes eine Grundvoraussetzung für die exakte Positionierung der *guide* RNA im Protein darstellt<sup>(58)</sup>. Die Maskierung des 5'-Endes der *guide* RNA führt zu einem Verlust der *silencing* Aktivität<sup>(224,225)</sup>.

Das in dieser Arbeit verwendete hAgo2-Mid3 Protein ist nicht in der Lage, das 5'-Ende der *guide* RNA zu verankern, da essentielle Aminosäuren, die unter anderem auch an der Bindung des 5'-Phosphats beteiligt sind, fehlen. Die Bindung dieses mutierten hAgo2 Proteins an einen *guide* Strang wurde mit Hilfe einer kanonischen einzelsträngigen *guide* RNA untersucht, die, um eine Detektion der Bindung zu ermöglichen, eine Fluoreszenzmarkierung an Position 14 trug. Kanonische *guide* RNAs weisen eine Länge von 21 Nukleotiden auf<sup>(41)</sup> und tragen ein Phosphat an ihrem 5'-Ende<sup>(44)</sup>. Neben einer schnellen ersten Phase, die der Kollisions-



sionskomplexbildung zuzuordnen ist, wurde eine zweite Phase gemessen, die vermutlich der Assoziation mit der PAZ Domäne entspricht. Ursprünglich wurde erwartet, dass keine zweite Phase messbar sein würde, da keine Bindung an die Mid Domäne stattfinden kann, und vermutet wurde, dass das 3'-Ende der *guide* RNA nur dann an die PAZ Domäne bindet, wenn das 5'-Ende schon fest verankert ist. Eine Assoziation mit der PAZ Domäne ist jedoch nicht abhängig von der vorherigen Assoziation mit der Mid Domäne. Strukturelle Untersuchungen konnten zeigen, dass die Faltung der PAZ Domäne der sogenannten OB-Faltung ähnelt und so für die Assoziation mit Nukleinsäuren prädestiniert ist<sup>(145,159,160)</sup>. Desweiteren wurde die Bindung von Nukleinsäuren an isolierte PAZ Domänen nachgewiesen<sup>(158,160)</sup>, was die Vermutung unterstützt, dass für eine Bindung an die PAZ Domäne der Rest des Proteins nicht relevant ist. Dies wird auch durch Röntgenkristallstrukturen des TtAgo Proteins mit einer 10 nt *guide* DNA bestätigt. Sie zeigen, dass ein verkürzter *guide* Strang an die PAZ und nicht an die Mid Domäne gebunden vorliegt<sup>(166)</sup>, was ein weiterer Hinweis auf die autarke Nukleinsäurebindung der PAZ Domäne ist. Obwohl also eine Bindung der *guide* RNA an die PAZ Domäne stattfindet, ist keine Spaltung einer komplementären *target* RNA möglich (siehe Abbildung 4.13).

Auch mit hAgo2-PAZ9 wurde die Beladung mit einer kanonischen *guide* RNA untersucht. Mutationen in der PAZ Domäne führen dazu, dass die korrekte Bindung an eine *guide* RNA nicht mehr möglich ist<sup>(133,162)</sup> (siehe Abschnitt 4.2.1.1 und 4.4.3.1). Es konnte jedoch die Bindung des *guide* 5'-Endes an die Mid Domäne beobachtet werden, was eine zweifelsfreie Zuordnung der zweiten und dritten Phase der Bildung binärer hAgo2-*guide* Komplexe ermöglicht (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Es zeigte sich, dass, wie es schon für die PAZ Domäne gefunden wurde, allein die Assoziation mit der Mid Domäne nicht ausreicht, um eine Positionierung der *guide* RNA im Nukleinsäure-Bindungskanal zu gewährleisten. Auch hAgo2-PAZ9 ist nicht in der Lage, die Spaltung einer zum *guide* Strang komplementären *target* RNA zu katalysieren (siehe Abbildung 4.13).

Die vorgestellten Ergebnisse implizieren, dass als Voraussetzung für die Bildung enzymatisch aktiver ternärer Komplexe eine Assoziation des *guide* Strangs sowohl mit der Mid als auch mit der PAZ Domäne notwendig ist. Dies wird bekräftigt durch die Röntgenkristallstruktur des TtAgo im Komplex mit der verkürzten *guide* DNA, welche zeigt, dass dieser Strang in einer anderen Position mit der PAZ Domäne assoziiert ist als ein *guide* Strang, der gleichzeitig an die Mid Domäne gebunden ist<sup>(166)</sup>.

Weitere Hinweise auf den Mechanismus der Bildung binärer Komplexe geben Dissoziationsexperimente mit den bindungsdefizienten hAgo2 Mutanten. Auffällig ist dabei, dass die in Verdrängungsexperimenten gemessene Dissoziation des *guide* RNA 5'-Endes aus der Mid-Bindungstasche mit hAgo2-PAZ9 um Faktor 7 verlangsamt ist (siehe Tabelle 4.1). Dies weist darauf hin, dass die Dissoziation der *guide* RNA von der PAZ und der Mid Domäne konsekutiv ablaufende Prozesse sind. Die Freisetzung des 3'-Endes von der PAZ Domäne involviert möglicherweise konformationelle Änderungen, die dann auch die Dissoziation von der Mid Domäne erleichtern.

Aus den ermittelten Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten binärer hAgo2-PAZ9-*guide* Komplexe konnte außerdem die Gleichgewichtsdissoziationskonstante berechnet werden. Diese ist im Vergleich zur aus transienten Bindungsdaten ermittelten Gleichgewichts-

dissoziationskonstante von binären hAgo2-*guide* Komplexen nur um 30 % reduziert (siehe Tabelle 4.1). Die Assoziation des 3'-Endes der *guide* RNA mit der PAZ Domäne hat somit nur einen sehr geringen Anteil an der Bindungsenergie zwischen hAgo2 und Nukleinsäure. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen der Gruppe um Chen<sup>(92)</sup>, welche in ihren kinetischen Analysen der binären Komplexbildung von *A. aeolicus* Ago mit *guide* Strängen verschiedener Längen kaum Unterschiede detektieren konnten und daraus schlossen, dass mit der PAZ Domäne lediglich eine lose Assoziation besteht. Trotz des geringen Einflusses der PAZ Domäne auf die Stärke der Bindung zwischen hAgo2 und *guide* RNA, ist die Bindung an die PAZ Domäne eine notwendige Bedingung für die korrekte Positionierung der *guide* RNA im binären Komplex.

Ein Großteil der Energie für die Bindung von hAgo2 an *guide* RNA wird somit im 5'-Bereich des *guide* Stranges aufgewendet, was durch Analysen der Gruppe um S. Crooke<sup>(93)</sup> und Untersuchungen im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg<sup>(218)</sup> bestätigt wird. Sie konnten zeigen, dass Änderungen des *guide* 5'-Endes, insbesondere die Dephosphorylierung, drastische Auswirkungen auf die Affinität von hAgo2 für eine *guide* RNA haben. Auch für MjAgo konnten im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit Daten gewonnen werden, welche die Bedeutung des *guide* 5'-Phosphats für die Bindung von MjAgo an *guide* Stränge unterstreichen. Für die Bindungsexperimente mit MjAgo wurde sowohl eine phosphorylierte als auch eine unphosphorylierte Variante einer zu den Versuchen mit hAgo2 sequenzidentischen *guide* DNA eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Assoziationsratenkonstante der Mid Bindung des *guide* 5'-Terminus nahezu identisch zu der mit hAgo2 bestimmten Ratenkonstante ist. Analog zu den mit hAgo2 bestimmten Ratenkonstanten für die Assoziation binärer Komplexe<sup>(218)</sup>, sind in den Assoziationsratenkonstanten keine Unterschiede zwischen unphosphorylierten und phosphorylierten Substraten erkennbar (siehe Abschnitt 4.2.2.1).

Erst die Gleichgewichtsmessungen offenbaren die Unterschiede zwischen den *guide* Strängen mit den unterschiedlichen 5'-Enden (siehe Abschnitt 4.2.2.2). Wie im Fall von hAgo2<sup>(93,218)</sup> wurde auch von MjAgo der unphosphorylierte *guide* Strang wesentlich schlechter gebunden. Die Assoziation des *guide* 5'-Terminus mit der Mid Bindungstasche stellt also auch für die archaellen Ago Proteine einen entscheidenden Schritt für die korrekte und stabile Bindung des *guide* Stranges dar.

### 5.1.1.1. Unterschiede zwischen hAgo2 und MjAgo in der Bindung und Selektion von *guide* Substraten

Während die Bindung des 5'-Endes der *guide* Stränge mit hAgo2 und MjAgo vergleichbar abläuft, sind in der Assoziation des *guide* 3'-Endes mit der PAZ Domäne Unterschiede zu beobachten. Diese läuft mit MjAgo wesentlich langsamer ab als mit hAgo2 (siehe Tabelle 4.6). Der Grund dafür könnte das Substrat sein. Trotz der Präferenz des prokaryotischen MjAgo für DNA bindet dessen PAZ Domäne möglicherweise bevorzugt an RNA. Untersuchungen mit einer *guide* RNA und MjAgo unterstützen diese Hypothese (siehe Abschnitt 4.2.2.1). Diese zeigen jedoch auch, dass der C-terminale Teil von MjAgo vermutlich nicht an RNA bindet. RNA *guide* Stränge werden nur an die PAZ aber vermutlich nicht an die Mid Domäne gebunden und

können folglich nicht in den Nukleinsäure-Bindungskanal gebunden werden. Möglicherweise stellt die 2'-OH Gruppe der RNA das Ausschlusskriterium für die Bindung von *guide* RNAs an MjAgo dar. Röntgenkristallstrukturen des Ago Proteins von *A. aeolicus* in Komplex mit einzelsträngiger siRNA, welches wie MjAgo eine Präferenz für DNA Substrate aufweist, bestätigen diese Hypothese. Im Gegensatz zu vielen anderen Strukturen, die mit einzelsträngiger siRNA co-kristallisiert wurden, ist in dieser Röntgenkristallstruktur nur eine nicht zuzuordnende Elektronendichte erkennbar<sup>(92)</sup>.

Die Substratpräferenz stellt einen Unterschied zwischen MjAgo und hAgo2 dar. Während jedoch MjAgo ein RNA Substrat vermutlich nicht in der Nukleinsäure-Bindungsfurche binden kann, ist hAgo2 in der Lage, an ein DNA Substrat zu binden. Lima et al.<sup>(93)</sup> konnten in ihren Studien zeigen, dass ein DNA *guide* Strang mit einer zum unphosphorylierten RNA *guide* Strang vergleichbaren Affinität an hAgo2 gebunden wird. Die in Abschnitt 4.2.2.1 beschriebenen Experimente zeigen, dass hAgo2 einen DNA *guide* Strang sowohl an die Mid als auch an die PAZ Domäne binden kann. Dabei zeigte sich, dass mit einem DNA Substrat die Bindung an die hAgo2 PAZ Domäne wie mit MjAgo verlangsamt ist. Der zwischen hAgo2 und MjAgo beobachtete Unterschied in den Ratenkonstanten der PAZ Assoziation des 3'-Endes des *guide* Strangs ist somit wahrscheinlich auf die Natur des Substrates zurückzuführen.

Besonders groß sind die beobachteten Unterschiede zwischen hAgo2 und MjAgo in der PAZ Assoziation mit doppelsträngigen Substraten. Die dritte Phase der Assoziation binärer Komplexe aus MjAgo und einem doppelsträngigen Substrat ist um Faktor 10 langsamer als mit hAgo2. Außerdem ist die Affinität von MjAgo für doppelsträngige Substrate niedriger als die von hAgo2. Für das TtAgo Protein, welches wie MjAgo bevorzugt an DNA Substrate bindet, konnte gezeigt werden, dass der *guide-target* Duplex im Protein eher der A-Form Helix als der für DNA typischen B-Form Helix ähnelt<sup>(59)</sup>. In Lösung liegt der DNA Duplex jedoch im Allgemeinen als B-Form Helix vor. Durch die Bindung an das Protein muss also vermutlich die Helix-Form verändert werden, was die im Vergleich zu hAgo2 reduzierte Affinität von MjAgo für doppelsträngige Substrate erklären könnte. Möglicherweise ist außerdem unter den für MjAgo optimalen Bedingungen die Bindung von MjAgo an doppelsträngige Substrate nicht relevant. MjAgo zeigt Spaltung erst bei einer Temperatur von etwa 85 °C<sup>(139)</sup>. Bei dieser Temperatur ist die Schmelztemperatur für den kurzen DNA Duplex bereits weit überschritten, so dass MjAgo möglicherweise nur an einzelsträngige Substrate binden muss.

Einzelsträngige Substrate werden durch MjAgo und hAgo2 in vergleichbarer Weise gebunden. Trotz der unterschiedlichen Präferenz für RNA und DNA teilen prokaryotische und eukaryotische Ago Proteine neben der strukturellen Ähnlichkeit somit offenbar denselben Mechanismus der Nukleinsäurebindung.

### 5.1.2. Die Bindung des *guide* Strangs an Mid und PAZ Domäne stellt ein Auswahlkriterium für die Selektion von *guide* Strängen dar

Im Rahmen der hier vorgestellten Experimente im Kontext der von anderen Gruppen veröffentlichten strukturellen Daten kann neben der eindeutigen Zuordnung der Phasen der binären

## 5. Diskussion

Komplexbildung auch ein Rückschluss auf die Auswahl der *guide* Stränge durch Ago Proteine gezogen werden.

Auf Grund der oben beschriebenen Ergebnisse kann postuliert werden, dass die Assoziation mit der Mid und PAZ Domäne einer Bindung des *guide* Strangs in den Nukleinsäure-Bindungskanal vorausgeht. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, die zeigen, dass das thermodynamisch instabilere Ende einer siRNA an die Mid Domäne gebunden wird<sup>(51)</sup>, was impliziert, dass hier eine Vorauswahl stattfindet. Dabei kommt es zur festen Assoziation des *guide* 5'-Endes und zur Bindung der *seed* Region des *guide* Strangs an den C-terminalen Bereich des Proteins, was als zweite kinetisch unterscheidbare Phase in den transientenkinetischen Experimenten beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.1.1 und 4.2.1.2). Im Fall von TtAgo konnte gezeigt werden, dass die Assoziation beider Enden der *guide* DNA zu einer Rotation der Mid und PAZ Domäne um 22° bzw. 25° führt, welche den Nukleinsäure-Bindungskanal auch im N-terminalen Bereich des Proteins erweitert, um die Bindung des *guide* Stranges zu ermöglichen<sup>(166)</sup>. Diese konformationellen Änderungen und die darauf folgende Bindung des *guide* Stranges in den N-terminalen Bereich des Nukleinsäure-Bindungskanals im Kontext der korrekten Assoziation mit der PAZ Domäne waren in den transientenkinetischen Experimenten als dritte kinetisch unterscheidbare Phase sichtbar (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Ist jedoch der *guide* Strang zu kurz oder die Mid Domäne nicht in der Lage, das 5'-Ende zu binden, bleibt der *guide* Strang mit der PAZ Domäne assoziiert, wird nicht in den Nukleinsäure-Bindungskanal im C-terminalen Bereich des Proteins gebunden und lagert sich vermutlich unspezifisch auf der Oberfläche des die OB-Faltung konstituierenden  $\beta$ -barrel an, was auch in den transientenkinetischen Experimenten erkennbar war (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Dies wird durch die Röntgenkristallstruktur von TtAgo im Komplex mit einer 10 nt *guide* DNA bestätigt<sup>(166)</sup>. Ist die PAZ Domäne nicht fähig, an den *guide* Strang zu binden, wird vermutlich zumindestens der *seed* Bereich in den Nukleinsäure-Bindungskanal gebunden, da eine Basenpaarung der *target* RNA in der *seed* Region auch mit hAgo2-PAZ9 beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.1.2).

Anders, als durch G. Hutvagner und J. Simard vermutet wurde<sup>(1)</sup>, diskriminiert die PAZ Domäne nicht initial zwischen verschiedenen Substraten. Auch wenn keine Assoziation mit der PAZ Domäne stattfindet, kann das Substrat an die Mid Domäne binden (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Die Funktion der Bindung an Mid und PAZ Domäne ist demnach unter anderem die eines molekularen Lineals. Ist ein *guide* Strang zu kurz, um beide Domänen zu erreichen, kann er nicht in den Nukleinsäure-Bindungskanal gebunden werden.

Zusammen mit der Mid Domäne selektiert die PAZ Domäne also mögliche Substrate. Neben der Länge ist ein Ausschlusskriterium für Substrate auch die korrekte Assoziation in der Bindungstasche der PAZ Domäne, was vermutlich eine Unterscheidung zwischen siRNAs bzw. miRNAs und unspezifisch degradierten dsRNAs ermöglicht<sup>(159)</sup>. Substrate, die nicht korrekt an die PAZ Domäne binden, bilden nur sehr instabile ternäre Komplexe (siehe Abschnitt 4.2.1.2) und können somit leicht durch passende *guide-target* Kombinationen kompetiert werden. Ebenso werden Substrate ausgeschlossen, die nicht oder nur schlecht an die Mid Domäne gebunden werden können<sup>(93)</sup>.

### 5.1.3. Die Bildung katalytisch aktiver ternärer Komplexe erfordert nach jeder *target* Strang Spaltung eine erneute Positionierung des *guide* Strang 3'-Endes in der PAZ Domäne

Die Assemblierung ternärer Komplexe aus binären Ago-*guide* Komplexen und komplementären *target* Strängen stellt die Grundvoraussetzung für die Spaltung der *target* Stränge dar. Für die Untersuchung der Bildung ternärer Komplexe wurde zunächst vereinfachend ein zum *guide* Strang komplementärer kurzer *target* Strang verwendet, der in der Länge dem *passenger* Strang entspricht. Bisher existieren keine Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass sich ternäre Komplexe mit kurzen *target* Strängen von denen mit langen *target* Strängen unterscheiden könnten.

Für die Untersuchungen trug ebenfalls entweder der *guide* oder *target* Strang eine Fluoreszenzmarkierung an Position 14. Wenn markierte *target* Stränge verwendet werden, besteht neben der Bindung an binäre Komplexe die Möglichkeit, dass diese an Ago Proteine binden, welche keine *guide* Stränge gebunden haben. Diese Möglichkeit kann jedoch weitgehend vernachlässigt werden, da 5'-unphosphorylierte *target* Stränge verwendet wurden und die Affinität beider Ago Proteine für unphosphorylierte Substrate um Faktor 80 - 500 geringer ist als die des binären Komplexes für einen *target* Strang<sup>(218)</sup> (siehe Abschnitt 4.2.2.2). Daher kann davon ausgegangen werden, dass hier tatsächlich bevorzugt die Bildung ternärer Komplexe abläuft. Außerdem ist es natürlich möglich, dass die *guide* RNA nicht an hAgo2 bindet und frei in Lösung vorliegt. Da die Nukleinsäuren in Abwesenheit von hAgo2 mit einer ähnlichen Affinität aneinander binden wie in Anwesenheit von hAgo2, könnten diese beiden Prozesse gleichzeitig ablaufen. Daher wurde die vollständige Assemblierung binärer Komplexe u. a. durch die Verwendung eines hohen Überschusses an hAgo2 bzw. MjAgo sichergestellt, sodass alle eingesetzten *guide* Stränge an Ago Proteine gebunden sind und nicht in Lösung für die Assoziation mit einer *target* RNA vorliegen.

Die Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg zeigte bereits, dass es sich bei der Bildung ternärer hAgo2-*guide*-*target* Komplexe um einen dreiphasigen Prozess handelt. Anhand struktureller Daten wurde postuliert, dass es nach der Bildung eines Kollisionskomplexes vermutlich zu einer Assoziation im 5'-Bereich der *guide* RNA kommt, gefolgt von einer erweiterten Basenpaarung in der 3'-Region des *guide* Stranges und der damit assoziierten Freisetzung des 3'-Endes der *guide* RNA von der PAZ Domäne<sup>(218)</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wird die genaue Zuordnung der Phasen zu strukturellen Transitionen, die während der *target* RNA Bindung an binäre hAgo2-*guide* Komplexe stattfinden, vorgestellt.

Die Verwendung von *target* RNAs, die Fehlpaarungen entweder in der *seed* Region oder im 3'-Bereich der *guide* RNA aufweisen, für die Untersuchung der Assoziation ternärer Komplexe unterstützt die Hypothese, dass die beobachteten Phasen der Basenpaarung in der *seed* Region und der Freisetzung des 3'-Endes der *guide* RNA aus der PAZ Domäne und erweiterter Basenpaarung entsprechen. Ist die Basenpaarung in der *seed* Region nicht möglich, ist die korrespondierende Phase nicht mehr detektierbar und umgekehrt (siehe Abschnitt 4.2.1.2).

Bestätigt wird die Zuordnung der kinetisch unterscheidbaren Phasen außerdem durch die Verwendung von hAgo2-PAZ9. Wie in Abschnitt 4.2.1.1 gezeigt werden konnte ist eine korrekte

## 5. Diskussion

Bindung der *guide* RNA an das mutierte hAgo2 Protein nur im 5'-Bereich möglich. Eine *target* RNA kann ebenfalls nur in diesem Bereich korrekt assoziiert werden (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Dies wird durch Dissoziationsexperimente bestätigt. Eine Dissoziation der Nukleinsäuren ist unter den gewählten Bedingungen nur dann möglich, wenn sie proteingebunden vorliegen, da gezeigt werden konnte, dass in Abwesenheit von hAgo2 keine Dissoziation von *guide* und *target* RNA stattfindet<sup>(218)</sup>. Auffällig ist allerdings, dass die Dissoziation ternärer Komplexe mit hAgo2-PAZ9 im 5'-Bereich um Faktor 10 beschleunigt ist. Dies lässt darauf schließen, dass die *guide* RNA im Protein so positioniert ist, dass keine vollständige Basenpaarung zwischen der *guide* und der *target* RNA stattfinden kann. Anhand der Assoziationsratenkonstanten wird allerdings deutlich, dass eine Basenpaarung zumindestens in der *seed* Region stattfindet. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen können weiteren Aufschluss über das Ausmaß der Basenpaarung zwischen der hAgo2-PAZ9-gebundenen *guide* RNA und einer komplementären *target* RNA geben. An Hand von hAgo2 und *D. melanogaster* Ago-RISC konnte gezeigt werden, dass eine Basenpaarung in der *seed* Region bereits ausreichend ist, um zu einer stabilen Assoziation des binären Komplexes mit der *target* RNA zu führen<sup>(142,173)</sup>. Die Untersuchungen der Gruppe um I. MacRae<sup>(142)</sup> zeigen weiterhin, dass eine Erweiterung der Basenpaarung um ein bis zwei Nukleotide über das Nukleotid 9 hinaus zu einer Schwächung der Affinität zwischen binären hAgo2-*guide* RNA Komplexen und ihrem *target* führt. Diese Basenpaarung im zentralen Bereich von Nukleotid 9 - 12 erfordert einige konformationelle Änderungen<sup>(173)</sup>. Es wird vermutet, dass eine Erweiterung des Nukleinsäure-Bindungskanal in diesem Bereich zur Schwächung der Interaktionen zwischen *guide* und *target* RNA führt<sup>(142)</sup>. In hAgo2-PAZ9 ist die *guide* RNA vermutlich so positioniert, dass Basenpaarung bis zu diesem Punkt möglich ist, eine weitere Basenpaarung im 3'-Bereich der *guide* RNA, die zu einer Verstärkung der Interaktion führen könnte, jedoch verhindert wird. Dadurch führt die Interaktion von hAgo2-PAZ9 mit dem *guide-target* Duplex zu einer Schwächung der Wechselwirkung mit der *target* RNA, was die Dissoziation beschleunigt. Diese Vermutungen werden bestätigt durch Spaltexperimente, die zeigen, dass hAgo2-PAZ9 katalytisch inaktiv ist (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Die Spaltung von *target* RNAs erfordert zum Einen eine korrekte Positionierung des *guide-target* Duplexes und zum Anderen eine Ausbildung von mindestens 14 Basenpaaren zwischen *guide* und *target* RNA<sup>(59)</sup>. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Assoziation der *guide* RNA mit Mid und PAZ Domäne die Grundvoraussetzung für die korrekte Positionierung des *guide-target* Duplexes darstellt.

Da Ago Proteine Enzyme sind, die zum multiplen Umsatz von *target* RNAs fähig sind<sup>(60,61)</sup>, wird auf Grund dieser Daten postuliert, dass nach jeder Runde der Spaltung einer *target* RNA eine erneute Assoziation des *guide* 3'-Endes mit der PAZ Domäne die Bedingung für die korrekte Bindung einer weiteren *target* RNA ist. Diese Annahme wird durch Einzelmolekülstudien anhand von MjAgo und TtAgo bekräftigt<sup>(139,161)</sup>. Im Rahmen des sogenannten *two state* Modells wurde dieser Mechanismus bereits 2005 durch Tomari und Zamore vermutet<sup>(177)</sup>.

#### 5.1.4. Die Mechanismen der Bildung katalytisch aktiver ternärer Komplexe von hAgo2 und MjAgo sind vergleichbar

Der Vergleich der Bildung ternärer hAgo2- und MjAgo-*guide-target* Komplexe zeigt, dass der Mechanismus der *target* Strang Bindung sehr ähnlich ist. Die ermittelten Ratenkonstanten sind nahezu identisch und wie mit hAgo2 erfolgt auch mit MjAgo die Assemblierung ternärer Komplexe in einem dreiphasigen Prozess (siehe Tabelle 4.7). Daher wird postuliert, dass bei der Bildung ternärer MjAgo-*guide-target* Komplexe die gleichen strukturellen Transitionen wie im Fall von hAgo2 stattfinden.

Auch die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der ternären MjAgo- bzw. hAgo2-*guide-target* Komplexe sind vergleichbar (siehe Tabelle 4.8 und 4.5). In beiden Fällen liegt sie in der gleichen Größenordnung wie jene, die für die Nukleinsäuren in Abwesenheit von Protein ermittelt wurde. Die beobachteten Interaktionen sind somit vor allem auf Watson-Crick Basenpaarung und nicht auf Wechselwirkungen mit dem Protein zurückzuführen. Dies wird durch strukturelle Informationen aus bakteriellen Ago Proteinen bestätigt. Neben Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphat-Rückgrat des *guide* Stranges konnten keine Wechselwirkungen mit dem *guide-target* Duplex beobachtet werden<sup>(89)</sup>. Im Gegensatz zu den eubakteriellen Ago Proteinen besitzen eukaryotische und archaeele Ago Proteine als gemeinsames strukturelles Merkmal die sogenannte Helix 7. Diese zeigt Wechselwirkungen mit der kleinen Furche des *guide-target* Duplex<sup>(142)</sup>. Auf Grund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse ist jedoch anzunehmen, dass diese Wechselwirkung nicht zu einer Stabilisierung der Bindung an den *target* Strang führt, da mit beiden Proteinen Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ternärer Komplexe in der gleichen Größenordnung wie für die Nukleinsäurewechselwirkung in Abwesenheit von Protein bestimmt wurden.

Die in dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten zeigen erstmals eine vergleichende Analyse einer biochemischen Charakterisierung eines eukaryotischen und eines prokaryotischen Vertreters der Ago Proteine. Dieser Vergleich zeigt, dass die beiden untersuchten Ago Proteine neben einer strukturellen Homologie auch den Mechanismus der *guide* Strang-Bindung teilen.

#### 5.1.5. Die Geschwindigkeit der Dissoziation ternärer Komplexe wird durch konformationelle Umlagerungen der Ago Proteine bestimmt

Im Unterschied zur Assoziation sind die Dissoziationsratenkonstanten ternärer Komplexe im Fall von MjAgo nur partiell mit denen von hAgo2 vergleichbar. Die zweite Phase der Dissoziation, die die Auflösung der Basenpaarung in der *seed* Region repräsentiert, ist mit MjAgo um Faktor 3 schneller (siehe Tabelle 4.7). Dies ist vermutlich auf eine geringere Affinität von DNA-DNA Duplexen im Vergleich zu RNA-RNA Duplexen zurückzuführen. Die Ratenkonstante der Dissoziation von *guide* und *target* im 3'-Bereich des *guide* Stranges, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spaltreaktion darstellt, ist identisch für hAgo2 und MjAgo. Die unterschiedlichen Substrate haben demnach keinen Einfluss auf diese Phase. Die langsame Dissoziation des *guide-target* Duplex im 3'-Bereich ist somit vermutlich auf konformationelle Änderungen der Ago Proteine zurückzuführen, die eine Freisetzung des *target* Stranges ermöglichen. Untersuchungen zur Geschwindigkeit der Spaltprodukt-Freisetzung zeigen den

gleichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, der in der Dissoziation intakter *target* RNA beobachtet wurde (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Offenbar müssen für die Freisetzung der Spaltprodukte die gleichen konformationellen Änderungen wie für die Freisetzung der *target* RNA durchlaufen werden.

Dies widerspricht Schlussfolgerungen von Haley et al.<sup>(61)</sup>. Schon früh vermuteten sie zwar, dass die Freisetzung der Produkte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt unter *multiple turnover* Bedingungen sein könnte. Die von ihnen vermutete Ursache war jedoch eine andere als die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse implizieren. Sie konnten den Umsatz durch *D. melanogaster* RISC in Anwesenheit von ATP um Faktor vier steigern. Daraus folgerten sie, dass möglicherweise eine ATP-abhängige RNA Helikase die Produktfreisetzung beschleunigen könnte, was bedeutet, dass sie die Entwindung der Stränge als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *target* Spaltung ansahen. Sind aber tatsächlich strukturelle Umlagerungen von hAgo2 verantwortlich für die langsame Dissoziation der *target* RNA, ist als ATP-abhängiger Faktor, der die Freisetzung beschleunigt, ein Protein zu suchen, welches die konformationellen Änderungen erleichtert.

Andere Gruppen fanden 2010 einen Faktor, der als ein ATP-abhängiger Faktor konformationelle Umlagerungen unterstützen könnte. Es handelt sich bei diesem Faktor um die ATP-abhängige Hsc70-Hsp90 Chaperon Maschinerie<sup>(226,227)</sup>. Kwak et al. stellten zwei Jahre später das sogenannte „Keil“-Modell auf<sup>(147)</sup>. Sie vermuteten, dass bei der Freisetzung der *passenger* RNA ein sogenanntes *active wedging* stattfindet. Dabei schiebt sich die N-terminale Domäne wie ein Keil zwischen *guide* und *passenger* RNA und wird dabei vermutlich durch die Hsc70-Hsp90 Chaperon Maschinerie unterstützt. Für ein *passive wedging*, welches die Freisetzung von *target* RNAs unterstützt, ist eine aktive Rolle der N-terminalen Domäne als Keil wahrscheinlich nicht notwendig, da mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturen des TtAgo Proteins gezeigt werden konnte, dass ihre Positionierung keine Basenpaarung über das Nukleotid 16 hinaus erlaubt<sup>(90,173)</sup>. Wie durch Analysen im Rahmen dieser Arbeit (siehe Abschnitt 5.1.3) und von anderen Gruppen durchgeführte Einzelmolekülstudien<sup>(139,161)</sup> gezeigt werden konnte, ist nach der Freisetzung der Spaltprodukte eine erneute Bindung des *guide* Strang 3'-Endes an die PAZ Domäne notwendig, damit ein neuer *target* Strang gebunden werden kann. Dies impliziert, dass konformationelle Änderungen stattfinden, die eventuell durch einen ATP-abhängigen Faktor unterstützt werden könnten.

## 5.2. Die Bedeutung des 5'-Nukleotids der *guide* Stränge für die Bildung binärer und ternärer Komplexe

Neben der Phosphorylierung wird vermutet, dass die Identität des 5'-Nukleotids ein weiteres wichtiges Merkmal für die Bildung binärer Komplexe darstellt. In der Pflanze *A. thaliana* wie auch in der Fliege *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass die Sortierung von miRNAs auf verschiedene Ago Proteine an Hand der Identität des 5'-Nukleotids erfolgt<sup>(223,228)</sup>. Dabei konnte in *D. melanogaster* gezeigt werden, dass die Präferenz für verschiedene Nukleotide nicht mit der Häufigkeit korreliert, mit der ein bestimmtes 5'-Nukleotid in *D. melanogaster* Zel-



len auftritt<sup>(167,228)</sup>. Röntgenkristallstrukturen eubakterieller, archaeeller und eukaryotischer Ago Proteine zeigen, dass die Mechanismen der Bindung der Mid Domäne an das 5'-Nukleotid sich trotz hoher struktureller Homologie unterscheiden. In hAgo2 und TtAgo konnte ein Bereich identifiziert werden, der NSL genannt wurde. Diesem wird anhand von Untersuchungen der Mid Domäne von hAgo2 eine große Bedeutung für die Selektion von *guide* Strängen mit Hilfe des 5'-terminalen Nukleotids zugeordnet. Ein entsprechender Bereich wurde auch in archaeellen Ago Strukturen entdeckt. In diesen Proteinen ist diese Region jedoch soweit von der Mid-Bindungstasche entfernt, dass eine Beteiligung an der Selektion des 5'-Nukleotids ausgeschlossen wird<sup>(144)</sup>. Ob also in archaeellen Ago Proteinen eine Selektion anhand des 5'-terminalen Nukleotids stattfindet und welches Nukleotid in diesem Fall präferiert wird, ist unklar. Während mit Hilfe von Untersuchungen an der isolierten Mid-Domäne von hAgo2 mit Nukleosidmonophosphaten eine klare Präferenz von hAgo2 für *guide* Stränge mit einem 5'-terminalen Uracil postuliert wurde, wurde für TtAgo ein Cytosin und für RsAgo ein Uracil als bevorzugter 5'-Terminus identifiziert<sup>(3,88,144)</sup>. Eine mögliche Präferenz für ein bestimmtes 5'-terminales Nukleotid ist für das archaeelle MjAgo bislang nicht beschrieben<sup>(139)</sup>.

Die vorliegende Promotionsarbeit liefert erstmals Informationen zur Bindung von kompletten *guide* Strängen mit unterschiedlichen 5'-Nukleotiden an hAgo2 und MjAgo. Dabei ist der Fokus vor allem auf die Unterscheidung zwischen einem 5'-terminalen Uracil und Guanin gerichtet, da hier auf Grund zuvor publizierter Strukturen<sup>(144)</sup> und MD Simulationen<sup>(220)</sup> die größten Unterschiede erwartet wurden.

### 5.2.1. Das humane Ago2 bildet katalytisch aktive Komplexe mit allen vier unterschiedlichen *guide* 5'-Nukleotiden

Das hAgo2 Protein kann *guide* Stränge mit allen vier möglichen 5'-Nukleotiden binden und mit diesen *guide* RNAs katalytisch aktive ternäre hAgo2-*guide-target* Komplexe bilden (siehe Abschnitt 4.2.3.5). Die beobachtete Effizienz der Spaltung ist dabei nahezu identisch mit einem 5'-Guanin und einem 5'-Uracil (siehe Abschnitt 4.2.3.5). Mit dem Standard *guide-target* System ist desweiteren keine Änderung in den Assoziations- bzw. Dissoziationsratenkonstanten ternärer Komplexe zu beobachten, wenn *guide* und *target* RNA vertauscht werden und somit ein anderes 5'-Nukleotid vorliegt<sup>(218)</sup>.

Die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten binärer hAgo2-*guide* RNA Komplexe mit verschiedenen 5'-terminalen Nukleotiden zeigt wesentlich geringere Unterschiede in den Affinitäten, als anhand der NMR Titrationsstudien mit Hilfe der isolierten Mid Domäne und Nukleosidmonophosphaten von Frank et al.<sup>(144)</sup> vermutet wurde. Diese zeigten eine um Faktor 30 bessere Bindung von UMP und AMP im Vergleich zu CMP und GMP. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass *guide* Stränge mit einem 5'-Adenin bzw. 5'-Cytosin mit einer Affinität an hAgo2 gebunden werden, die der Affinität für *guide* Stränge mit einem 5'-Uracil gleicht. Lediglich *guide* Stränge mit einem 5'-Guanin werden um Faktor 5 schlechter gebunden als ein *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Uracil (siehe Tabelle 4.11).

Diese Diskrepanzen sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass eine komplette *guide* RNA mit einem kompletten hAgo2 neben den Interaktionen des 5'-Nukleotids mit der Mid Bindungs-

tasche weitere Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen kann. So sind diverse Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Mid und der PIWI Domäne von hAgo2 mit dem Phosphatrückgrat des *guide* Stranges zu erkennen<sup>(123)</sup>. Auch mit der PAZ Domäne konnten Wechselwirkungen u. a. im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Wie jedoch vermutet wird, sind diese für die gesamte Bindungsenergie der *guide* RNA vernachlässigbar<sup>(92)</sup> (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Während Interaktionen mit dem 5'-Phosphat, wie am Beispiel des *guide* Stranges mit einem 5'-terminalen Uracil gezeigt werden konnte, die Affinität von hAgo2 für ein *guide* Substrat nachhaltig beeinflussen<sup>(93,218)</sup>, ist dem Einfluss der Identität des 5'-Nukleotids demnach kaum eine Relevanz zuzuordnen. Dieses Phänomen konnte kürzlich auch durch Swarts et al.<sup>(88)</sup> beobachtet werden. Obwohl TtAgo eine ausgeprägte Präferenz für *guide* DNAs mit einem 5'-terminalen Cytosin zeigt, hat es vergleichbare Aktivität auch mit *guide* Strängen, die eines der drei anderen möglichen 5'-Nukleotide tragen. Es wurde vermutet, dass entweder die Selektivität von TtAgo die 5'-Nukleotid Präferenz bedingt oder ein spezifischer Schritt in der Prozessierung der *guide* DNAs diese Bevorzugung verursacht. Die Präferenz von hAgo2 für ein 5'-Uracil könnte somit potentiell durch eine andere Komponente des RNAi Weges bestimmt werden. Möglicherweise resultiert die in verschiedenen Organismen gezeigte Bevorzugung für Uracil am 5'-Ende von miRNAs<sup>(12,28,167,168,229)</sup> u. a. auch aus einer reduzierten thermodynamischen Stabilität des 5'-Terminus in Anwesenheit von Uracil<sup>(168)</sup>. Trotz Komplementarität zum gegenüberliegenden *target* Strang Nukleotid liegt das 5'-terminale Nukleotid im binären Komplex ungepaart vor, da sonst eine Bindung in der Mid-Bindungstasche nicht möglich wäre<sup>(90,140,163,166,173)</sup>. Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass hAgo2 ein sehr flexibles Protein ist, welches in der Lage ist, sich an verschiedene Substrate anzupassen. Flexibilität im Kontext von hAgo2 wurde bisher überwiegend mit dem N-terminalen Lappen von Ago Proteinen assoziiert<sup>(92,141)</sup>. Für die Mid Domäne wurde lediglich eine Rotation zur Verlängerung des Nukleinsäure-Bindungskanal beschrieben<sup>(166)</sup>. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass auch das Interaktionsnetzwerk in der Mid Bindungstasche nicht so starr ist wie bisher angenommen.

### 5.2.1.1. Der NSL stabilisiert vermutlich verschiedene 5'-Nukleotide in der Mid Bindungstasche

Neben den intensiven Wechselwirkungen des 5'-terminalen Phosphats<sup>(123,140,144,151)</sup>, sind auch Interaktionen der 5'-terminalen Base mit der Mid Bindungstasche zu beobachten. Unspezifisch bildet dabei das Tyr529  $\pi - \pi$ - Interaktionen mit der Base aus<sup>(123,140,151)</sup>. Dieser Rest interagiert gleichzeitig mit der Phosphatgruppe und ist essentiell für die Aktivität von hAgo2<sup>(157)</sup>. Eine spezifische Erkennung der 5'-terminalen Base erfolgt durch den NSL, wie 2010 durch Frank et al.<sup>(144)</sup> gezeigt werden konnte. Ein Uracil und auch Adenin wird durch Wechselwirkungen mit Gly524 und Thr526 des NSL stabilisiert, während dieselben Aminosäuren zur Repulsion eines Cytosins oder Guanins führen. Das zentral im NSL gelegene Lys525 geht *Van der Waals* Interaktionen mit allen vier Nukleotiden ein. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde dieses Lys525 zu einem Alanin mutiert. Dabei zeigte sich in Spaltungsexperimenten, dass mit einem 5'-terminalen Guanin am *guide* Strang die Effizienz der hAgo2-vermittelten

Spaltung um etwa 25 % im Vergleich zum *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Uracil reduziert war (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Das lässt darauf schließen, dass der *guide* Strang mit einem 5'-Guanin im Wildtyp hAgo2 durch das Lys525 stabilisiert werden könnte. Arbeiten von Dr. M. Kalia<sup>(220)</sup> unterstreichen die Bedeutung des Lys525 für die Bindung an *guide* Stränge mit einem 5'-terminalen Guanin. MD Simulationen offenbarten, dass sich zwischen Lys525 und einem 5'-Guanin Kationen- $\pi$ -Interaktionen ausbilden können. Im Kontext mit der Fähigkeit von hAgo2, katalytisch aktive ternäre Komplexe unter Ausnutzung von *guide* Strängen mit allen vier möglichen 5'-terminalen Nukleotiden zu assemblieren (siehe oben), und der Tatsache, dass diese Fähigkeit bei Mutation des Lys525 beeinträchtigt ist, impliziert dies eine Funktion des NSL in der Anpassung der Mid-Bindungstasche an verschiedene 5'-Nukleotide. Möglicherweise ist die Funktion des NSL nicht die Selektion der verschiedenen 5'-terminalen Nukleotide, sondern die Anpassung an verschiedene 5'-terminale Nukleotide.

### 5.2.2. Das humane Ago2 und das archaeele MjAgo binden in vergleichbarer Weise an *guide* Stränge mit verschiedenen 5'-Nukleotiden

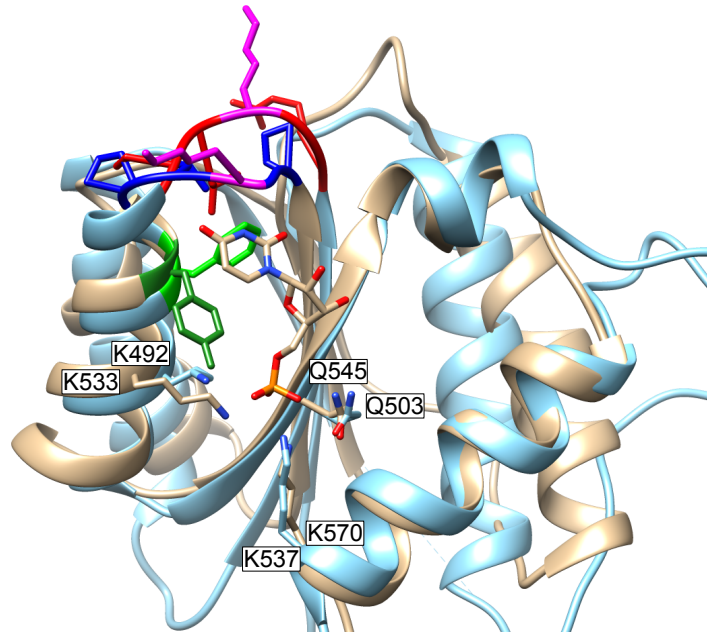
Mit hAgo2 konnte beobachtet werden, dass mit Hilfe des NSL alle vier möglichen 5'-terminalen Nukleotide einer *guide* RNA gebunden werden können. Der Mechanismus der Nukleotid-Erkennung und einer möglichen Präferenz für ein bestimmtes 5'-Nukleotid in archaeeilen Proteinen ist bislang nicht bekannt. Die vergleichende Analyse von Bindungsexperimenten mit hAgo2 und MjAgo im Kontext unterschiedlicher 5'-Nukleotide erlaubt im Rahmen dieser Arbeit erste Rückschlüsse auf den Mechanismus der Erkennung und Bindung verschiedener 5'-Nukleotide.

Transientenkinetische Untersuchungen der Assemblierung binärer Komplexe mit einem 5'-Guanin und einem 5'-Uracil bzw. 5'-Thymin ergaben nahezu identische Assoziationsratenkonstanten für *guide* Stränge mit beiden 5'-terminalen Nukleotiden sowohl mit MjAgo als auch mit hAgo2 (siehe Tabelle 4.9 und 4.10). Unterschiede offenbarten sich in den Dissoziationsratenkonstanten binärer hAgo2-*guide* Komplexe. Die Dissoziation des *guide* 5'-Endes aus der Mid Bindungstasche ist mit einem 5'-terminalen Guanin statt eines Uracils um etwa Faktor 4 beschleunigt. Dies könnte u. a. eine Erklärung für die um Faktor 5 reduzierte Affinität von hAgo2 für *guide* Stränge mit einem 5'-terminalen Guanin an Stelle eines Uracils sein.

Obwohl dem archaeeilen MjAgo der NSL fehlt<sup>(144)</sup>, bindet es mit ähnlichen Affinitäten wie hAgo2 an *guide* Stränge mit verschiedenen 5'-Nukleotiden (siehe Tabelle 4.11). Wie im Fall von hAgo2 ist die Affinität von MjAgo für ein *guide* Substrat mit einem 5'-Guanin an Stelle eines 5'-terminalen Thymins geringer. Dabei zeigte sich jedoch auch, dass die Affinität von MjAgo für einen *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Guanin größer ist als die von hAgo2. Insofern ist davon auszugehen, dass die 5'-Nukleotide zwar ähnliche Interaktionen mit der Mid Bindungstasche eingehen, aber doch einige wesentliche Differenzen bestehen. Ein Blick in die Struktur zeigt, dass die Mid Bindungstasche von hAgo2 sich in einigen wichtigen Punkten von der des *P. furiosus* Ago (PfAgo), welches als Homologie-Modell für MjAgo dient<sup>(139)</sup>, unterscheidet (siehe Abbildung 5.1).

Erstens ist, wie von Frank et al.<sup>(144)</sup> beschrieben, die zum NSL korrespondierende Region weiter von der putativen Bindungstasche entfernt als in hAgo2. Es fällt dabei auf, dass von den

**Abbildung 5.1: Vergleich der Mid Bindungstaschen von hAgo2 und *P. furiosus* Ago.** Überlagerung der Mid Domäne von *P. furiosus* Ago (PfAgo) PDB: 1Z25 (hellblau) mit der Mid Domäne von hAgo2 in Komplex mit dem 5'-terminalen Nukleotid PDB: 4F3T (beige). Die zum NSL korrespondierende Region ist in rot (PfAgo) bzw. dunkelblau (hAgo2) gekennzeichnet. Das konservierte Lysin (PfAgo:K482; hAgo2:K525) ist magenta eingefärbt. Das in vielen Ago Proteinen konservierte Tyrosin (hAgo2: Y529, dunkelgrün) ist in PfAgo gegen ein Phenylalanin (F488, hellgrün) ausgetauscht.



Aminosäuren aus der Region des NSL einzig das Lysin an Position 525 bzw. 482 im humanen und im archaellen Protein gleichermaßen auftritt. In beiden Fällen ist es nicht so positioniert, dass es mit der 5'-Base interagieren könnte. MD Simulationen an hAgo2 konnten jedoch zeigen, dass es zu Kationen- $\pi$  Interaktionen zwischen dem Lys525 und einem 5'-Guanin kommt, was eine Bewegung des K525 zum 5'-Nukleotid hin erfordert<sup>(220)</sup>. Da sich das Lys482 in PfAgo in einer flexiblen Schleife befindet, ist es denkbar, dass es für Interaktionen mit einem 5'-Guanin in die Mid Bindungstasche einklappt.

Zweitens ist erkennbar, dass das in vielen Ago Proteinen konservierte Tyrosin (hAgo2:Y529) im archaellen Protein gegen ein Phenylalanin ausgetauscht ist, welches noch dazu anders positioniert ist als in hAgo2. In Abbildung 5.1 ist zu sehen, dass das 5'-Uracil  $\pi - \pi$ -Interaktionen mit dem Y529 eingeht. Eine Base, die in der Mid Bindungstasche  $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen mit dem Phenylalanin ausbilden soll, muss viel tiefer in der Mid Bindungstasche plaziert werden. Dementsprechend ist das mit dem 5'-Phosphat interagierende K492 etwas tiefer in der Mid Bindungstasche positioniert als sein Pendant K533. Die anderen mit der Phosphatgruppe interagierenden Aminosäuren, die in eukaryotischen und prokaryotischen Ago Proteinen konserviert sind, sind nahezu identisch positioniert. Eine tiefere Positionierung des 5'-Nukleotids in der Mid Bindungstasche könnte erklären, warum trotz fehlender stabilisierender Wechselwirkungen mit dem NSL ein *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Thymin mit einer vergleichbaren Affinität durch MjAgo gebunden wird wie ein sequenzidentischer *guide* Strang mit einem 5'-Uracil durch hAgo2 (siehe Abschnitt 4.2.3.1 und 4.2.1.1 und Tabelle 4.11). Möglicherweise können in dieser Position im archaellen Protein zusätzliche Wechselwirkungen ausgebildet werden, die ebenfalls zu ähnlichen Affinitäten der beiden Proteine für *guide* Stränge führen würden.

### 5.2.3. Der Einfluss des 5'-Phosphats auf die Bindung des *guide* Stranges an Ago ist abhängig vom 5'-Nukleotid

Untersuchungen im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg<sup>(218)</sup> und der Arbeitsgruppe um S. Crooke<sup>(93)</sup> zeigten, dass in Abwesenheit des 5'-terminalen Phosphats die Affinität von hAgo2 für *guide* Stränge signifikant erniedrigt ist. Dieselben Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Arbeit mit MjAgo gemacht werden (siehe Abschnitt 4.2.2.2). Diese Untersuchungen bezogen sich jedoch nur auf kanonische *guide* Stränge mit einem 5'-terminalen Uracil bzw. Thymin. Vergleichbare Experimente wurden mit anderen 5'-Nukleotiden nach eigenem Wissenstand bisher nicht durchgeführt.

Analysen im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit unter *pre-steady state* und Gleichgewichtsbedingungen zeigten, dass die Situation sich wesentlich ändert, wenn an der 5'-Position ein Guanin an Stelle eines Uracils bzw. Thymins eingesetzt wird (siehe Abschnitt 4.2.3.1 und 4.2.3.2). Die Assoziationsratenkonstanten mit einem phosphorylierten bzw. unphosphorylierten *guide* Strang mit einem 5'-Guanin sind sehr ähnlich (siehe Tabelle 4.10 und 4.9). Unterschiede in transienten Bindungsstudien sind jedoch in Dissoziationsexperimenten mit hAgo2 erkennbar (siehe Tabelle 4.9). Die Dissoziation des *guide* 5'-Endes aus der Mid Bindungstasche ist mit einem unphosphorylierten 5'-Uracil *guide* Strang um Faktor 10 schneller als die eines phosphorylierten *guide* Stranges<sup>(218)</sup>, während mit einem 5'-Guanin kein Unterschied in der gemessenen Ratenkonstante abhängig von der 5'-terminalen Phosphorylierung erkennbar ist. Die Phosphatgruppe hat also offenbar keinen verstärkenden Einfluss auf die Bindung zwischen *guide* Strang und hAgo2, wenn ein Guanin 5'-terminal positioniert ist.

Im Gegensatz dazu ist in Gleichgewichtsmessungen zu erkennen, dass ein *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Guanin wesentlich besser gebunden wird, wenn am 5'-terminalen Nukleotid kein Phosphat vorhanden ist (siehe Tabelle 4.11). Mit hAgo2 ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante um Faktor 5 geringer, wenn das 5'-Phosphat fehlt. Die Erklärung dafür liegt wahrscheinlich in der Struktur des NSL. In hAgo2 liegt der NSL in einer Position vor, in der repulsive Wechselwirkungen mit einem 5'-Guanin ausgebildet werden, wenn ein 5'-Phosphat in der Mid Bindungstasche vorhanden ist<sup>(144)</sup>. In Abwesenheit des 5'-terminalen Phosphats kann das 5'-Guanin diesen repulsiven Interaktionen vermutlich ausweichen und eine stabilere Position in der Mid Bindungstasche einnehmen. Mit MjAgo sind die Unterschiede zwischen den Affinitäten für phosphorylierte und unphosphorylierte *guide* Stränge mit einem 5'-terminalen Guanin nicht so stark ausgeprägt. Trotzdem verändert offenbar auch in MjAgo das 5'-Guanin seine Position, wenn das 5'-Phosphat nicht präsent ist. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante binärer MjAgo-OH-G *guide* Komplexe ist vergleichbar mit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante binärer hAgo2-OH-G *guide* Komplexe (siehe Tabelle 4.11). Dies lässt den Schluss zu, dass in Abwesenheit des 5'-Phosphats das Interaktionsnetzwerk zwischen dem 5'-Nukleotid und der Mid Bindungstasche von hAgo2 bzw. MjAgo ähnlich ist. In Anwesenheit des Phosphats dagegen fehlen in der Mid Bindungstasche von MjAgo die repulsiven Wechselwirkungen zwischen dem 5'-Guanin und dem NSL, was die signifikant höhere Affinität von MjAgo für phosphorylierte G *guide* Stränge im Vergleich zu hAgo2 erklären könnte.

#### 5.2.4. Die *guide* Strang Sequenz hat einen Einfluss auf die Bildung ternärer Komplexe

Bislang wird angenommen, dass die *guide* Strang Sequenz keine Bedeutung für die Bildung binärer und ternärer Komplexe hat. Die Kontakte, die zwischen hAgo2 und dem *guide* bzw. *target* Strang an Hand von Röntgenkristallstrukturen beschrieben werden konnten, sind rein sequenzunabhängiger Natur. So wurden zum Beispiel verschiedene Interaktionen zwischen dem Phosphatrückgrat des *guide* Stranges und Aminosäuren entlang des Nukleinsäure-Bindungskanals gezeigt. In diesen Röntgenkristallstrukturen waren keine basenspezifischen Wechselwirkungen sichtbar<sup>(123,151,166)</sup>. Diese Ergebnisse bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. Ein Einfluss der *guide* Strang Sequenz auf die Assemblierung binärer Komplexe konnte weder im Rahmen von transienten Bindungsexperimenten noch an Hand der unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.2.3.1 und 4.2.3.2).

Im ternären Komplex sind ebenfalls nur basenunabhängige Kontakte des Ago Proteins mit dem Phosphatrückgrat der *guide* und der *target* Stränge zu erkennen<sup>(90,142)</sup>. Röntgenkristallstrukturen ternärer hAgo2-*guide*-*target* Komplexe zeigen, dass Reste der PIWI Domäne sowie auch der Helix 7 intensive Wechselwirkungen mit der kleinen Furche des Duplex ausbilden<sup>(142)</sup>. Daraus wurde gefolgert, dass auch im ternären Komplex die Sequenz der *guide* Stränge keine Rolle spielt. Dies deckt sich nicht mit den im Rahmen dieser Promotionsarbeit erhobenen Befunden. Während mit dem si2b Standard System die Bildung ternärer Komplexe in einem dreiphasigen Prozess abläuft (siehe Abschnitt 4.2.1.2 und 4.2.2.3) und im Standardspalttest lediglich das kanonische Spaltprodukt, welches durch Spaltung gegenüber von Nukleotid 10 und 11 des *guide* Stranges entsteht<sup>(45,48)</sup>, detektierbar ist (siehe Abschnitt 4.2.1.4 und 4.2.2.6), zeichnet sich mit der let7 *guide*-*target* Kombination ein anderes Bild ab.

Die Bindung der *target* DNA an binäre MjAgo-let7 *guide* DNA Komplexe erfolgt in einem vierphasigen an Stelle eines dreiphasigen Prozesses (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Die neu detektierte Phase ist nicht abhängig von der *target* DNA Konzentration und etwas schneller als die zuvor beschriebenen Phasen, die auch im Rahmen der ternären Komplexbildung mit si2b gemessenen wurden und die Basenpaarung in der *seed* Region sowie die erweiterte Basenpaarung und die darauf folgende Freisetzung des *guide* Strang 3'-Endes von der PAZ Domäne repräsentieren.

Weiterhin zeigten Spaltungsexperimente, dass neben dem kanonischen Spaltprodukt mit der let7 *guide*-*target* Kombination ein weiteres Spaltfragment detektierbar ist (siehe Abschnitt 4.2.3.5). Dies weist auf einen möglichen Zusammenhang der in transienten Bindungsexperimenten neu detektierten Phase mit dem Auftreten multipler Spaltprodukte zu. Das nicht-kanonische Spaltprodukt ist unter *single turnover* Bedingungen dominanter und tritt unter *multiple turnover* Bedingungen im Vergleich zum kanonischen Spaltprodukt in den Hintergrund. Vermutlich gibt es also mindestens zwei mögliche Positionen des *guide*-*target* Duplex im MjAgo Protein, wenn die let7 Sequenz gewählt wird, wobei offenbar die, welche die Bildung des nicht-kanonischen Spaltproduktes verursacht, zunächst präferiert wird. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Kontakte des Ago Proteins mit dem *guide*-*target* Duplex basenunabhän-

gig sind<sup>(90,123,142,151,166)</sup>, hat also die Sequenz einen Einfluss auf die Konformation des ternären Komplexes. Im binären Komplex konnten keine Unterschiede mit verschiedenen *guide* Sequenzen festgestellt werden; die Beobachtungen beziehen sich allein auf ternäre Komplexe. Die unterschiedlichen Positionen des *guide-target* Duplex werden vermutlich reflektiert durch die neu detektierte vierte Phase der Bildung ternärer MjAgo-let7 *guide-target* Komplexe. Sequenzbedingt scheint der let7 *guide* Strang eine höhere Flexibilität im 5'-Bereich aufzuweisen, die ihm verschiedene Positionierungen im C-terminalen Lappen des Ago Proteins ermöglichen könnte. In den Bindungsexperimenten zum binären Komplex sind diese verschiedenen Konformationen nicht detektierbar, da das 5'-Ende ebenso wie das 3'-Ende wie im binären Komplex mit as2b in den Bindungstaschen der Mid und der PAZ Domäne verankert ist und die Nukleinsäure im Nukleinsäure-Bindungskanal vorliegt. Die möglicherweise erhöhte Flexibilität im 5'-Bereich könnte dazu führen, dass die Basen in der *seed* Region etwas anders positioniert sind, sodass eine schnellere Assoziation mit der *target* DNA stattfinden könnte. Dies könnte zu einer veränderten Positionierung des *guide-target* Duplexes führen, was die Verschiebung der Spaltposition um ein Nukleotid zum 3'-Ende der *guide* DNA hin verursachen würde. Vermutlich können die MjAgo-*guide-target* Komplexe zwei voneinander unabhängige energetisch günstige Konformationen einnehmen. Da unter *multiple turnover* Bedingungen hauptsächlich das kanonische Spaltprodukt gebildet wird, wird vermutet, dass die Bindung, Spaltung und Freisetzung der *target* DNA Aktivierungsenergie zur Verfügung stellt, die die richtige Positionierung der *guide* DNA im binären Komplex ermöglicht. Die Konformation des binären Komplexes, welche nach Bindung der *target* DNA zur Bildung des kanonischen Spaltproduktes führt, ist vermutlich die energetisch günstigste. Auch diese Position kann direkt erreicht werden, wie die Bildung des kanonischen Spaltproduktes unter *single turnover* Bedingungen beweist. Dies impliziert, dass in den Ensemblemessungen und unter *pre-steady state* Bedingungen mindestens zwei verschiedene Populationen ternärer Komplexe gemessen werden.

### **Abhängig von der *guide* Strang Sequenz hat das 5'-Nukleotid einen Einfluss auf die Bildung ternärer Komplexe**

Konnte mit dem si2b *guide-target* System kein Unterschied in der Assemblierung ternärer Komplexe abhängig von der Identität des 5'-Nukleotids festgestellt werden, ist mit der let7 Sequenz in Experimenten mit MjAgo eine klare Abhängigkeit von der Identität des 5'-Nukleotids zu erkennen. Die Spaltexperimente zeigen, dass sowohl mit einem 5'-Thymin als auch einem 5'-Guanin zwei Spaltprodukte erzielt werden. Dabei fällt auf, dass mit einem 5'-terminalen Guanin hauptsächlich das kanonische Spaltprodukt gebildet wird (siehe Abschnitt 4.2.3.5). Unter *multiple turnover* Bedingungen ist mit einem 5'-Guanin sogar ein annähernder Verlust des nicht-kanonischen Spaltproduktes zu erkennen. Ein 5'-Guanin erhöht offenbar die Genauigkeit der Positionierung des *guide* Strangs im binären Komplex und ermöglicht so vermutlich eine exakte Positionierung des *target* Strangs im ternären MjAgo-*guide-target* Komplex. Mit einem 5'-Guanin am let7 *guide* Strang ist außerdem ein Effekt auf die Gleichgewichtsdissoziationskonstante binärer Komplexe feststellbar (siehe Tabelle 4.11). Die Affinität von MjAgo für einen let7 *guide* Strang mit einem 5'-terminalen Guanin ist um Faktor 3 höher als die Affinität von

MjAgo für den as2b *guide* Strang mit einem 5'-Guanin. Das 5'-Guanin könnte im Kontext der let7 *guide* Sequenz eine andere Position in der Mid Bindungstasche einnehmen, die festere Wechselwirkungen mit dem Protein ermöglicht und so zu einer erniedrigten Gleichgewichtsdissoziationskonstante der binären Komplexe führt.

Die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten ternärer MjAgo-let7*guide-target* Komplexe sind nahezu identisch mit einem 5'-terminalen Thymin bzw. Guanin am *guide* Strang (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Außerdem sind wie mit dem si2b System keine vom 5'-terminalen Nukleotid abhängigen Unterschiede in den Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der ternären MjAgo-let7*guide-target* Komplexe zu erkennen (siehe Abschnitt 4.2.3.4). Die *pre-steady state* Experimente zeigen jedoch, dass die Amplitude der neu hinzugekommenen Phase mit einem 5'-terminalen Guanin an Stelle eines Thymins am *guide* Strang nur etwa halb so groß ist. Dies widerspiegelt möglicherweise die erhöhte Genauigkeit der Positionierung der *guide* DNA mit einem 5'-Guanin. Diese Erkenntnisse geben erste Hinweise darauf, dass MjAgo möglicherweise ein Guanin am 5'-Ende der *guide* DNA präferiert.

### 5.3. Die Bedeutung der *target* Länge für die Bildung ternärer Komplexe

Bislang wurden mögliche Effekte unterschiedlich langer *target* RNAs auf die enzymatischen Eigenschaften von hAgo2 nicht systematisch untersucht. Mehrere Studien zur Spaltaktivität von Ago Proteinen nutzen *target* Stränge mit den verschiedensten Längen. Von 21 Nukleotiden<sup>(102)</sup>, was der Länge einer *passenger* RNA entspricht, bis hin zu mRNA-ähnlichen *target* RNAs mit bis zu 379 Nukleotiden Länge<sup>(61)</sup> reicht die Spanne. Wie anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse klar wird, schränkt dies die Vergleichbarkeit dieser Studien stark ein. Zwar ist schon lange bekannt, dass die Zugänglichkeit der Bindungsstellen für *guide* RNAs in der *target* RNA ein wichtiger Faktor für eine effiziente Spaltung ist<sup>(99,100)</sup>, allerdings wird davon ausgegangen, dass eine voll zugängliche Bindungsstelle dazu führt, dass ein langer und ein kurzer *target* Strang in vergleichbarer Art und Weise gebunden werden. Daran änderten auch die Studien der Gruppe um R. Schröder<sup>(107)</sup> nichts, die zeigten, dass offenbar unspezifische Interaktionen des Ago Proteins mit einzelsträngigen Bereichen von *target* RNAs stattfinden.

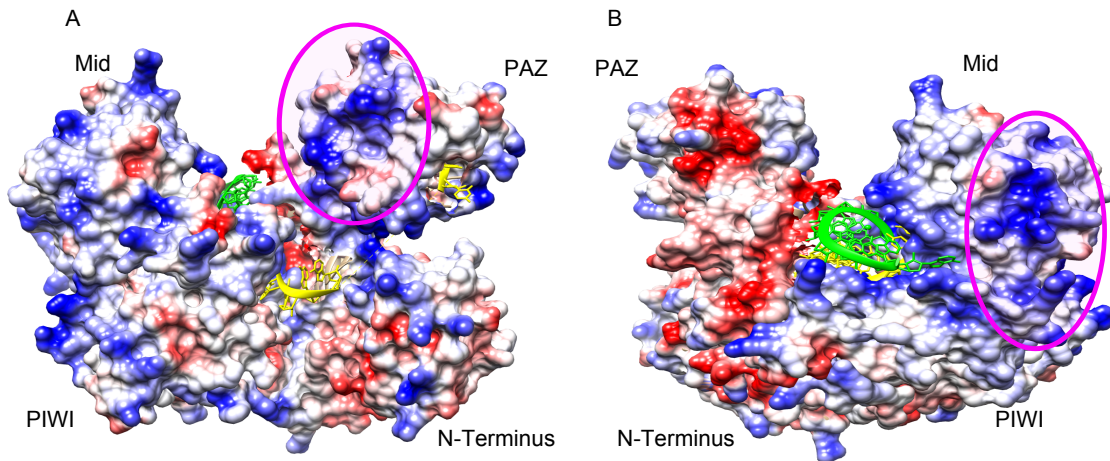
#### 5.3.1. Mit langer *target* RNA kann die Assoziation ternärer Komplexe den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spaltreaktion darstellen

Mit einer kurzen *target* RNA, die in ihrer Länge der *passenger* RNA entspricht, konnte festgestellt werden, dass unter *multiple turnover* Bedingungen die Freisetzung der Spaltprodukte den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spaltung darstellt<sup>(218)</sup> (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Dies wurde bereits früh vermutet<sup>(61,102,107)</sup>.

Transiente Bindungsexperimente zur Untersuchung der ternären Komplexbildung mit einer 140 nt langen *target* RNA zeigten, dass dies mit einer langen *target* RNA anders sein kann. Die Ratenkonstante der dritten Phase der Assoziation ternärer hAgo2-*guide-target* Komplexe ist signifikant erniedrigt, was diesen Prozess zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der



Spaltreaktion macht (siehe Abschnitt 4.2.4.1). Diese Phase repräsentiert die erweiterte Basenpaarung zwischen *guide* und *target* RNA, die zur Freisetzung des *guide* Strang 3'-Endes aus der PAZ Domäne führt. Im Gegensatz dazu sind die Dissoziationsratenkonstanten ternärer hAgo2-*guide*-*target* Komplexe mit einer langen im Vergleich zu einer kurzen *target* RNA jeweils um eine Logstufe beschleunigt. Offenbar führen die möglichen zusätzlichen Kontakte einer langen *target* RNA zu hAgo2 nicht zu einer Festigung der Bindung zwischen binären hAgo2-*guide* Komplexen und einer *target* RNA. Im Gegenteil ist eine Reduktion der Affinität binärer Komplexe für die *target* RNA in Abhängigkeit von ihrer Länge zu beobachten (siehe Abschnitt 4.2.4.2).



**Abbildung 5.2.: Oberflächenpotential des humanen Ago2.** Positiv geladene Oberflächen sind blau, negativ geladene Oberflächen rot gekennzeichnet. Die *guide* RNA ist gelb und die *target* RNA grün eingefärbt. Magenta gekennzeichnet sind Bereiche, in denen potentiell Kontakte mit einer langen *target* RNA stattfinden können. Röntgenkristallstruktur von hAgo2 in Komplex mit einer 21 nt *guide* RNA und einer 11 nt *target* RNA (PDB: 4W5T). A) Frontansicht B) Rückansicht.

Da es sich bei der verwendeten ICAM IVT *target* RNA um einen *target* Strang mit einer sehr gut zugänglichen Bindungsstelle für die *guide* RNA handelt<sup>(99)</sup>, impliziert dies, dass die Veränderung der Ratenkonstanten nicht auf eine durch Sekundärstrukturen gestörte Bindung von *guide* und *target* zurückzuführen ist. Ameres et al.<sup>(107)</sup> stellten die Hypothese auf, dass der RISC auf der Suche nach passenden *target* RNAs sequenzunabhängige unspezifische Kontakte mit potentiellen *target* RNAs eingehen kann. Diese Kontakte sind vermutlich der Grund dafür, dass die dritte Phase der ternären Komplexbildung verlangsamt ist. Mögliche unspezifische Assoziationen müssten gelöst werden, damit eine erweiterte Basenpaarung zwischen *guide* und *target* RNA stattfinden kann. Die beschleunigte Dissoziation ternärer Komplexe mit langer *target* RNA (siehe Abschnitt 4.2.4.1) wird vermutlich durch von *guide*-*target* Duplex-unabhängigen Kontakten der *target* RNA mit hAgo2, die zu einer Schwächung der Interaktion zwischen *guide* und *target* RNA führen könnten, verursacht. Die *guide*-*target* Wechselwirkungen können nur dann geschwächt werden, wenn der Duplex im Protein verändert wird. Eine an einen binären Komplex gebundene *target* RNA, die lang genug ist, Kontaktflächen des Proteins zu erreichen, könnte somit dazu führen, dass das Protein eine Konformation einnimmt, in der es in der Lage ist, mit dem Duplex zu interferieren. In Abbildung 5.2 sind Bereiche gekennzeichnet, von denen anhand ihres elektrostatischen Potentials davon ausgegangen werden kann, dass sie in der Lage sind, mit der negativ geladenen *target* RNA zu interagieren. In der gezeigten

Röntgenkristallstruktur des humanen Ago Proteins in Komplex mit einem RNA *guide* und einer kurzen *target* RNA ist im Bereich der Mid Domäne zu erkennen, dass die *target* RNA in einem positiv geladenen Kanal auf die Oberfläche der Mid Domäne geleitet wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konformation von ternären Komplexen stark von der Beschaffenheit der *target* Stränge abhängt. Um somit die kinetischen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zu vergleichen, ist die Beachtung der *target* RNA Länge unabdinglich.

### 5.3.2. Lange *target* Stränge können die Konformation ternärer Komplexe beeinflussen

Schon mit dem Standard si2b System, welches zur Ausbildung von nur einem Spaltprodukt führt, konnte festgestellt werden, dass die Verwendung eines langen *target* Stranges die Konformation ternärer Komplexe signifikant beeinflusst (siehe oben). Experimente mit verschiedenen *guide* Strängen konnten zeigen, dass mit einem längeren *target* Strang die Positionierung des *guide-target* Duplexes im Protein fixiert werden kann.

### Lange *target* Stränge können die Positionierung des *guide-target* Duplexes im Ago Protein beeinflussen

Die transientenkinetische Analyse der Assoziation ternärer MjAgo-let7 *guide-target* Komplexe mit einer 40 nt langen *target* DNA zeigt, dass eine lange *target* DNA im Gegensatz zu einer kurzen Variante in einem dreiphasigen statt einem vierphasigen Prozess gebunden wird. Dabei rückt wieder die Bedeutung des 5'-Nukleotids in den Fokus. Ist 5'-terminal ein Guanin zu finden, so fehlt die neu detektierte vierte Phase, welche vermutlich die ungenaue Positionierung des *guide-target* Duplex reflektiert (siehe oben). Spaltexperimente zeigten, dass hauptsächlich das kanonische Spaltprodukt zu finden ist und nur ein sehr kleiner Anteil an anderen Spaltprodukten gebildet wird (siehe Abschnitt 4.2.4.3). Dies impliziert, dass ein langer *target* Strang dazu in der Lage ist, durch Bindung an den binären Komplex einen *guide* Strang zu fixieren und in die richtige Position zu bringen. Dies ist allerdings nur mit dem 5'-terminalen Guanin möglich. Trägt die *guide* DNA an ihrem 5'-Terminus ein Thymin, ist auch mit einer langen *target* DNA die neue vierte Phase detektierbar. Offenbar ist ein *guide* Strang mit einem 5'-Thymin so flexibel, dass auch die Bindung eines langen *target* Strangs nicht zu einer Fixierung führt. Dies spiegelt sich in den Spaltprodukten wider. Es existieren vier verschiedene Spaltprodukte, die alle eine ähnliche Intensität aufweisen (siehe Abschnitt 4.2.4.3). Dieses Ergebnis erhärtet weiterhin die Hypothese, dass MjAgo möglicherweise eine Präferenz für ein Guanin am 5'-Ende aufweist.

Weitere Experimente wurden mit hAgo2 und einer 150 nt *target* RNA durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei Verwendung verschiedener *guide* Stränge mit einer jeweils komplementären kurzen 21 nt *target* RNA mehrere Spaltprodukte bei einer teilweise sehr geringen Spalteffizienz erzielt wurden (siehe Abschnitt 4.2.3.5). Wurde jedoch die 150 nt *target* RNA statt der kurzen *target* RNA verwendet, wurde nur ein Spaltprodukt mit einer höheren Spalteffizienz erzielt (siehe Abschnitt 4.2.4.3). Dies unterstützt ebenfalls die Vermutung, dass eine lange *target* RNA durch zusätzliche Kontakte zum Protein bei einer stabilen Positionierung des *guide-target* Duplex assistieren könnte. Möglicherweise könnte dies auch mit MjAgo eindeutiger beobachtet

werden, wenn eine längere *target* DNA eingesetzt werden würde. Mit 40 nt Länge ist die *target* DNA im Vergleich zu den in den mit hAgo2 durchgeführten Experimenten genutzten langen *target* RNAs (140 - 150 nt) relativ kurz.

### **Die Freisetzung des 3'-Endes der *guide* DNA aus der PAZ Domäne ist keine Grundvoraussetzung für die Spaltung eines *target* Stranges**

Sowohl die hier gezeigten Analysen (siehe Abschnitt 5.1.3) als auch die Studien anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Bildung katalytisch aktiver ternärer Komplexe mit der Freisetzung des *guide* Strang 3'-Endes aus der PAZ Domäne einhergeht<sup>(139,161)</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch experimentelle Evidenz gewonnen werden, die darauf hinweist, dass dies nicht in allen Fällen notwendig ist. Transientenkinetische Untersuchungen der Bildung ternärer MjAgo-*guide-target* Komplexe mit einer 40 nt *target* DNA und einem 5'-terminalen Thymin am let7 *guide* zeigen im Vergleich zur ternären Komplexbildung mit einer kurzen *target* DNA statt vier nur drei Phasen. Es fehlt die Phase der Komplexbildung, welche die Freisetzung des 3'-Endes der *guide* DNA von der PAZ Domäne repräsentiert.

Röntgenkristallstrukturen des TtAgo Proteins im Komplex mit *guide* und *target* DNA zeigen, dass für die Einnahme einer spaltungskompetenten Konformation eine mindestens 14 Basenpaare umspannende Duplexbildung erforderlich ist. Im Zuge dieser Basenpaarung wird auch das 3'-Ende der *guide* DNA aus der PAZ Domäne entlassen<sup>(59)</sup>. Im Fall des ternären Komplexes mit einem 5'-Thymin-tragenden let7 *guide* Strang scheint dies aber nicht unabdingbar zu sein. Die lange *target* DNA beeinflusst die Positionierung des Duplexes möglicherweise so, dass eventuell mit einer geringeren Anzahl an Basenpaaren zwischen *guide* und *target* DNA eine Spaltung stattfinden kann. Sheng et al.<sup>(59)</sup> konnten zeigen, dass mit nur einem Basenpaar weniger das *guide* 3'-Ende mit der PAZ Domäne assoziiert bleibt. Dann allerdings ist der Glutamatfinger nicht in der richtigen Position für eine Spaltung des *target* Strangs. Anders als bei den eubakteriellen Ago Proteinen ist der Glutamatfinger in den humanen Ago Proteinen jedoch schon im binären Komplex in der sogenannten *plugged-in* Konformation<sup>(111,146)</sup>. Über die Situation in archaeeellen Proteinen gibt es bislang keine Informationen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Konformation des Ago Proteins durch die lange *target* DNA so verändert wird, dass trotz erweiterter Basenpaarung keine Dissoziation von der PAZ Domäne stattfinden muss.

### **Abhängig vom 5'-terminalen *guide* Nukleotid kann die Affinität binärer Komplexe für lange *target* Stränge moduliert werden**

Mit einer kurzen *target* DNA konnten keine vom 5'-terminalen Nukleotid des *guide* Strangs abhängigen Unterschiede in den Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ternärer MjAgo-*guide-target* Komplexe detektiert werden (siehe Abschnitt 4.2.3.2). Dies verändert sich mit einer 40 nt *target* DNA (siehe Abschnitt 4.2.4.2). Ein 5'-terminales Thymin führt zu einer höheren Affinität binärer Komplexe für die 40 nt *target* DNA, während ein Guanin am 5'-Terminus eine Schwächung der Interaktion von *guide* und *target* DNA im ternären MjAgo-*guide-target* Komplex verursacht.

Wie in den vorherigen Kapiteln diskutiert wurde, könnte die lange *target* DNA durch über den *guide-target* Duplex hinausgehende Kontakte zum Ago Protein möglicherweise Einfluss auf die Konformation ternärer Komplexe nehmen (siehe oben). In Abbildung 5.2 B ist zu erkennen, dass die Überhänge der *target* RNA über einen positiv geladenen Kanal auf der Oberfläche der Mid Domäne positioniert werden könnten. Es ist denkbar, dass sich diese Kontaktfläche in Abhängigkeit des 5'-Nukleotids verändern und so zu einer anderen Positionierung der *target* Überhänge führen könnte. Die lange *target* DNA könnte so unterschiedliche Konformationen des ternären Komplexes induzieren, die entweder zu einer festeren oder einer schwächeren Interaktion des *target* Strangs mit dem binären Komplex führen könnte.

Der Großteil der Bindungsenergie zwischen binären Ago-*guide* Komplexen und einem *target* Strang stammt aus der Basenpaarung im Bereich der *seed* Region<sup>(142,173)</sup>. Es liegt also die Vermutung nahe, dass die durch die verschiedenen 5'-Nukleotide verursachten Änderungen den *seed* Bereich des *guide-target* Duplexes beeinflussen. Möglicherweise wird durch die Assoziation mit der Kontaktfläche auf der Mid Domäne die zum NSL korrespondierende Schleife verändert, was zu einer Schwächung oder Blockade der Basenpaarung mit dem zweiten Nukleotid führen könnte. Dies könnte die verringerte Affinität binärer Komplexe mit einem 5'-G *guide* Strang für lange *target* DNA um Faktor 5 erklären. Größere Unterschiede in den Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wären, wie in wie Messungen der Gruppe um P. Zamore<sup>(173)</sup> demonstriert werden konnte, bei einer Störung der Basenpaarung im zentralen Bereich der *seed* Region erwartet worden.

### **Lange *target* RNAs schützen ternäre Komplexe vor Aggregation**

Das rekombinante humane Ago2 zeigt *in vitro* eine leichte Neigung zur Aggregation<sup>(218)</sup> (siehe Abschnitt 4.2.1.4 und 4.2.4.4). Dies ist besonders ausgeprägt, wenn weder *guide* noch *target* RNAs an das Protein gebunden sind. Katalytisch aktive Komplexe werden im Gegensatz dazu vor Aggregation geschützt<sup>(218)</sup>. Dies konnte im Rahmen der in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimente bestätigt werden. Die Zugabe von *guide* RNAs und kurzen oder langen *target* RNAs führte zur Auflösung der Aggregate, die mit hAgo2 in Abwesenheit von Nukleinsäuren gebildet werden (siehe Abschnitt 4.2.4.4).

Sobald jedoch die Konzentration der kurzen *target* RNA die Konzentration der binären Komplexe übersteigt, ist Aggregation zu beobachten. Die sich bildenden Aggregate sind 1,5 mal so groß wie die in Abwesenheit von RNAs gebildeten Aggregate. Kann die kurze *target* RNA nicht an einen binären Komplex binden, kommt es scheinbar zur Nukleinsäure-induzierten Aggregation. Vermutlich lagert sich die kurze *target* RNA unspezifisch auf der basischen Oberfläche des Proteins an, sodass sich mehrere Proteine zusammenlagern und große Aggregate bilden können.

Mit einer langen *target* RNA ist dies so nicht zu beobachten. Bei einer Konzentration an *target* RNA, die doppelt so hoch ist wie die Konzentration binärer Komplexe, führt eine lange *target* RNA noch nicht zur Aggregation. Die ternären Komplexe liegen auch bei dieser Konzentration in Monomeren vor. Bei einer Konzentration, die das Vierfache der Konzentration binärer Komplexe beträgt, konnte auch mit einer langen *target* RNA Aggregation ternärer Komplexe

beobachtet werden. Die dabei gebildeten Komplexe sind allerdings etwas kleiner als die, die auch in Abwesenheit von Nukleinsäuren gebildet werden. Im Gegensatz zu kurzen *target* RNAs führen lange *target* RNAs nicht zur durch Nukleinsäuren verstärkten Aggregation.

Anhand des Einflusses des 5'-Nukleotids auf die Bildung ternärer Komplexe mit einer langen *target* DNA konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass spezifische Kontaktstellen für die Assoziation mit den einzelsträngigen Überhängen der *target* DNA vorhanden sind (siehe Abbildung 5.2). Durch einen an einen binären hAgo2-*guide* Komplex gebundenen komplementären langen *target* Strang werden diese möglicherweise belegt und stünden so nicht mehr für die Interaktion mit anderen komplementären *target* Strängen zur Verfügung. Dies ist vermutlich mit kurzen komplementären *target* Strängen nicht möglich, sodass, obwohl ein kurzer *target* Strang an den binären Komplex gebunden ist, weitere *target* Stränge mit möglichen Kontaktflächen des Proteins interagieren könnten. Dies könnte zu einer Nukleinsäure-induzierten Aggregation ternärer Komplexe führen, sobald die Konzentration der *target* RNA die Konzentration der freien binären Komplexe übersteigt. Auch mit langer *target* RNA ist eine Aggregation ternärer Komplexe zu beobachten. Da dies allerdings erst bei höheren Konzentrationen als mit kurzer *target* RNA auftritt, impliziert dies, dass die lange *target* RNA ternäre Komplexe besser vor Aggregation schützt.

## 5.4. Grundlagen der Regulation der *passenger* RNA Spaltung durch hAgo2

Im zellulären Kontext werden doppelsträngige siRNAs auf hAgo2 geladen. Ein Strang wird als *guide* RNA ausgewählt, der andere sogenannte *passenger* Strang wird vermutlich gespalten und dann eliminiert<sup>(55–57)</sup>. Genauerer zu einer möglichen Regulation dieses Mechanismus ist bislang nicht bekannt. Erste Erkenntnisse zur Regulation der *passenger* Spaltung liefert diese Promotionsarbeit.

### 5.4.1. Ein *target* RNA Überschuss beschleunigt die Dissoziation der *passenger* RNA durch einen möglichen „Stranginvasions“-Mechanismus

Unter den für diese Promotionsarbeit gewählten Standardbedingungen im Spaltexperiment mit einer relativ niedrigen Konzentration an *target* RNA ist eine Spaltung der *passenger* RNA zu erkennen. Sie stellt in diesem Experiment die Grundvoraussetzung für die Bindung und Spaltung der langen *target* RNA dar (siehe Abschnitt 4.2.1.4), wie es durch andere bereits beschrieben wurde<sup>(55–57)</sup>. Wird jedoch die Konzentration der *target* RNA erhöht, wird die *passenger* RNA nicht mehr gespalten (siehe Abschnitt 4.2.4.3). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die *target* RNA möglicherweise mit dem binären hAgo2-siRNA Komplex interagiert und die *passenger* Dissoziation derartig beschleunigt, dass eine Spaltung durch hAgo2 nicht mehr stattfinden kann. Bei Komplementarität zur *guide* RNA könnte die *target* RNA durch einen möglichen „Stranginvasions“-Mechanismus zur beschleunigten Freisetzung der *passenger* RNA führen. Ein solcher „Stranginvasions“-Mechanismus wurde bereits durch die Arbeiten von W. Wünsche und G. Sczakiel 2005 impliziert<sup>(230)</sup>. Sie postulierten, dass die Bindung einer *target* RNA an

## 5. Diskussion

einen binären hAgo2-siRNA Komplex einem assoziativen Modell folgt. Gemäß dieser Annahme trifft ein binärer hAgo2-siRNA Komplex auf eine komplementäre *target* RNA und ein Strangaus-tausch zwischen *passenger* RNA und *target* RNA erfolgt.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch einen Überschuss an komplementärer *target* RNA auch die Dissoziation von *target* Strängen aus ternären hAgo2-*guide-target* Komplexen beschleunigt werden kann (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Im Gegensatz zur *passenger* Strang Dissoziation in Anwesenheit von komplementärer *target* RNA ist diese jedoch vermutlich nicht schnell genug, um eine Freisetzung vor erfolgter Spaltung der *target* RNA zu verursachen. Die Anwesenheit eines großen Überschusses an komplementärer *target* RNA führt zu einer Beschleunigung der jeweiligen Ratenkonstanten der *target* Freisetzung um Faktor 10 (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Damit ist die Freisetzung der *target* RNA immer noch sehr langsam und stellt eine Limitation für den *target* Umsatz dar, was biologisch sinnvoll ist, da hAgo2 als *multiple turnover* Enzym gewährleisten muss, dass ein *target* Strang gespalten werden kann, bevor er wieder dissoziiert<sup>(57,60,61,102)</sup>. Die Interaktionen von hAgo2 mit einem siRNA Duplex unterscheiden sich somit vermutlich deutlich von denen des Proteins mit einem *guide-target* Duplex.

Die biologische Funktion eines möglichen „Stranginvasions“-Mechanismus könnte die Bereitstellung binärer Komplexe sein, die komplementär zu einem in hoher Konzentration vorliegenden *target* Strang sind. Die siRNA ist ubiquitär vorhanden und kann durch hAgo2 gebunden werden. Der Doppelstrang wird jedoch um Faktor 7 schlechter gebunden als eine einzelsträngige *guide* RNA<sup>(218)</sup>. Ist der *passenger* Strang also entlassen, bleibt der *guide* Strang gebunden und wird kaum durch andere doppelsträngige siRNAs kompetiert, da diese mit einer wesentlich geringeren Affinität an hAgo2 binden als der Einzelstrang. Aus diesem Grund ist eine Regulation der *passenger* Freisetzung essentiell, um nur die binären Komplexe zu assemblieren, die tatsächlich ein zu regulierendes *target* in der Zelle besitzen.

Bis eine *passenger* RNA gespalten und entlassen ist, dauert es relativ lange, da die Freisetzung der Spaltprodukte ein sehr langsamer Prozess ist (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Die *passenger* RNA einer an hAgo2 gebundenen siRNA, deren zu regulierende *target* RNA in einer relativ hohen lokalen Konzentration vorliegt, könnte mit Hilfe des postulierten „Stranginvasions“-Mechanismus beschleunigt aus dem binären Komplex freigesetzt werden, sodass *target* RNAs gebunden und gespalten werden können. Dadurch wäre ein schneller Start der Regulation möglich. Neben der Freisetzung einer *passenger* RNA kann auch die Freisetzung einer *target* RNA aus dem ternären Komplex in Anwesenheit eines Überschusses an komplementärer *target* RNA beschleunigt werden (siehe oben und Abbildung 4.8). Diese Erkenntnisse und die weiteren in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Assoziation und Dissoziation ternärer hAgo2-*guide-target* Komplexe bildeten die Basis für die *in silico* Modellierung der siRNA-vermittelten RNAi<sup>(231)</sup>. Im Rahmen eines assoziativen Modells können mit Unterstützung der in der vorliegenden Promotionsarbeit erhobenen kinetischen Daten die im Kontext der RNAi im zellulären System beobachteten Vorgänge mathematisch beschrieben werden. Dieses Modell berücksichtigt die *in vitro* detektierte *target* Strang-abhängige Beschleunigung der Produktfreisetzung aus ternären hAgo2-*guide-target* Komplexen und erklärt so die in lebenden Zellen beobachteten hohen *multiple turnover* Geschwindigkeiten der siRNA-basierten *target* Regulation. Dies

unterstreicht zusätzlich die Bedeutung eines möglichen „Stranginvasions“-Mechanismus für eine effiziente siRNA-vermittelte Regulation von *target* RNAs.

Auch mit MjAgo konnte beobachtet werden, dass die Dissoziation von *target* DNAs beschleunigt wird, wenn ein Überschuss an ungebundener komplementärer *target* DNA vorliegt (siehe Abschnitt 4.2.2.3). Demzufolge wird postuliert, dass ein möglicher „Stranginvasions“-Mechanismus auch in prokaryotischen Organismen auftreten könnte.

## 5.5. Die Bedeutung der katalytischen Tetrade von hAgo2 für die Spaltung von *target* RNAs

Die vier Aminosäuren Asp597, Glu637, Asp669 und His807 konstituieren das aktive Zentrum von hAgo2<sup>(123,146,151)</sup>. Zunächst wurde angenommen, dass es sich um eine katalytische Triade handelt, bis durch die Gruppe um Patel in der Röntgenkristallstruktur von kpAgo der sogenannte Glutamatfinger entdeckt wurde, der die katalytische Tetrade vervollständigt<sup>(146)</sup>. Damit konnte eine RNase H-ähnliche Faltung der PIWI Domäne bestätigt werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass schon die Mutation einer Aminosäure der katalytischen Tetrade ausreichend ist, um die Spaltaktivität von hAgo2 auszuschalten<sup>(104,146,162,221,232)</sup>.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die Bedeutung dieser Aminosäuren für die hAgo2-vermittelte Spaltung weiter untersucht. Die *pre-steady state* Messungen zur Etablierung eines minimal mechanistischen Modells wurden in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> bzw. mit sehr niedrigen Konzentrationen von Mg<sup>2+</sup> durchgeführt, sodass keine Spaltung der *target* RNA stattfinden konnte. Unter diesen nicht-spaltenden Bedingungen konnte mit Hilfe der transienten Bindungsexperimente die Assemblierung ternärer hAgo2-*guide-target* Komplexe in drei Phasen unterteilt werden (siehe Abschnitt 4.2.1.2)<sup>(218)</sup>. Dabei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine vierte Transition im Rahmen der Bildung ternärer hAgo2-*guide-target* Komplexe stattfindet, die im direkten Zusammenhang mit für die Spaltung von *target* RNAs notwendigen Umlagerungen steht. Aus diesem Grund wurden hAgo2 Proteine mit Mutationen in der katalytischen Tetrade verwendet, um mit einer erhöhten Magnesiumkonzentration, die die Spaltung von *target* RNAs durch hAgo2 ermöglicht, transiente Bindungsmessungen zum ternären Komplex durchzuführen.

Eine Überprüfung der hAgo2-Mutanten ergab, dass im Standardspalttest kaum eine Veränderung der Spaltaktivität zu erkennen ist. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass eine Messung der Spaltaktivität von hAgo2 nur unter *multiple turnover* Bedingungen möglich ist (siehe Abschnitt 4.3.1). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Spaltreaktion ist unter diesen Bedingungen mit  $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (siehe Abschnitt 4.2.1.2 und 4.2.4.1) relativ langsam. Da die Faltung der PIWI Domäne derjenigen der RNase H ähnelt, wird davon ausgegangen, dass die Geschwindigkeit der Spaltung durch hAgo2 in einer vergleichbaren Größenordnung liegt. Die Geschwindigkeit liegt für die RNase H Domäne der HIV-1 Reversen Transkriptase bei  $10 \text{ s}^{-1}$ <sup>(106)</sup>. Der Austausch einer Aminosäure muss also mindestens zu einer Verlangsamung der für die eigentliche Spaltreaktion notwendigen Umlagerungen im aktiven Zentrum um Faktor

## 5. Diskussion

$33 \times 10^3$  führen, damit im verwendeten Standardspalttest Auswirkungen zu beobachten sind. Daher war die beobachtete Spaltaktivität nicht überraschend.

In transientenkinetischen Messungen konnte jedoch unter Bedingungen, die eine Spaltung der *target* RNA ermöglichen, die vermutete vierte Transition der Bildung ternärer hAgo2-*guide-target* Komplexe gezeigt und mit Hilfe der hAgo2-Proteine mit Mutationen im aktiven Zentrum näher charakterisiert werden (siehe Abschnitt 4.3.1). Mit steigender Anzahl von Mutationen in der katalytischen Tetrade wurde eine deutliche Reduktion der Ratenkonstante dieser Phase festgestellt (siehe Tabelle 4.15). Es wird postuliert, dass diese Phase konformationelle Umlagerungen, die für die Spaltung von *target* RNAs notwendig sind, repräsentiert, da sie vermutlich zu langsam ist, um den eigentlichen chemischen Schritt der Spaltung darzustellen. Die für diese vierte Phase gemessenen Ratenkonstanten sind auch mit Mutationen im aktiven Zentrum wesentlich schneller als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Spaltreaktion, was die Hypothese bekräftigt, dass unter den hier verwendeten Bedingungen ein Einfluss auf die Spaltung nicht erkennbar ist. Eine hAgo2-Mutante mit drei Mutationen im aktiven Zentrum zeigt diese vierte Phase nicht. Da aber trotzdem Spaltung zu erkennen ist, ist davon auszugehen, dass die Phase nicht gemessen werden kann, weil sie in ihrer Geschwindigkeit dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spaltreaktion entspricht. Aus diesem Grund werden diese zwei distinkten Phasen mathematisch in einer Phase zusammengefasst. Selbst diese drastische Reduktion der Ratenkonstante bei drei Mutationen im aktiven Zentrum von  $0,4 \text{ s}^{-1}$  um etwa Faktor 1000 auf etwa  $0,0003 \text{ s}^{-1}$  ist im verwendeten Spaltexperiment nicht sichtbar. Das Fehlen einer vollständigen Blockade der Spaltreaktion könnte zum Einen darauf zurückzuführen sein, dass die für die Spaltung notwendigen Magnesiumionen mit durch die Nukleinsäuren koordiniert werden<sup>(59)</sup>. Zum Anderen können möglicherweise andere Aminosäurereste bzw. Wassermoleküle bei der Koordination assistieren, was allerdings nicht optimal ist und so zu einer verminderten Geschwindigkeit führt. In Abwesenheit weiterer Faktoren, welche den *target* Umsatz beschleunigen könnten, ist der Einfluss der Mutationen in der katalytischen Tetrade im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Spaltexperimente folglich nicht erkennbar. Dazu kommt das Problem, dass die hAgo2 Präparationen in ihrer Aktivität jeweils leicht schwanken. Sind also nur leichte Veränderungen durch die Mutationen erkennbar, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass diese auf Präparations-bedingte Artefakte zurückzuführen sind.

Die transientenkinetischen Experimente zeigen, dass unter Bedingungen, die eine Spaltung der *target* RNA ermöglichen, im Rahmen der Bildung ternärer hAgo2-*guide-target* Komplexe eine vierte Transition stattfindet. Mit Hilfe von *pre-steady state* Messungen war außerdem ein direkter Effekt der Mutationen im aktiven Zentrum von hAgo2 auf diese vierte Phase nachweisbar. Diese Analysen weisen darauf hin, dass die neu entdeckte Transition im direkten Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität von hAgo2 steht und möglicherweise die Voraussetzung für die Spaltung darstellt. Diese vierte Transition konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter charakterisiert werden. Möglicherweise müsste allerdings, nach einer detaillierten Charakterisierung, das mechanistische Modell um eine vierte Phase erweitert werden.



## 5.6. Die Bedeutung der L2 Linker Domäne für die Funktion von hAgo2

Röntgenkristallstrukturen des humanen Ago2, welches im binären Komplex mit einer *guide* RNA vorliegt<sup>(123,151)</sup> oder im ternären Komplex an kurze *target* RNAs gebunden ist<sup>(142)</sup>, zeigen, dass die L2 Linker Region eine wichtige Rolle für die Aktivität des hAgo2 Proteins spielt. In der vorliegenden Promotionsarbeit wird die Funktion der L2 Linker Domäne mit Hilfe von biochemischen Analysen näher beleuchtet.

### 5.6.1. Eine Interaktion zwischen der L2 Linker Domäne und der Mid Domäne stabilisiert hAgo2

Flexibilität ist ein universelles Kennzeichen der Ago Proteine aller drei Domänen des Lebens und notwendig, um die Funktionalität des Proteins zu gewährleisten. Im Rahmen der Bindung von *guide* und *target* Strängen durchläuft das Ago Protein große konformationelle Änderungen<sup>(89,90,139,142,161,166)</sup>. Besonders große Mobilität wurde dabei in der PAZ Domäne nachgewiesen<sup>(92,141)</sup>. Im Rahmen des Zyklus von *target* Erkennung, Bindung, Spaltung und Freisetzung der Spaltprodukte verändern sich die Kontakte der Ago Proteine zu den Nukleinsäuresubstraten insbesondere im Bereich der PAZ Domäne<sup>(139,161)</sup> (siehe oben und Abbildung 2.13). Im Kontext der Promotionsarbeit von Dr. M. Kalia<sup>(220)</sup> konnte im Rahmen von MD Simulationen eine Wechselwirkung des Asp358 der Helix 7 in der L2 Linker Region mit dem Lys525 des NSL der Mid Domäne über eine Salzbrücke gezeigt werden. Im Zuge der Mutation des Asp358 zu einem Alanin konnte eine erhöhte Flexibilität der PAZ Domäne in den MD Simulationen beobachtet werden.

Biochemische Analysen der Bedeutung der Interaktion zwischen der Helix 7 der L2 Linker Domäne und dem NSL der Mid Domäne erfolgten mit Hilfe von hAgo2 Mutanten, in denen entweder das Asp358 oder das Lys525 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. In Spaltexperimenten zeigte sich, dass die Mutation des Lysins zu einer Reduktion der Spaltung von *target* RNAs im Vergleich zum Wildtyp hAgo2 führt. Während mit hAgo2 nach zwei Stunden Inkubationszeit über 80 % Umsatz der *target* RNA erreicht werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.1.4), konnte mit hAgo2-K525A nach zwei Stunden maximal ein Umsatz von etwa 40 % generiert werden (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Eine erhöhte Neigung zur Aggregation in Abwesenheit der Salzbrücke könnte den niedrigeren Umsatz von *target* RNA mit der hAgo2-K525A Mutante erklären. Wird die Aminosäure Asp358 mutiert, ist keine Spaltung von *target* RNAs mehr zu beobachten. Neben der Stabilisierung von hAgo2 durch die Salzbrücke mit dem Lys525 hat das Aspartat vermutlich noch andere Funktionen im Protein.

### Asp358 ist entscheidend für die Positionierung der *guide* RNA

Es zeigte sich, dass mit hAgo2-D358A keine korrekte Positionierung der *guide* RNA im binären Komplex und somit weder eine Assemblierung katalytisch aktiver ternärer Komplexe noch eine Spaltung von *target* RNAs beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Da diese

Effekte nicht allein auf die fehlende Salzbrücke zwischen dem Asp358 und dem Lys525 zurückzuführen sind, wurde die Helix 7 mit Hilfe des Chou-Fasman Algorithmus genauer untersucht (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Es zeigte sich, dass diese durch die Einführung eines Alanin, welches eine der Aminosäuren mit dem stärksten möglichen Helixpotential darstellt<sup>(222)</sup>, signifikant verlängert werden könnte.

Weiterhin ist an Hand der Messungen zum binären und ternären Komplex mit hAgo2-D358A zu erkennen, dass der *guide* Strang nicht korrekt positioniert wird. Im Rahmen der Bildung binärer Komplexe ist nur noch die Assoziation mit der Mid Domäne zu beobachten. Die Assoziation mit der PAZ Domäne findet nicht statt. Bei Zugabe von *target* RNA zu diesen ternären Komplexen assoziieren die Nukleinsäuren nicht im hAgo2 Protein, sondern frei in Lösung, so dass keine Dissoziation der Nukleinsäuren beobachtet werden kann (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Eine Dissoziation der Nukleinsäuren findet in Abwesenheit von hAgo2 nicht statt<sup>(218)</sup>. Dies impliziert, dass die PAZ Domäne nicht einfach so positioniert wird, dass sie durch den *guide* Strang nicht mehr erreicht werden kann, denn dies würde eine Basenpaarung in der *seed* Region und eine anschließende Dissoziation ermöglichen, wie an Hand der hAgo2-PAZ9 Mutante gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.1.2).

Insgesamt führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass die Veränderungen in der Helix 7 vermutlich den Nukleinsäure-Bindungskanal blockieren, sodass eine *guide* RNA zwar mit ihrem 5'-Terminus die Mid Bindungstasche erreichen kann, aber eine Positionierung der *seed* Region im hAgo2 Protein nicht mehr möglich ist. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum Einen könnte sich die verlängerte Helix 7 über den Nukleinsäure-Bindungskanal schieben und so die Bindung der *guide* RNA verhindern. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, dass die Helix 7 zu einer Delokalisation der PAZ Domäne führt. Diese könnte dann ebenfalls den Nukleinsäure-Bindungskanal blockieren. Möglicherweise ist auch eine Kombination beider Prozesse zu beobachten. Bekräftigt werden diese Hypothesen durch Röntgenkristallstrukturen des hAgo2 Proteins in Komplex mit einer *guide* und einer verkürzten *target* RNA. Es ist zu erkennen, dass sich die Helix 7 zusammen mit der PAZ Domäne wie ein fester Körper bewegt<sup>(142)</sup>, was die Annahme bestätigt, dass eine Veränderung der Helix 7 zu einer Delokalisierung der PAZ Domäne führen kann. Die MD Simulationen von Dr. M. Kalia<sup>(220)</sup> deuten ebenfalls auf eine erhöhte Flexibilität der PAZ Domäne als Ursache für die mit hAgo2-D358A beobachteten Effekte.

### 5.6.2. Die Aminosäure Ile365 assistiert bei der Positionierung der siRNA

Das Ile365 am Ende der Helix 7 in der L2 Linker Region führt im binären Komplex einen Knick zwischen Nukleotid 6 und 7 ein und unterbricht so die Interaktionen zwischen den Basen in der *seed* Region<sup>(123,151)</sup>. Im ternären Komplex muss sich die Helix 7 um 4 Å bewegen, um eine Kollision mit den Nukleotiden der *target* RNA zu vermeiden, die sich gegenüber von Nukleotid 6 und 7 der *guide* RNA befinden. Dies führt gleichzeitig zu einer Relaxation des Knicks zwischen Nukleotid 6 und 7 der *guide* RNA, sodass eine erweiterte Interaktion der Basen in der *seed* Region ermöglicht wird<sup>(142)</sup>. Mit Hilfe von biochemischen Analysen wird in der vorliegenden Arbeit die biologische Funktion des Ile365 untersucht.

### **Ile 365 hält den *guide* Strang in Abwesenheit einer passenden *target* RNA in einem dissoziierbaren Status**

Dazu wurde die Bildung binärer Komplexe mit hAgo2-I365A analysiert. Es zeigte sich, dass insbesondere die Assoziation und Dissoziation von einzelsträngigen *guide* RNAs im Bereich der Mid Domäne stark beeinträchtigt ist. Die Assoziation an die Mid Domäne ist um Faktor 5 verlangsamt; die Ratenkonstante der Dissoziation von der Mid Domäne ist um Faktor 17 vermindert (siehe Abschnitt 4.3.2.2). Biologisch relevant ist vor allem die beeinträchtigte Dissoziation, wenn das Ile365 fehlt, da hAgo2 im zellulären Kontext an doppelsträngige siRNAs bindet<sup>(1)</sup>. Die Mutation des Ile365 zu einem Alanin führt vermutlich zu einer Relaxation des Knicks zwischen Nukleotid 6 und 7. Die sich ausbreitenden  $\pi - \pi$  Interaktionen zwischen den Basen im 5'-Bereich der *guide* RNA führen zu einer Stabilisierung dieses Bereiches im Protein und so zu einer erschwerten Dissoziation. Die biologische Funktion des durch das Ile365 eingeführten Knicks könnte somit die Gewährleistung eines dissoziierbaren Status der *guide* RNA in hAgo2 erlauben, solange keine komplementäre *target* RNA gebunden wird. Wird keine passende *target* RNA gebunden, kann der *guide* Strang wieder dissoziieren. Kommt es jedoch zu einer Bindung an eine passende *target* RNA, wird der *guide* Strang fest verankert, da der Knick in der *guide* RNA durch die weichende Helix 7 relaxiert wird<sup>(142)</sup>.

### **Ile365 assistiert bei der Positionierung von doppelsträngigen siRNAs**

Die Bindung einer doppelsträngigen siRNA durch hAgo2-I365A ist im Vergleich zum Wildtyp hAgo2 ebenfalls verändert (siehe Abschnitt 4.3.2.2). Die zweite Phase, welche die Mid Assoziation und die Positionierung im C-terminalen Bereich des Nukleinsäure-Bindungskanal repräsentiert, ist sehr ähnlich. Die dritte Phase ist dagegen um Faktor 5 verlangsamt. Dies impliziert, dass neben der Stabilisierung eines dissoziierbaren Status der *guide* RNA im hAgo2 Protein die Beeinflussung der Bindung einer doppelsträngigen siRNA eine wichtige Funktion der Aminosäure Ile365 darstellt. Um eine doppelsträngige siRNA binden zu können, sind große konformationelle Änderungen von hAgo2 notwendig. Dies ist anhand der Röntgenkristallstruktur binärer Komplexe aus hAgo2 und einzelsträngiger *guide* RNA zu erkennen. Die einzelsträngige RNA wird durch einen engen Kanal im N-terminalen Bereich des Proteins gefädelt<sup>(142)</sup>. Um Platz für den Doppelstrang zu schaffen, sind strukturelle Umlagerungen notwendig. Möglicherweise assistiert die L2 Linker Domäne mit Hilfe des Ile365 dabei, die siRNA in die richtige Position zu leiten, um die Voraussetzungen für diese Umlagerungen zu schaffen. Dies könnte die langsamere dritte Phase nach Mutation von Ile365 zu einem Alanin erklären.

## **5.7. Molekulare Grundlagen des Effekts der dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte siRNA-abhängige Spaltung von *target* RNAs**

Die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT greifen auf vielfältige Weise in den Mechanismus der RNAi ein. Verschiedene Studien diskutieren die Interaktion der beiden Proteine mit

Dicer und somit einen Einfluss der beiden Proteine auf eine Dicer-vermittelte Prozessierung von pre-miRNAs<sup>(49,90,200,202–204)</sup>. Die Wechselwirkungen zwischen hTRBP und Dicer dienen jedoch nicht nur der Regulation der Prozessierung der miRNA Vorläufer. Dicer und hTRBP bilden dabei auch eine Plattform für die Assemblierung des RISC, indem hTRBP hAgo2 zu diesen Komplexen rekrutiert<sup>(49)</sup>. Dabei stellen hTRBP und vermutlich auch hPACT eine Verbindung zwischen der Initiation und der Exekution der RNAi dar, wie es durch Liu et al.<sup>(206)</sup> für das hTRBP Homolog R2D2 postuliert wurde. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass sie an der Auswahl der *guide* RNA beteiligt sind<sup>(53,54,207)</sup>. Bis heute ist allerdings nicht bekannt, welchen Einfluss sie auf die Beladung von hAgo2 mit siRNAs sowie auf die nachfolgende Spaltung der *target* RNAs haben könnten. Die vorliegende Promotionsarbeit bietet erstmals Einblicke in diese Prozesse.

### 5.7.1. Charakterisierung der siRNA Bindung durch die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT

Sowohl hTRBP als auch hPACT binden mit einer hohen Affinität an siRNA Substrate und zeigen dabei sehr ähnliche Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (siehe Abschnitt 4.4.1.2). Während die in dieser Promotionsarbeit bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für hTRBP-siRNA Komplexe sehr gut zu Daten aus der Literatur passen<sup>(189,233)</sup>, sind die für die Bindung von hPACT an siRNA bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten, die in der Literatur zu finden sind, etwas niedriger<sup>(233)</sup>. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mit Hilfe verschiedener Methoden bestimmt wurden. Während die in dieser Promotionsarbeit bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mit Hilfe von Fluoreszenztitration bestimmt wurden, erfolgten die Messungen von Takahashi et al.<sup>(233)</sup> und Parker et al.<sup>(234)</sup> mittels Gelverzögerungsanalysen (EMSA), während Yamashita et al.<sup>(189)</sup> isothermale Kalorimetrie einsetzten. Die unterschiedliche Genauigkeit dieser Methoden könnte eine Begründung für die abweichenden Gleichgewichtsdissoziationskonstanten sein.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten konnte unter Gleichgewichtsbedingungen wie in den Studien von Parker et al.<sup>(234)</sup> ein einphasiger Verlauf der Bindung beobachtet werden. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass hTRBP in nicht-kooperativen Bindungsereignissen als Monomer an die siRNA bindet<sup>(234)</sup>, während es in Abwesenheit von dsRNAs in Dimeren vorliegt<sup>(47,235)</sup>. Im Gegensatz dazu wurde auf Grund der Untersuchungen von Takahashi et al.<sup>(233)</sup> und Yamashita et al.<sup>(189)</sup> mit hTRBP ein zweistufiges Bindungsmodell postuliert.

Für die Bewertung dieser verschiedenen Beobachtungen müssen wieder die unterschiedlichen verwendeten Methoden in Betracht gezogen werden. In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Fluoreszenztitrationen ist nur die Bildung eines Komplexes sichtbar und so auch nur die Messung einer Dissoziationskonstante möglich. Dies könnte zum Beispiel mit den experimentellen Bedingungen zusammenhängen. Es wurde ein endständiger Fluorophor gewählt, da eine Positionierung des Fluorophors in der Mitte des Moleküls zu Problemen in den Messungen führte. Da vermutet wird, dass die Bindung von hTRBP an siRNA Moleküle nicht-kooperativ erfolgt<sup>(234)</sup> und hTRBP präferentiell an ein Ende der siRNA bindet<sup>(53)</sup>, ist es unter den in die-

## 5.7. Grundlagen des Effekts von dsRNA-bindenden Proteinen auf die hAgo2-vermittelte Spaltung

ser Arbeit gewählten Bedingungen unwahrscheinlich, die gleichzeitige Bindung von mehreren hTRBP Molekülen an ein siRNA Molekül zu verfolgen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführte DLS Messungen zeigen jedoch, dass sich bei Erhöhung der hTRBP Konzentration im Vergleich zur siRNA Konzentration tatsächlich größere Komplexe bilden. In Lösung zeigen die DLS Messungen, dass hTRBP vermutlich in Dimeren vorliegt (siehe Abschnitt 4.4.1.2), wie es bereits durch andere Gruppen gezeigt werden konnte<sup>(47,235)</sup>. Wird im Verhältnis 1:1 siRNA dazugeben, werden die Dimere aufgelöst und es bilden sich Komplexe, von denen vermutet wird, dass sie die Bindung von zwei hTRBP Molekülen an ein siRNA Molekül reflektieren. Wird jedoch die Konzentration der hTRBP Moleküle im Vergleich zur siRNA Konzentration erhöht, kann festgestellt werden, dass sich größere Komplexe bilden. Diese könnten eventuell Komplexe aus einer siRNA und mehreren hTRBP Molekülen repräsentieren. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass sich ein Komplex mit niedriger Affinität bildet.

Für die Bindung von hPACT an siRNA wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit ein einstufiger Bindungsprozess ermittelt. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten, die zeigen, dass hPACT als Dimer an doppelsträngige RNA bindet<sup>(233)</sup>.

Transientenkinetische Analysen der Assoziation von hTRBP bzw. hPACT mit siRNA ergaben einen biphasischen Verlauf der Bindung an das doppelsträngige Substrat. Die erste Phase korrespondiert mit der diffusionskontrollierten Bildung eines Kollisionskomplexes zwischen hTRBP bzw. hPACT und siRNA. Die zweite Phase der Bindung von hTRBP und hPACT repräsentiert höchstwahrscheinlich die Bindung der dsRBDs an die siRNA. Die Ratenkonstante dieser Phase ist sehr ähnlich mit hTRBP und hPACT (siehe Abschnitt 4.4.1.1). Für die Zuordnung dieser Phase sind zwei verschiedene Möglichkeiten denkbar. Zum Einen ist es möglich, dass beide dsRBDs simultan an die siRNA binden, wie es bereits von anderen vermutet wurde<sup>(189,233)</sup>. Zum Anderen könnten die dsRBDs konsekutiv an die siRNA binden. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimenten ist dies allerdings nicht erkennbar. Würde dieses Szenario zutreffen, würde die zweite dsRBD nach der ersten dsRBD binden und vermutlich keinen Einfluss auf den endständigen Fluorophor nehmen. In diesem Fall könnte mit Hilfe der hier dargestellten Experimente nur die Bindung der ersten dsRBD nachvollzogen werden.

Im Rahmen der Analyse der *pre-steady state* Assoziationskinetik von hTRBP bzw. hPACT und siRNA konnte gezeigt werden, dass sich hTRBP und hPACT sehr ähnlich verhalten. Eine transientenkinetische Untersuchung der Dissoziation der Komplexe aus hTRBP bzw. hPACT und siRNA offenbart Unterschiede zwischen den beiden Proteinen (siehe Abschnitt 4.4.1.1). Auf Grund einer höheren Aggregationsneigung von hPACT ist es nicht möglich, die Dissoziationsratenkonstanten für hPACT-siRNA Komplexe im Rahmen transientenkinetischer Analysen zu bestimmen. Während die dsRBDs von hTRBP und hPACT eine sehr hohe Homologie aufweisen, unterscheiden sich die beiden Proteine stark in ihren Linkerregionen. Die Linkerdomänen von hTRBP sind wesentlich länger als die von hPACT. Dies könnte zu einer unterschiedlichen Organisation der dsRBDs im Protein führen. Während dies eventuell einen Einfluss auf die Aggregationsneigung der beiden Proteine haben könnte, hat die mögliche unterschiedli-

che Organisation der dsRBDs im Protein offenbar keinen Einfluss auf die Affinität der beiden Proteine für siRNA. Beide binden in etwa mit derselben Affinität an siRNAs (siehe Tabelle 4.20).

Wird die dsRBD3 von hTRBP, welche in die siRNA Bindung nicht involviert ist, deletiert, hat dies Auswirkungen auf die Affinität für siRNA. Das Protein hTRBP-D12 zeigt eine niedrigere Affinität für dsRNAs als das Wildtyp Protein (siehe Abschnitt 4.4.1.2). Da beide dsRBDs, welche die Fähigkeit zur Bindung von dsRNA besitzen, vorhanden sind, verwundert dieses Ergebnis zunächst. Möglicherweise ist die dsRBD3 unterstützend in die Bindung an siRNAs involviert, obwohl sie allein nicht zur Bindung an siRNAs fähig ist. Eventuell wirkt sich die dsRBD3 auf die Organisation der dsRBD1 und 2 aus, sodass diese präorganisiert für eine Bindung an siRNA sind. Wird dagegen die dsRBD1 deletiert, ist die Affinität des Proteins für siRNA nur geringfügig gesenkt, was vermutlich auf den fehlenden Beitrag der dsRBD1 zur dsRNA-Bindung zurückzuführen ist.

Eine Analyse der Größe der Komplexe aus hTRBP bzw. hTRBP-D12 und siRNA mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung zeigt, dass die mit hTRBP-D12 gebildeten Komplexe wesentlich größer sind als im Fall von hTRBP. Schon bei niedrigen Konzentrationen des Proteins im Vergleich zur Nukleinsäure wird deutlich, dass hTRBP-D12 möglicherweise in der Lage ist, mit seinen beiden Bindedomänen an verschiedene siRNA Moleküle zu binden, was zur Vernetzung und so zu relativ großen Komplexen führen könnte. Dies könnte durch eine mögliche flexiblere Organisation der dsRBD1 und der dsRBD2 in Abwesenheit der dritten Domäne bewirkt werden. Im Gegensatz dazu können die Bindedomänen eines hTRBP Moleküls wahrscheinlich nur an dieselbe siRNA binden. Dies unterstreicht die Bedeutung der Domänenorganisation von hTRBP für die Bindung an dsRNA und der dsRBD3 für die Faltung von hTRBP. Dies widerspricht teilweise den Schlussfolgerungen von Yamashita et al.<sup>(189)</sup>. Diese Arbeitsgruppe vermutete, dass auch hTRBP-D12 mit beiden Domänen simultan an ein siRNA Molekül bindet. Dabei muss jedoch auch beachtet werden, dass dem hTRBP-D12 dieser Arbeitsgruppe ein Großteil der Linkerregion zwischen der dsRBD2 und der dsRBD3 fehlt.

### **5.7.2. Die Effizienz der hAgo2-vermittelten Spaltung von *target* RNAs wird durch hTRBP und hPACT erhöht**

Während für die Regulation der PKR komplett gegensätzliche Funktionen von hTRBP und hPACT beschrieben wurden<sup>(188,198,199,209–211)</sup>, ist der Effekt von hTRBP und hPACT auf die Dicer-vermittelte Prozessierung von Vorläufern der regulatorischen RNAs vielfältiger. Sowohl eine Schwächung als auch eine Verstärkung der Prozessierung konnte abhängig von der Struktur des Vorläufermoleküls sowohl für hTRBP als auch für hPACT gezeigt werden<sup>(202–204,212)</sup>. Dabei können hTRBP und hPACT einen ähnlichen Effekt auf die Prozessierung haben, aber auch völlig gegensätzliche Wirkungen auf die Prozessierung von Vorläufermolekülen durch Dicer ausüben<sup>(212)</sup>.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die Effekte von hTRBP und hPACT auf die hAgo2-vermittelte Spaltung sehr ähnlich sind. Beide führen zu einer signifikanten Steigerung der Effizienz der Spaltung von *target* RNAs durch hAgo2 (siehe Abschnitt 4.4.2). Dieser Effekt kann spezifisch mit katalytisch aktiven ternären Komplexen

beobachtet werden, die mit einer doppelsträngigen siRNA programmiert wurden. Dies weist darauf hin, dass die Fähigkeit von hTRBP und hPACT, an dsRNAs zu binden, eine Grundvoraussetzung für die Verstärkung der hAgo2-vermittelten Spaltung darstellt. Die dsRBDs sind somit eine zentrale Komponente für die Funktion von hTRBP und hPACT. Die Fähigkeit, an dsRNAs zu binden, ist ein notwendiges, aber, wie sich in weiteren Experimenten zeigte, kein hinreichendes Kriterium für die Steigerung des Umsatzes der hAgo2-vermittelten Spaltung. In Experimenten, in denen unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes und rückgefaltetes hTRBP bzw. hPACT verwendet wurde, konnte kein Effekt auf die hAgo2-vermittelte Spaltung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich führt die Denaturierung und die anschließende Rückfaltung der dsRNA-bindenden Proteine zu einer inkorrekten Faltung. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass diese Proteine mit einer vergleichbaren Affinität wie die unter nativen Bedingungen gereinigten Proteine an siRNA binden<sup>(236)</sup>. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die dsRBDs als einzelne Faltungseinheit korrekt gefaltet vorliegen, während die strukturelle Organisation der dsRBDs durch die Linkerdomänen anders als im unter nativen Bedingungen gereinigten Protein ist. Eine korrekte Orientierung der dsRBDs zueinander spielt ebenso wie Faltung der Linkerdomänen eine übergeordnete Rolle für den Effekt der dsRNA-bindenden Proteine.

Einen regulierenden Effekt auf die Wirkung von hTRBP hat vermutlich die dsRBD3. In der Deletionsmutante hTRBP-D12 fehlt diese Domäne, was eine zusätzliche Steigerung des Umsatzes der hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung nach sich zieht (siehe Abschnitt 4.4.2).

### **hTRBP senkt die Effizienz der Einzelstrang-vermittelten Spaltung von langen *target* RNAs**

Mit einer langen *target* RNA kann die durch hTRBP und hPACT vermittelte Umsatzsteigerung nur beobachtet werden, wenn hAgo2 zuvor durch eine doppelsträngige siRNA programmiert wurde (siehe Abschnitt 4.4.2). Dies könnte unter anderem daran liegen, dass ein durch einzelsträngige *guide* RNA programmiertes hAgo2 im Gegensatz zu dem mit siRNA programmierten hAgo2 auch in Abwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen eine lange *target* RNA sehr effizient umsetzt. Es fällt dabei allerdings auf, dass hTRBP zu einer Senkung des Umsatzes einer langen *target* RNA durch hAgo2 führt, wenn dieses mit einer einzelsträngigen *guide* RNA programmiert wurde. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass hTRBP und hPACT ihre Effekte auf unterschiedliche Art und Weise bewirken. Ursache der inhibierenden Wirkung von hTRBP könnte zum Beispiel eine Bindung an hAgo2 sein, welche die Bindung einer langen *target* RNA behindert. Dies scheint mit hPACT nicht der Fall zu sein, was impliziert, dass hPACT an einer anderen Stelle an hAgo2-siRNA Komplexe bindet als hTRBP. Interessanterweise ist mit hTRBP-D12 keine Inhibition der *target* RNA Spaltung zu erkennen. Das Fehlen der dsRBD3 scheint somit einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung von hTRBP an den hAgo2-siRNA Komplex zu haben.

Obwohl eine Verstärkung des Umsatzes langer *target* RNA durch hAgo2 in Anwesenheit von dsRNA-bindenden Proteinen nur dann beobachtet werden konnte, wenn hAgo2 mit einer doppelsträngigen siRNA programmiert wurde, konnte ein verbesserter Umsatz von kurzer *target* RNA, die einem *passenger* Strang entspricht, auch nach Programmierung von hAgo2 mit ein-

zelsträngiger *guide* RNA festgestellt werden. Dies unterstreicht die oben diskutierte Bedeutung der *target* RNA Länge für die Bildung ternärer Komplexe (siehe oben). Die hier gezeigten Experimente implizieren, dass die Komplexe mit hAgo2, *guide* RNA und kurzer *target* RNA sich deutlich von ternären Komplexen mit langer *target* RNA unterscheiden.

### 5.7.3. hTRBP-D12 beschleunigt selektiv die Spaltung von kurzen *target* RNAs

Im Rahmen der Spaltexperimente zeigte sich, dass die Deletionsmutante hTRBP-D12 neben einer Steigerung der hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung auch zu einer signifikanten Erhöhung der Ratenkonstante der Spaltung um eine Logstufe führt. Dies ist nur mit kurzen *target* RNAs zu beobachten. Die Umsatzgeschwindigkeit der langen *target* RNA bleibt dagegen unverändert. Es konnte gezeigt werden, dass mit der kurzen *target* RNA im Gegensatz zur langen *target* RNA die Freisetzung der Spaltprodukte den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (siehe Abschnitt 4.2.1.2 und 4.2.4.1). Eine Untersuchung der Freisetzung der *target* RNA aus ternären Komplexen in Gegenwart von hTRBP-D12 konnte einen Einfluss auf die Entlassung der *target* RNA aus dem ternären Komplex zeigen (siehe Abschnitt 4.4.3.2). In Anwesenheit von hTRBP-D12 ist die Ratenkonstante der dritten Phase der Dissoziation um eine Logstufe beschleunigt, die Ratenkonstante der zweiten Phase der Dissoziation, welche die Entwindung von *guide* und *target* RNA im Bereich der *seed* Region repräsentiert, sogar um zwei Logstufen. Die Bindung von hTRBP-D12 scheint also zu einer Erleichterung von konformationellen Änderungen von hAgo2, die zur Freisetzung von Spaltprodukten notwendig sind, beizutragen.

#### 5.7.3.1. hTRBP und hPACT beeinflussen die Spaltproduktfreisetzung durch hAgo2

Auch die Wildtyp Proteine hTRBP und hPACT haben einen Einfluss auf die Freisetzung der Spaltprodukte durch hAgo2. Hierbei zeigen sich weitere Unterschiede im Modus operandi von hTRBP und hPACT.

Dissoziationsexperimente mit hTRBP zeigen, dass es ebenfalls einen beschleunigenden Einfluss auf die Freisetzung der *target* RNA ausübt (siehe Abschnitt 4.4.3.2). Allerdings wird in Gegenwart des Wildtyp hTRBP die dritte Phase der Dissoziation ternärer Komplexe nicht beeinflusst. Die Dissoziation von *guide* und *target* RNA im *seed* Bereich wird jedoch signifikant beschleunigt. Als zum *multiple turnover* fähiges Enzym muss hAgo2 zwar zum Einen eine effiziente Freisetzung der Spaltprodukte gewährleisten, zum Anderen aber auch sicherstellen, dass ein *target* Strang erst dann entlassen wird, wenn eine Spaltung stattgefunden hat. Die Analysen der Dissoziation des ternären Komplexes implizieren, dass die Dissoziation des *target* Stranges konsekutiv vom 3'-Bereich zum 5'-Bereich des *guide* Stranges stattfindet (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Dies deckt sich mit Untersuchungen der Arbeitsgruppe um P. Zamore. Deren Untersuchungen zeigen außerdem eine Reassoziierung des dissoziierten Spaltproduktes in der *seed* Region des *guide* Stranges (Zamore, Vortrag, Seattle, 2014). Die Funktion von hTRBP in der Freisetzung der Spaltprodukte ist vermutlich eine Beschleunigung der Dissoziation im 5'-Bereich der *guide* RNA, um zu verhindern, dass Spaltprodukte die Bindung von ungespaltenen



*target* RNAs behindern. Die fehlende dsRBD3 führt vermutlich zu einer anderen Positionierung von hTRBP-D12 im Vergleich zu hTRBP, sodass auch die Dissoziation des *target* Strangs im 3'-Bereich der *guide* RNA beeinflusst wird. Dies gibt erste Hinweise auf die Positionierung von hTRBP im hAgo2-siRNA Komplex. Die dsRBD3 führt vermutlich zu einer Verankerung von hTRBP im C-terminalen Bereich von hAgo2. Dies wird durch Hinweise aus Studien der Gruppe um S. Crooke<sup>(93)</sup> bestätigt. Diese fand durch Mutationsanalysen heraus, dass hTRBP vermutlich mit der PIWI Domäne von hAgo2 interagiert. Die Gruppen um J. Doudna und E. Nogales<sup>(48)</sup> vermuteten dagegen an Hand eines von ihnen entwickelten Modells, dass hTRBP mit der PAZ Domäne von hAgo2 wechselwirkt und so die siRNA bei Übergabe von Dicer im Ago Protein verankert. Diese Vermutung kann mit Hilfe der in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden.

Spaltexperimente zeigen, dass die Mutante hTRBP-D23, der die dsRBD1 fehlt, nicht zu einer Beschleunigung der Ratenkonstante der Spaltung führt. Dies unterstreicht zum Einen die regulierende Funktion der dsRBD3. Zum Anderen deutet dies darauf hin, dass die dsRBD1 einen entscheidenden Einfluss auf die Freisetzung der Spaltprodukte hat.

Dissoziationsexperimente mit hPACT zeigen, dass die Freisetzung von *target* RNAs in Gegenwart von hPACT gehemmt wird (siehe Abschnitt 4.4.3.2). Würde dies auch für gespaltene *target* RNAs gelten, führte dies zu einer Hemmung des Umsatzes von hAgo2 in Gegenwart von hPACT, was aber nicht der Fall ist. Eine gespaltene *target* RNA kann also auch in Anwesenheit von hPACT ungehindert dissoziieren, während eine ungespaltene *target* RNA durch hPACT in Position gehalten wird. Dies impliziert ein Wechselspiel von hTRBP und hPACT in der Regulation der Spaltproduktfreisetzung. Zusammen stellen hTRBP und hPACT vermutlich sicher, dass eine *target* RNA vor ihrer Dissoziation gespalten wird, danach aber schnell dissoziiert und Raum für ungespaltene *target* RNAs gibt. Wie im Fall von hTRBP bieten diese funktionellen Studien mit hPACT erste Informationen über eine mögliche Positionierung von hPACT im hAgo2-siRNA Komplex. Es muss an einer Stelle positioniert werden, an der es nach erfolgter Spaltung der *target* RNA die Dissoziation der Spaltprodukte nicht behindert. Die Konformation des Ago Proteins ändert sich im Zuge der Spaltung im Bereich der Mid, PIWI und PAZ Domäne nicht. Die einzigen Änderungen sind im Bereich der N-terminalen Domäne erkennbar<sup>(59)</sup>. Damit nach erfolgter Spaltung die Spaltprodukte in Anwesenheit von hPACT dissoziieren können, könnte hPACT eventuell im Bereich der N-terminalen Domäne binden.

#### **5.7.4. Die Beladung von hAgo2 mit siRNAs wird durch hTRBP und hPACT unterstützt**

Da hPACT die Spaltproduktfreisetzung nicht beschleunigt und hTRBP nur zu einer Beschleunigung der *target* RNA Dissoziation im 5'-Bereich der *guide* RNA führt, muss ein weiterer Schritt der hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung durch die beiden dsRNA-bindenden Proteine beeinflusst werden, um die signifikante Steigerung der Effizienz der Spaltreaktion erklären zu können. Denkbar ist, dass die Beladung von hAgo2 mit siRNA durch hTRBP bzw. hPACT unterstützt und der entstehende Komplex stabilisiert wird. Dies wird durch Bindungsexperimente bestätigt (siehe Abschnitt 4.4.3.1). Unterstützt wird diese Hypothese durch die 2009 von Wang

et al.<sup>(48)</sup> getroffenen Annahmen. Diese Arbeitsgruppe vermutete, dass hTRBP die Übergabe der siRNA von Dicer zu hAgo2 erleichtert und gleichzeitig bei der Beladung von hAgo2 mit siRNA assistiert.

Der Einfluss von hTRBP bzw. hPACT auf die Beladung des Wildtyp hAgo2 mit siRNA ist in den transientenkinetischen Experimenten kaum erkennbar. Wird allerdings die PAZ Domäne von hAgo2 durch Punktmutationen so modifiziert, dass keine Bindung an das 3'-Ende der siRNA mehr möglich ist, wird der Effekt von hTRBP und hPACT deutlich. Die hAgo2-PAZ9 Mutante ist auf Grund ihrer schweren Defizite in der siRNA Bindung spaltungsdefizient. Beide dsRNA-bindenden Proteine führen zu einer Wiederherstellung der dritten Phase, die der Bindung der siRNA im Nukleinsäure-Bindungskanal im Kontext mit der Bindung an die PAZ Domäne entspricht. Eine Überprüfung der Spaltaktivität der hAgo2-PAZ9 Mutante in Gegenwart der dsRNA-bindenden Proteine offenbart eine Rekonstitution der Spaltaktivität des Proteins. Dies ist nicht nur mit den Wildtyp Proteinen hTRBP und hPACT zu beobachten. Eine Wiederherstellung der katalytischen Aktivität von hAgo2-PAZ9 ist auch in Gegenwart von hTRBP-D12 zu beobachten. Während also die dritte dsRBD, die nicht an dsRNA bindet<sup>(189)</sup>, vor allem einen regulierenden Einfluss hat, sind die dsRNA-bindenden Domänen dsRBD1 und dsRBD2<sup>(189)</sup> sowie möglicherweise auch die angrenzenden Linkerregionen in die Beladung von hAgo2 mit siRNA involviert.

Die vorgestellten Ergebnisse implizieren, dass hTRBP und hPACT bei der Beladung von hAgo2 mit siRNA assistieren. Darüber hinaus fixieren sie die Nukleinsäure in der richtigen Position, um eine Spaltung der *target* bzw. *passenger* RNA durch hAgo2 zu erlauben. Die Beladung von hAgo2 wird durch beide Proteine in ähnlicher Art und Weise unterstützt.

### 5.7.5. Die dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT interagieren unterschiedlich mit den hAgo2-siRNA Komplexen

Sowohl hTRBP als auch hPACT erhöhen durch die Beeinflussung von unterschiedlichen Prozessen im Kontext der hAgo2-vermittelten siRNA-abhängigen *target* RNA Spaltung die Effizienz des *target* RNA Umsatzes (siehe oben). Dabei zeigte sich, dass die Proteine in einem komplexen Zusammenspiel die Abläufe steuern. Ihr Einfluss auf die Beladung von hAgo2 scheint zunächst redundant, während die Dissoziation der Spaltprodukte unterschiedliche Aktionen von hTRBP und hPACT involviert, um eine effiziente Funktion von hAgo2 als *multiple turnover* Enzym zu ermöglichen. Für alle diese Aufgaben ist es notwendig, dass die beiden dsRNA-bindenden Proteine Wechselwirkungen mit dem hAgo2-siRNA Komplex eingehen. Diese Interaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

In *pull down* Experimenten zeigte sich, dass hTRBP und hPACT unabhängig von doppelsträngigen Nukleinsäuren mit hAgo2 interagieren können (siehe Abschnitt 4.4.4). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass direkte Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen und hAgo2 ausgebildet werden können. Lima et al.<sup>(93)</sup> postulierten eine Interaktion zwischen hTRBP und der PIWI Domäne von hAgo2.

Eine Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von hTRBP bzw. hPACT auf die hAgo2-vermittelte Spaltung von *passenger* RNAs zeigt, dass die durch die beiden dsRNA-

bindenden Proteine produzierten Effekte zwar vergleichbar sind, aber auf unterschiedliche Art erzeugt werden (siehe Abschnitt 4.4.4). Während hTRBP in einem positiv kooperativen Bindungsmodus an hAgo2-siRNA Komplexe bindet, bindet hPACT nicht-kooperativ.

Dies unterscheidet sich von dem für hTRBP beschriebenen Bindungsverhalten an siRNA Moleküle. Es wurde vermutet, dass hTRBP in einer nicht-kooperativen Weise an siRNAs bindet und die Bindungsereignisse isoliert voneinander stattfinden<sup>(234)</sup>. Dies impliziert, dass die Interaktionen zwischen hTRBP und hAgo2 hauptsächlich durch Protein-Protein Wechselwirkungen und nicht über die Bindung an siRNA vermittelt werden. Dies wird ebenfalls bestätigt durch die Bestimmung der Affinität zwischen hTRBP und hAgo2-siRNA Komplexen. Die für diese Interaktion gemessenen Gleichgewichtsdissoziationskonstante liegt im unteren mikromolaren Bereich, während die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für hTRBP-siRNA Komplexe im unteren nanomolaren Bereich bestimmt wurde (siehe Abschnitt 4.4.4 und 4.4.1.2). Auch das unterstreicht die Bedeutung von Protein-Protein-Wechselwirkungen für den von hTRBP ausgeübten Effekt auf die hAgo2-vermittelte Spaltung. Auch die Mutante hTRBP-D12 bindet kooperativ an hAgo2-siRNA Komplexe. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für diese Wechselwirkung ist jedoch wesentlich niedriger und reflektiert die höhere Affinität der Mutante an hAgo2-siRNA Komplexe. Möglicherweise erlaubt die durch die fehlende dsRBD3 disregulierte Positionierung von hTRBP-D12 im hAgo2-siRNA Komplex mehr Möglichkeiten zur Interaktion mit der siRNA, was zu einer höheren Affinität führt. Untersuchungen mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung zeigen jedoch, dass trotz dieser abweichenden Gleichgewichtsdissoziationskonstanten eine Änderung der Stöchiometrie vermutlich nicht stattfindet. Die sich bildenden Komplexe aus hAgo2, siRNA und hTRBP bzw. hTRBP-D12 weisen sehr ähnliche hydrodynamische Radien auf. In beiden Fällen lösen sich die größeren Komplexe bestehend aus hTRBP bzw. hTRBP-D12 und siRNA auf, um in Komplexe mit hAgo2 und siRNA überzugehen. Die Affinität von hTRBP bzw. hTRBP-D12 für siRNA ist mit 1 - 3 nM höher als die von hAgo2 für siRNA mit 48 nM<sup>(218)</sup> (siehe Abschnitt 4.4.1.2). Da trotzdem keine Segregation der siRNA durch hTRBP bzw. hTRBP-D12 stattfindet, kann postuliert werden, dass in Gegenwart von hTRBP bzw. hTRBP-D12 die Affinität von hAgo2 für siRNA stark erhöht wird. Möglicherweise kommt es zu Änderungen der Konformation von hAgo2 durch die dsRNA-bindenden Proteine, die eine Assoziation mit der Nukleinsäure erleichtert. Dies gilt auch für hPACT, welches ebenfalls eine wesentlich höhere Affinität für siRNA besitzt als hAgo2.

Im Gegensatz zu hTRBP bindet hPACT auf nicht-kooperative Weise an den hAgo2-siRNA Komplex. Für hPACT wird vermutet, dass es als Dimer an siRNA bindet<sup>(233)</sup>, was auch bei der Bindung an hAgo2-siRNA Komplexe der Fall sein kann. Auch im Fall von hPACT liegt die Gleichgewichtsdissoziationskonstante im niedrigen mikromolaren Bereich, was wiederum Protein-Protein Wechselwirkungen impliziert. Deutlich erkennbar ist als Zeichen der nicht-kooperativen Bindung, dass die Bindung eines hPACT Moleküls die Bindung eines weiteren hPACT Moleküls nicht begünstigt. Auch dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass hTRBP und hPACT auf unterschiedliche Weise und an verschiedenen Positionen des hAgo2-siRNA Komplexes binden.

Beide Proteine assistieren bei der Beladung von hAgo2 mit siRNA und haben also möglicherweise, wie es schon von anderen für hTRBP vermutet wurde<sup>(47,49,104,120)</sup>, eine Funktion bei der Übergabe der siRNA von Dicer zu hAgo2. Die Stöchiometrie, die für den RLC beste-

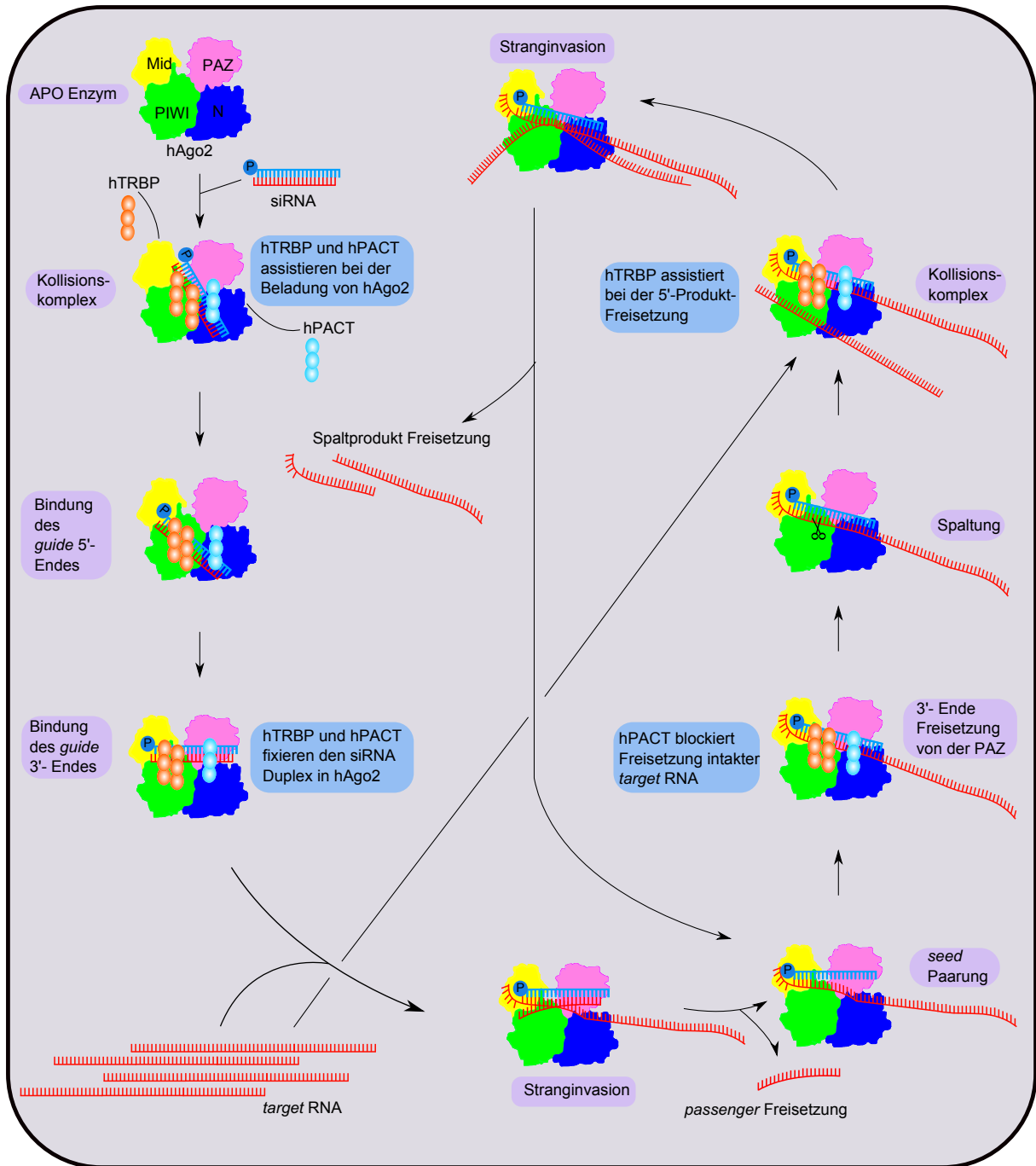
hend aus Dicer, hTRBP und hAgo2 gefunden wurde, war 1:1:1<sup>(47)</sup>. Dies impliziert, dass nach Dissoziation von Dicer aus dem RLC weitere Bindungsstellen für hTRBP frei werden und eine Reorganisation von hTRBP im Komplex mit hAgo2 und siRNA stattfindet. Im Kontext der in dieser Promotionsarbeit gezeigten Ergebnisse lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die finale Positionierung der siRNA in hAgo2 erst nach der Dissoziation von hDicer aus dem RLC erfolgt.

## 5.8. Erweitertes mechanistisches Modell der hAgo2-vermittelten siRNA-abhängigen *target* RNA Spaltung

Ein erweitertes mechanistisches Modell der durch hTRBP und hPACT assistierten hAgo2-vermittelten siRNA-abhängigen Spaltung von *target* RNAs baut auf dem in der Promotionsarbeit von Dr. A. Deerberg begonnenen minimal mechanistischen Modell auf<sup>(218)</sup>. Im Rahmen der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurden zum Einen entscheidende Experimente durchgeführt, um die verschiedenen Phasen der binären und ternären Komplexbildung definitiv zuzuordnen und so das minimale mechanistische Modell zu etablieren. Zum Anderen wurde der Effekt einer langen *target* RNA auf den binären hAgo2-siRNA Komplex untersucht und ein möglicher „Stranginvasions“-Mechanismus postuliert. Außerdem wurde das Modell um Funktionen der dsRNA-bindenden Proteine hTRBP und hPACT erweitert. Über die exakte Positionierung der dsRNA-bindenden Proteine im hAgo2-siRNA bzw. hAgo2-*target* RNA Komplex kann derzeit nur spekuliert werden. Desweiteren ist nicht auszuschließen, dass die beiden Proteine hTRBP und hPACT weitere noch nicht gefundene Auswirkungen auf die hAgo2-vermittelte Spaltung von *target* RNAs haben.

Wie in Abbildung 5.3 gezeigt (dargestellte Details sind im folgenden Text hervorgehoben), bildet sich zunächst ein **Kollisionskomplex** aus hAgo2 und siRNA. Die dsRNA-bindenden Proteine **hTRBP und hPACT assistieren bei der Beladung** von hAgo2 mit der siRNA. Das **5'-Ende** des *guide* Strangs der siRNA wird in der **Mid-Bindungstasche** verankert, gefolgt von der **Assoziation des 3'-Endes mit der PAZ Domäne** und der Positionierung des Duplexes im Nukleinsäure-Bindungskanal. Die dsRNA-bindenden Proteine **hTRBP und hPACT stabilisieren die Wechselwirkung zwischen hAgo2 und der siRNA**. Ist eine *target* RNA vorhanden, kollidiert diese mit dem binären Komplex aus siRNA und hAgo2 (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt) und es kommt vermutlich zu einer „**Stranginvasion**“. Die *target* RNA interagiert dabei wahrscheinlich mit dem ternären Komplex und beschleunigt dadurch die Freisetzung der *passenger* RNA, sodass diese nicht gespalten wird. Darauf kommt es zur **Basenpaarung im Bereich der seed Region**, gefolgt von der **Freisetzung des 3'-Endes der guide RNA von der PAZ Domäne** und erweiterter Basenpaarung zwischen *guide* und *target* RNA. Sowohl **hTRBP als auch hPACT stabilisieren** vermutlich den *guide-target* Duplex in hAgo2 (nicht gezeigt). Das dsRNA-bindende Protein **hPACT blockiert vermutlich die Freisetzung intakter target RNA** und verhindert so wahrscheinlich deren prämaturne Entlassung. Der ternäre Komplex liegt in einem **spaltungskompetenten Zustand** vor, sodass die *target* RNA gespalten werden kann. Das dsRNA-bindende Protein **hTRBP beschleunigt die Freisetzung des 5'-terminalen Spaltproduktes**. Eine komplementäre *target* RNA kann mit diesem Kom-

5.8. Erweitertes mechanistisches Modell der hAgo2-vermittelten siRNA-abhängigen target RNA Spaltung



**Abbildung 5.3.: Erweitertes mechanistisches Modell der durch dsRNA-bindende Proteine beeinflussten hAgo2-vermittelten siRNA-abhängigen target RNA Spaltung.** Schematische Darstellung der Proteine und der Nukleinsäure. Die relative Positionierung der Nukleinsäure in hAgo2 ist gezeigt, die Positionen der dsRNA-bindenden Proteine können mit Hilfe der bekannten Literatur und der in dieser Arbeit vorgestellten Daten nur abgeschätzt werden. Der Übersichtlichkeit halber wurden hTRBP und hPACT im „Stranginvasions“-Modell und der *seed* Basenpaarung nicht eingezeichnet, da ihre Funktion in diesen beiden Prozessen nicht geklärt ist. Außerdem wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung von hTRBP und hPACT im Komplex, der die Spaltung der target RNA darstellt, verzichtet. Neben der Blockade der prämaternen Freisetzung von intakten target RNAs und einer beschleunigten Freisetzung von Spaltprodukten stabilisieren sowohl hTRBP als auch hPACT vermutlich den *guide-target* Duplex im Protein. Weitere Beschreibung siehe Text.

plex kollidieren und in einem möglichen „**Stranginvasions**“-**Mechanismus die Freisetzung der Spaltprodukte beschleunigen**. Während die Spaltprodukte entlassen werden, bindet die neue *target* RNA vollständig an den binären Komplex. Dazu bindet das **3'-Ende der *guide* RNA zunächst erneut an die PAZ Domäne**.

## 5.9. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine umfassende kinetische Charakterisierung der Nukleinsäurebindung durch hAgo2 durchgeführt werden. Durch umfangreiche Studien war es möglich, die strukturellen Transitionen, die während der Bindung an Nukleinsäuren stattfinden, mit den biochemischen Daten zu korrelieren. Dabei wurden neue Erkenntnisse zur Sequenzabhängigkeit der Spaltung kurzer *target* RNAs gewonnen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass längere *target* RNAs die Konformation des ternären Komplexes beeinflussen können. Dabei wurden einige Fragen aufgeworfen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden konnten. Anhand der getesteten *guide* Sequenzen konnte kein Algorithmus abgeleitet werden, der Aufschluss über den Mechanismus der Positionierung des Duplex aus kurzen *target* Strängen und *guide* Strängen im Ago Protein geben könnte. Wesentlich umfangreichere Studien wären hier notwendig. Außerdem ist es zum Beispiel interessant, die Kontaktflächen für lange *target* Stränge auf der Oberfläche des Ago Proteins zu bestimmen. In diesem Zusammenhang fehlen genauere mechanistische Einsichten zum postulierten „Stranginvasions“-Mechanismus. Vergleichende Analysen mit MjAgo konnten zeigen, dass sich das humane Protein und sein bakterielles Gegenstück sehr ähnlich verhalten. Nach wie vor ist unklar, wie die Substratspezifität von MjAgo und hAgo2 bestimmt wird. Desweiteren gibt es nach wie vor keine klaren Hinweise auf die biologische Funktion von MjAgo.

Außerdem konnten neue Erkenntnisse zur Bedeutung des 5'-Nukleotids der *guide* RNA gewonnen werden. Entgegen bisheriger Annahmen können sich sowohl hAgo2 als auch MjAgo sehr flexibel an unterschiedliche 5'-Nukleotide anpassen. Die dabei auftretenden strukturellen Änderungen sind bislang nicht erforscht. Obwohl bereits eine Vielzahl an Röntgenkristallstrukturen von Ago Proteinen aus den unterschiedlichsten Organismen in den verschiedensten Konformationen existieren, zeigt die vorliegende biochemische Analyse, dass das Gesamtbild komplexer ist, als am Anfang angenommen wurde, und dass noch einige Studien notwendig sind, um die Funktion der Ago Proteine komplett zu verstehen.

Außerdem gibt die Arbeit erstmals Einblick in die Funktion von hTRBP und hPACT in der hAgo2-vermittelten *target* RNA Spaltung. Weitere Experimente, die Aufschluss über die genaue Positionierung der beiden Proteine in hAgo2-siRNA Komplexen geben könnten, wären jedoch hilfreich. Nach wie vor ist auch die Rolle der Linkerdomänen für den Effekt von hTRBP und hPACT nicht geklärt. Es existieren lediglich Strukturen der isolierten einzelnen dsRBDs. Wie diese jedoch untereinander angeordnet sind und wie sich diese Anordnung bei der Bindung an hAgo2-siRNA Komplexe ändert, ist unklar. Weitere Studien sind notwendig, um das komplexe Zusammenspiel zwischen hAgo2 und akzessorischen Proteinen der RNAi, wie hTRBP und hPACT besser zu verstehen.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Gyorgy Hutvagner and Martin J. Simard. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(1):22–32, January 2008.
- [2] Richard W. Carthew and Erik J. Sontheimer. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4):642–55, February 2009.
- [3] Ivan Olovnikov, Ken Chan, Ravi Sachidanandam, Dianne K. Newman, and Alexei Aravin. Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Molecular Cell*, 51(5):594–605, September 2013.
- [4] Carolyn Napoli, Christine Lemieux, and Richard Jorgensen. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*, 2(4):279–289, April 1990.
- [5] Alexander R. van der Krol, Leon A. Mur, Marcel Beld, Joseph N. Mol, and Antoine R. Stuitje. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell*, 2(4):291–9, April 1990.
- [6] Nicoletta Romano and Giuseppe Macino. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6(22):3343–53, November 1992.
- [7] J. A. Lindbo, L. Silva-Rosales, W. M. Proebsting, and W. G. Dougherty. Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *The Plant Cell*, 5(12):1749–1759, December 1993.
- [8] Rosalind C. Lee, Rhonda L. Feinbaum, and Victor Ambros. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843–54, December 1993.
- [9] Andrew Fire, Si Q. Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver, and Craig C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–11, February 1998.
- [10] Brenda J. Reinhart, Frank J. Slack, Michael Basson, Amy E. Pasquinelli, Jill C. Bettinger, Ann E. Rougvie, H. Robert Horvitz, and Gary Ruvkun. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772):901–6, February 2000.

## 6. Literaturverzeichnis

- [11] Mariana Lagos-Quintana, Reinhard Rauhut, Winfried Lendeckel, and Thomas Tuschl. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853–8, October 2001.
- [12] Nelson C. Lau, Lim P. Lim, Earl G. Weinstein, and David P. Bartel. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):858–62, October 2001.
- [13] Rosalind C. Lee and Victor Ambros. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):862–4, October 2001.
- [14] Thomas Tuschl, Phillip D. Zamore, Ruth Lehmann, David P. Bartel, and Phillip A. Sharp. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Development*, 13(24):3191–7, December 1999.
- [15] Phillip D. Zamore, Thomas Tuschl, Philipp A. Sharp, and David P. Bartel. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1):25–33, March 2000.
- [16] Sayda M. Elbashir, Jens Harborth, Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber, and Thomas Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836):494–8, May 2001.
- [17] Benjamin P. Lewis, Christopher B. Burge, and David P. Bartel. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1):15–20, January 2005.
- [18] Xiaohui Xie, Jun Lu, E. J. Kulbokas, Todd R. Golub, Vamsi Mootha, Kerstin Lindblad-Toh, Eric S. Lander, and Manolis Kellis. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434(7031):338–45, March 2005.
- [19] Aurora Esquela-Kerscher and Frank J. Slack. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(4):259–69, April 2006.
- [20] Victor Ambros. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107(7):823–6, December 2001.
- [21] Giovanni Stefani and Frank J. Slack. Small non-coding RNAs in animal development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3):219–30, March 2008.
- [22] Esmerina Tili, Jean-Jacques Michaille, and George Adrian Calin. Expression and function of micro-RNAs in immune cells during normal or disease state. *International Journal of Medical Sciences*, 5(2):73–9, January 2008.
- [23] Ross C. Wilson and Jennifer A. Doudna. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of Biophysics*, 42:217–39, January 2013.



- [24] Jennifer A. Broderick and Phillip D. Zamore. MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*, 18(12):1104–1110, April 2011.
- [25] Adinoyi O. Garba and Shaker A. Mousa. Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Ophthalmology and Eye Diseases*, 2:75–83, January 2010.
- [26] Katrin Tiemann and John J. Rossi. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Molecular Medicine*, 1(3):142–51, June 2009.
- [27] Daniela Castanotto and John J. Rossi. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 457(7228):426–33, January 2009.
- [28] Megha Ghildiyal and Phillip D. Zamore. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews. Genetics*, 10(2):94–108, February 2009.
- [29] Andrew J. Hamilton and David C. Baulcombe. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441):950–2, October 1999.
- [30] Susan Parrish, Jamie Fleenor, SiQun Xu, Craig Mello, and Andrew Fire. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Molecular Cell*, 6(5):1077–87, November 2000.
- [31] Scott M. Hammond, Emily Bernstein, David Beach, and Gregory J. Hannon. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775):293–6, March 2000.
- [32] Hong-Wei Li and Shou-Wei Ding. Antiviral silencing in animals. *FEBS Letters*, 579(26):5965–73, October 2005.
- [33] Yang Li, Jinfeng Lu, Yanhong Han, Xiaoxu Fan, and Shou-Wei Ding. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science*, 342(6155):231–4, October 2013.
- [34] Andrew Hamilton, Olivier Voinnet, Louise Chappell, and David Baulcombe. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*, 21(17):4671–9, September 2002.
- [35] Victor Ambros, Rosalind C. Lee, Ann Lavanway, Peter T. Williams, and David Jewell. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Current Biology*, 13(10):807–18, May 2003.
- [36] Nuo Yang and Haig H. Kazazian. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9):763–71, September 2006.
- [37] Oliver H. Tam, Alexei A. Aravin, Paula Stein, Angelique Girard, Elizabeth P. Murchison, Sihem Cheloufi, Emily Hodges, Martin Anger, Ravi Sachidanandam, Richard M. Schultz, and Gregory J. Hannon. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194):534–8, May 2008.

## 6. Literaturverzeichnis

- [38] Toshiaki Watanabe, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Masahiro Kaneda, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Yayoi Obata, Hatsune Chiba, Yuji Kohara, Tomohiro Kono, Toru Nakano, M Azim Surani, Yoshiyuki Sakaki, and Hiroyuki Sasaki. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194):539–43, May 2008.
- [39] Martin Jinek and Jennifer A. Doudna. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228):405–12, January 2009.
- [40] Emily Bernstein, Amy A. Caudy, Scott M. Hammond, and Gregory J. Hannon. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818):363–6, January 2001.
- [41] Sayda M. Elbashir, Winfried Lendeckel, and Thomas Tuschl. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15(2):188–200, January 2001.
- [42] Ian J. Macrae, Kaihong Zhou, Fei Li, Adrian Repic, Angela N. Brooks, W. Zacheus Candé, Paul D. Adams, and Jennifer A. Doudna. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, 311(5758):195–8, January 2006.
- [43] Ian J. MacRae, Kaihong Zhou, and Jennifer A. Doudna. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(10):934–40, October 2007.
- [44] Antti Nykänen, Benjamin Haley, and Philip D. Zamore. ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell*, 107(3):309–21, November 2001.
- [45] Sayda M. Elbashir, Javier Martinez, Agnieszka Patkaniowska, Winfried Lendeckel, and Thomas Tuschl. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, 20(23):6877–88, December 2001.
- [46] Erik J. Sontheimer. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(2):127–38, February 2005.
- [47] Ian J. MacRae, Enbo Ma, Min Zhou, Carol V. Robinson, and Jennifer A. Doudna. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2):512–7, January 2008.
- [48] Hong-wei Wang, Cameron Noland, Bunpote Siridechadilok, David W. Taylor, Enbo Ma, Karin Felderer, Jennifer A. Doudna, and Eva Nogales. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(11):1148–53, November 2009.
- [49] Thimmaiah P. Chendrimada, Richard I. Gregory, Easwari Kumaraswamy, Jessica Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura, and Ramin Shiekhattar. TRBP recruits the Dicer

- complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051):740–4, August 2005.
- [50] Cameron L. Noland, Enbo Ma, and Jennifer A. Doudna. siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. *Molecular Cell*, 43(1):110–21, July 2011.
- [51] Dianne S. Schwarz, György Hutvágner, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, and Phillip D. Zamore. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2):199–208, October 2003.
- [52] Anastasia Khvorova, Angela Reynolds, and Sumedha D. Jayasena. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209–16, October 2003.
- [53] Joseph A. Gredell, Michael J. Dittmer, Ming Wu, Christina Chan, and S. Patrick Walton. Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry*, 49(14):3148–55, April 2010.
- [54] Cameron L. Noland and Jennifer A. Doudna. Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA*, 19(5):639–48, May 2013.
- [55] Christian Matranga, Yukihide Tomari, Chanseok Shin, David P. Bartel, and Phillip D. Zamore. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4):607–20, November 2005.
- [56] Tim A. Rand, Sean Petersen, Fenghe Du, and Xiaodong Wang. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4):621–9, November 2005.
- [57] Philipp J. Leuschner, Stefan L. Ameres, Stephanie Kueng, and Javier Martinez. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Reports*, 7(3):314–20, March 2006.
- [58] Fabiola V. Rivas, Niraj H. Tolia, Ji-joon Song, Juan P. Aragon, Jidong Liu, Gregory J. Hannon, and Leemor Joshua-Tor. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(4):340–9, April 2005.
- [59] Gang Sheng, Hongtu Zhao, Jiuyu Wang, Yu Rao, Wenwen Tian, Daan C. Swarts, John van der Oost, Dinshaw J. Patel, and Yanli Wang. Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2):652–7, January 2014.
- [60] György Hutvágner and Phillip D. Zamore. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297(5589):2056–60, September 2002.
- [61] Benjamin Haley and Phillip D. Zamore. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(7):599–606, July 2004.

## 6. Literaturverzeichnis

- [62] Ana Kozomara and Sam Griffiths-Jones. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue):D152–7, January 2011.
- [63] Yoontae Lee, Minju Kim, Jinju Han, Kyu-Hyun Yeom, Sanghyuk Lee, Sung Hee Baek, and V Narry Kim. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20):4051–60, October 2004.
- [64] Xuezhong Cai, Curt H. Hagedorn, and Bryan R. Cullen. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12):1957–66, December 2004.
- [65] Witold Filipowicz, Suvendra N. Bhattacharyya, and Nahum Sonenberg. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews. Genetics*, 9(2):102–14, February 2008.
- [66] Yoontae Lee, Kipyong Jeon, Jun-Tae Lee, Sunyoung Kim, and V Narry Kim. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17):4663–70, September 2002.
- [67] Yoontae Lee, Chiyong Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, Patrick Provost, Olof Rådmark, Sunyoung Kim, and V Narry Kim. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415–9, September 2003.
- [68] Ahmet M. Denli, Bastiaan B. Tops, Ronald H. Plasterk, René F. Ketting, and Gregory J. Hannon. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014):231–5, November 2004.
- [69] Richard I. Gregory, Kai-Ping Yan, Govindasamy Amuthan, Thimmaiah Chendrimada, Behzad Doratotaj, Neil Cooch, and Ramin Shiekhattar. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014):235–40, November 2004.
- [70] Jinju Han, Yoontae Lee, Kyu-Hyun Yeom, Young-Kook Kim, Hua Jin, and V. Narry Kim. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18(24):3016–27, December 2004.
- [71] Markus Landthaler, Abdullah Yalcin, and Thomas Tuschl. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current Biology*, 14(23):2162–7, December 2004.
- [72] Katsutomo Okamura, Joshua W. Hagen, Hong Duan, David M. Tyler, and Eric C. Lai. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell*, 130(1):89–100, July 2007.
- [73] J. Graham Ruby, Calvin H. Jan, and David P. Bartel. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149):83–6, July 2007.

- [74] Eugene Berezikov, Wei-Jen Chung, Jason Willis, Edwin Cuppen, and Eric C. Lai. Mammalian mirtron genes. *Molecular Cell*, 28(2):328–36, October 2007.
- [75] Markus T. Bohnsack, Kevin Czaplinski, and Dirk Gorlich. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2):185–91, February 2004.
- [76] Elsebet Lund, Stephan Güttinger, Angelo Calado, James E. Dahlberg, and Ulrike Kutay. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654):95–8, January 2004.
- [77] Rui Yi, Yi Qin, Ian G. Macara, and Bryan R. Cullen. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24):3011–6, December 2003.
- [78] György Hutvágner, Juanita McLachlan, Amy E. Pasquinelli, Eva Bálint, Thomas Tuschl, and Phillip D. Zamore. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531):834–8, August 2001.
- [79] Benjamin P. Lewis, I-hung Shih, Matthew W. Jones-Rhoades, David P. Bartel, and Christopher B. Burge. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7):787–98, December 2003.
- [80] Julius Brennecke, Alexander Stark, Robert B. Russell, and Stephen M. Cohen. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, 3(3):e85, March 2005.
- [81] Jennifer H. Mansfield, Brian D. Harfe, Robert Nissen, John Obenauer, Jalagani Sri-neel, Aadel Chaudhuri, Raphael Farzan-Kashani, Michael Zuker, Amy E. Pasquinelli, Gary Ruvkun, Phillip A. Sharp, Clifford J. Tabin, and Michael T. McManus. MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nature Genetics*, 36(10):1079–83, October 2004.
- [82] Soraya Yekta, I-Hung Shih, and David P. Bartel. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 304(5670):594–6, April 2004.
- [83] Sébastien Pfeffer, Mihaela Zavolan, Friedrich Grässer, Minchen Chien, James J. Russo, Jingyue Ju, Bino John, Anton J. Enright, Debora Marks, Chris Sander, and Thomas Tuschl. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304(5671):734–6, April 2004.
- [84] Christopher S. Sullivan, Adam T. Grundhoff, Satvir Tevethia, James M. Pipas, and Don Ganem. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 435(7042):682–6, June 2005.
- [85] Matthew W. Rhoades, Brenda J. Reinhart, Lee P. Lim, Christopher B. Burge, Bonnie Bartel, and David P. Bartel. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4):513–20, August 2002.

## 6. Literaturverzeichnis

- [86] Cesar Llave, Zhixin Xie, Kristin D. Kasschau, and James C. Carrington. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, 297(5589):2053–6, September 2002.
- [87] Guiliang Tang, Brenda J. Reinhart, David P. Bartel, and Phillip D. Zamore. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, 17(1):49–63, January 2003.
- [88] Daan C. Swarts, Matthijs M. Jore, Edze R. Westra, Yifan Zhu, Jorijn H. Janssen, Ambrosius P. Snijders, Yanli Wang, Dinshaw J. Patel, José Berenguer, Stan J. J. Brouns, and John van der Oost. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*, 507(7491):258–61, March 2014.
- [89] Yanli Wang, Stefan Juranek, Haitao Li, Gang Sheng, Thomas Tuschl, and Dinshaw J D.J. Patel. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, 456(7224):921–926, November 2008.
- [90] Yanli Wang, Stefan Juranek, Haitao Li, Gang Sheng, Greg S. Wardle, Thomas Tuschl, and Dinshaw J. Patel. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*, 461(7265):754–61, October 2009.
- [91] Tariq M. Rana. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(1):23–36, January 2007.
- [92] Umar Jan Rashid, Dirk Paterok, Alexander Koglin, Holger Gohlke, Jacob Piehler, and Julian Chen. Structure of Aquifex aeolicus argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA-induced silencing complex function. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18):13824–32, May 2007.
- [93] Walt F. Lima, Hongjiang Wu, Josh G. Nichols, Hong Sun, Heather M. Murray, and Stanley T. Crooke. Binding and cleavage specificities of human Argonaute2. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(38):26017–28, September 2009.
- [94] Mohammed Amarzguioui, Torgeir Holen, Eshrat Babaie, and Hans Prydz. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Research*, 31(2):589–595, January 2003.
- [95] Hirohiko Hohjoh. Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS Letters*, 557(1-3):193–198, January 2004.
- [96] Angela Reynolds, Devin Leake, Queta Boese, Stephen Scaringe, William S. Marshall, and Anastasia Khvorova. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, 22(3):326–30, March 2004.
- [97] Kumiko Ui-Tei, Yuki Naito, Fumitaka Takahashi, Takeshi Haraguchi, Hiroko Ohki-Hamazaki, Aya Juni, Ryu Ueda, and Kaoru Saigo. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 32(3):936–48, January 2004.

- [98] S. Yiu, Prudence W. Wong, T. Lam, Y. Mui, H. Kung, Marie Lin, and Y. Cheung. Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics*, 21(2):144–51, January 2005.
- [99] Rosel Kretschmer-Kazemi Far and Georg Sczakiel. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 31(15):4417–4424, August 2003.
- [100] Kirk M. Brown, Chia-Ying Chu, and Tariq M. Rana. Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(5):469–70, May 2005.
- [101] Marita Overhoff, Martina Alken, Rosel Kretschmer-Kazemi Far, Marc Lemaitre, Bernard Lebleu, Georg Sczakiel, and Ian Robbins. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *Journal of Molecular Biology*, 348(4):871–81, May 2005.
- [102] Javier Martinez and Thomas Tuschl. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & Development*, pages 975–980, 2004.
- [103] H. Wu, Walt F. Lima, and Stanley T. Crooke. Investigating the structure of human RNase H1 by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26):23547–53, June 2001.
- [104] Jidong Liu, Michelle Carmell, Fabiola V. Rivas, Carolyn G. Marsden, J. Michael Thomson, Ji-Joon Song, Scott M. Hammond, Leemor Joshua-Tor, and Gregory J. Hannon. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689):1437–41, September 2004.
- [105] Ji-joon Song, Stephanie K. Smith, Gregory J. Hannon, and Leemor Joshua-Tor. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689):1434–7, September 2004.
- [106] Warren M. Kati, Kenneth A. Johnson, L. Fred Jerva, and Karen S. Anderson. Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(36):25988–97, December 1992.
- [107] Stefan Ludwig Ameres, Javier Martinez, and Renée Schroeder. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130(1):101–12, July 2007.
- [108] Gunter Meister, Markus Landthaler, Lasse Peters, Po Yu Chen, Henning Urlaub, Reinhard Lührmann, and Thomas Tuschl. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Current Biology*, 15(23):2149–55, December 2005.
- [109] Karen Bohmert, Isabelle Camus, Catherine Bellini, David Bouchez, Michel Caboche, and Christoph Benning. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO Journal*, 17(1):170–180, 1998.

## 6. Literaturverzeichnis

- [110] Scott M. Hammond, Sabrina Boettcher, Amy A. Caudy, Ryuji Kobayashi, and Gregory J. Hannon. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293(5532):1146–50, August 2001.
- [111] Daan C. Swarts, Kira Makarova, Yanli Wang, Kotaro Nakanishi, René F. Ketting, Eugene V. Koonin, Dinshaw J. Patel, and John van der Oost. The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(9):743–53, September 2014.
- [112] Erbay Yigit, Pedro J. Batista, Yanxia Bei, Ka Ming Pang, Chun-Chieh G. Chen, Niraj H. Tolia, Leemor Joshua-Tor, Shohei Mitani, Martin J. Simard, and Craig C. Mello. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, 127(4):747–57, November 2006.
- [113] Lasse Peters and Gunter Meister. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular Cell*, 26(5):611–23, June 2007.
- [114] Julia Höck and Gunter Meister. The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2):210, January 2008.
- [115] Daniel N. Cox, Anna Chao, and Haifan Lin. piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*, 127(3):503–14, February 2000.
- [116] Alla I. Kalmykova, Mikhail S. Klenov, and Vladimir Gvozdev. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Research*, 33(6):2052–9, January 2005.
- [117] Takashi Sasaki, Aiko Shiohama, Shinsei Minoshima, and Nobuyoshi Shimizu. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 82(3):323–30, September 2003.
- [118] Angélique Girard, Ravi Sachidanandam, Gregory J. Hannon, and Michelle Carmell. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442(7099):199–202, July 2006.
- [119] Toshiaki Watanabe, Atsushi Takeda, Tomoyuki Tsukiyama, Kazuyuki Mise, Tetsuro Okuno, Hiroyuki Sasaki, Naojiro Minami, and Hiroshi Imai. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & Development*, 20(13):1732–43, July 2006.
- [120] Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228):396–404, January 2009.
- [121] Christopher R. Faehnle and Leemor Joshua-Tor. Argonautes confront new small RNAs. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(5):569–77, October 2007.



- [122] Elisa Cora, Radha R. Pandey, Jordi Xiol, Josh Taylor, Ravi Sachidanandam, Andrew A. McCarthy, and Ramesh S. Pillai. The MID-PIWI module of Piwi proteins specifies nucleotide- and strand-biases of piRNAs. *RNA*, 20(6):773–81, June 2014.
- [123] Elad Elkayam, Claus-D. Kuhn, Ante Tocilj, Astrid D. Haase, Emily M. Greene, Gregory J. Hannon, and Leemor Joshua-Tor. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*, 150(1):100–10, July 2012.
- [124] Michelle A. Carmell, Zhenyu Xuan, Michael Q. Zhang, and Gregory J. Hannon. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development*, 16(21):2733–42, November 2002.
- [125] Gunter Meister, Markus Landthaler, Agnieszka Patkaniowska, Yair Dorsett, Grace Teng, and Thomas Tuschl. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 15(2):185–97, July 2004.
- [126] Dónal O’Carroll, Ingrid Mecklenbrauker, Partha Pratim Das, Angela Santana, Ulrich Koenig, Anton J. Enright, Eric A. Miska, and Alexander Tarakhovskiy. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes & Development*, 21(16):1999–2004, August 2007.
- [127] Daniel Cifuentes, Huiling Xue, David W. Taylor, Heather Patnode, Yuichiro Mishima, Si-hem Cheloufi, Enbo Ma, Shrikant Mane, Gregory J. Hannon, Nathan D. Lawson, Scot A. Wolfe, and Antonio J. Giraldez. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, 328(5986):1694–8, June 2010.
- [128] Sabine Rüdell, Andrew Flatley, Lasse Weinmann, Elisabeth Kremmer, and Gunter Meister. A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. *RNA*, 14(6):1244–53, June 2008.
- [129] G. Brett Robb, Kirk M. Brown, Jaspreet Khurana, and Tariq M. Rana. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(2):133–7, March 2005.
- [130] Daniel H. Kim, Louisa M. Villeneuve, Kevin V. Morris, and John J. Rossi. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9):793–7, September 2006.
- [131] Ira M. Hall, Gurumurthy D. Shankaranarayana, Ken-Ichi Noma, Nabieh Ayoub, Amikam Cohen, and Shiv I. Grewal. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, 297(5590):2232–7, September 2002.
- [132] Bethany Janowski, Kenneth E. Huffman, Jacob C. Schwartz, Rosalyn Ram, Robert Nordsell, David S. Shames, John D. Minna, and David R. Corey. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9):787–92, September 2006.

## 6. Literaturverzeichnis

- [133] Jidong Liu, Marco Antonio Valencia-Sanchez, Gregory J. Hannon, and Roy Parker. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology*, 7(7):719–23, July 2005.
- [134] Jidong Liu, Fabiola V. Rivas, James Wohlschlegel, John R. Yates, Roy Parker, and Gregory J. Hannon. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature Cell Biology*, 7(12):1261–6, December 2005.
- [135] Ana Eulalio, Eric Huntzinger, and Elisa Izaurralde. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(4):346–53, April 2008.
- [136] Anthony K. Leung, J. Mauro Calabrese, and Phillip A. Sharp. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48):18125–30, November 2006.
- [137] Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, John van der Oost, and Eugene V. Koonin. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biology Direct*, 4:29, January 2009.
- [138] Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, and Eugene V. Koonin. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research*, 41(8):4360–77, April 2013.
- [139] Adrian Zander, Phil Holzmeister, Daniel Klose, Philip Tinnefeld, and Dina Grohmann. Single-molecule FRET supports the two-state model of Argonaute action. *RNA Biology*, 11(1):1–12, December 2013.
- [140] Jin-Biao Ma, Yu-Ren Yuan, Gunter Meister, Yi Pei, Thomas Tuschl, and Dinshaw J. Patel. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 434(7033):666–70, March 2005.
- [141] Yu-Ren Yuan, Yi Pei, Jin-Biao Ma, Vitaly Kuryavyi, Maria Zhadina, Gunter Meister, Hong-Ying Chen, Zbigniew Dauter, Thomas Tuschl, and Dinshaw J. Patel. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Molecular Cell*, 19(3):405–19, August 2005.
- [142] Nicole T. Schirle, Jessica Sheu-Gruttadauria, and Ian J. MacRae. Structural basis for microRNA targeting. *Science*, 346(6209):608–613, October 2014.
- [143] Jin-Biao Ma, Yu-Ren Yuan, Gunter Meister, Yi Pei, Thomas Tuschl, and Dinshaw J. Patel. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 434(7033):666–70, March 2005.
- [144] Philipp Frank, Nahum Sonenberg, and Bhushan Nagar. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 465(7299):818–22, June 2010.

- [145] Andreas Lingel, Bernd Simon, Elisa Izaurralde, and Michael Sattler. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(6):576–7, June 2004.
- [146] Kotaro Nakanishi, David E. Weinberg, David P. Bartel, and Dinshaw J. Patel. Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, 486(7403):368–74, May 2012.
- [147] Pieter Bas Kwak and Yukihide Tomari. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(2):145–51, February 2012.
- [148] Judith Hauptmann, Anne Dueck, Simone Harlander, Janina Pfaff, Rainer Merkl, and Gunter Meister. Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(7):814–7, July 2013.
- [149] Nina Schürmann, Leonardo G. Trabuco, Christian Bender, Robert B. Russell, and Dirk Grimm. Molecular dissection of human Argonaute proteins by DNA shuffling. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(7):818–26, July 2013.
- [150] Christopher R. Faehnle, Elad Elkayam, Astrid D. Haase, Gregory J. Hannon, and Leemor Joshua-Tor. The making of a slicer: activation of human Argonaute-1. *Cell Reports*, 3(6):1901–9, June 2013.
- [151] Nicole T Schirle and Ian J. MacRae. The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, 336(6084):1037–40, May 2012.
- [152] Richard I. Gregory, Thimmaiah P. Chendrimada, Neil Cooch, and Ramin Shiekhattar. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4):631–40, November 2005.
- [153] Yoontae Lee, Inha Hur, Seong-Yeon Park, Young-Kook Kim, Mi Ra Suh, and V Narry Kim. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 25(3):522–32, February 2006.
- [154] Andrew Jakymiw, Shangli Lian, Theophany Eystathioy, Songqing Li, Minoru Satoh, John C. Hamel, Marvin J. Fritzler, and Edward K. Chan. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nature Cell Biology*, 7(12):1267–74, December 2005.
- [155] Hank H. Qi, Pat P. Ongusaha, Johanna Myllyharju, Dongmei Cheng, Outi Pakkanen, Yujiang Yang Shi, Sam W. Lee, and Junmin Peng. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature*, 455(7211):421–424, September 2009.
- [156] Yan Zeng, Heidi Sankala, Xiaoxiao Zhang, and Paul R Graves. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *The Biochemical Journal*, 413(3):429–36, August 2008.

## 6. Literaturverzeichnis

- [157] Sabine Rüdell, Yanli Wang, René Lenobel, Roman Körner, He-Hsuan Hsiao, Henning Urlaub, Dinshaw Patel, and Gunter Meister. Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Research*, 39(6):2330–43, March 2011.
- [158] Kelley S. Yan, Sherry Yan, Amjad Farooq, Arnold Han, Lei Zeng, and Ming-Ming Zhou. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 426(6965):468–74, November 2003.
- [159] Andreas Lingel, Bernd Simon, Elisa Izaurralde, and Michael Sattler. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426(6965):465–9, November 2003.
- [160] Jin-biao Ma, Keqiong Ye, and Dinshaw J. Patel. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429(6989):318–22, May 2004.
- [161] Seung-Ryoung Jung, Eunji Kim, Wonseok Hwang, Soochul Shin, Ji-Joon Song, and Sungchul Hohng. Dynamic anchoring of the 3'-end of the guide strand controls the target dissociation of Argonaute-guide complex. *Journal of the American Chemical Society*, 135(45):16865–71, November 2013.
- [162] Julia Winter and Sven Diederichs. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biology*, 8(6):1149–57, 2011.
- [163] James S. Parker, S. Mark Roe, and David Barford. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, 434(7033):663–6, March 2005.
- [164] Christopher R. Faehnle and Leemor Joshua-Tor. Argonaute MID domain takes centre stage. *EMBO Reports*, 11(8):564–5, August 2010.
- [165] Andreas Boland, Eric Huntzinger, Steffen Schmidt, Elisa Izaurralde, and Oliver Weichenrieder. Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26):10466–71, June 2011.
- [166] Yanli Wang, Stefan Juranek, Haitao Li, Gang Sheng, Thomas Tuschl, and Dinshaw J Patel. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 456(7219):209–13, November 2008.
- [167] Megha Ghildiyal, Hervé Seitz, Michael D. Horwich, Chengjian Li, Tingting Du, Soohyun Lee, Jia Xu, Ellen L. Kittler, Maria L. Zapp, Zhiping Weng, and Phillip D. Zamore. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, 320(5879):1077–81, May 2008.
- [168] Hai Yang Hu, Zheng Yan, Ying Xu, Hao Hu, Corinna Menzel, Yan Hong Zhou, Wei Chen, and Philipp Khaitovich. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10:413, January 2009.

- [169] Susanne Till, Erwan Lejeune, Rolf Thermann, Miriam Bortfeld, Michael Hothorn, Daniel Enderle, Constanze Heinrich, Matthias W. Hentze, and Andreas G. Ladurner. A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(10):897–903, October 2007.
- [170] James S. Parker, S. Mark Roe, and David Barford. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *The EMBO Journal*, 23(24):4727–37, December 2004.
- [171] Nicole J. Lambert, Sam G. Gu, and Alan M. Zahler. The conformation of microRNA seed regions in native microRNPs is prearranged for presentation to mRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 39(11):4827–35, June 2011.
- [172] Lorenzo Cerutti, Nina Mian, and Alex Bateman. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10):481–2, October 2000.
- [173] Liang Meng Wee, C. Fabián Flores-Jasso, William E. Salomon, and Phillip D. Zamore. Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell*, 151(5):1055–67, November 2012.
- [174] Ya-lin Chiu and Tariq M. Rana. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Molecular Cell*, 10(3):549–61, September 2002.
- [175] Dengming Ming, Michael E. Wall, and Kevin Y. Sanbonmatsu. Domain motions of Argonaute, the catalytic engine of RNA interference. *BMC Bioinformatics*, 8:470, January 2007.
- [176] David P. Bartel. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215–33, January 2009.
- [177] Yukihide Tomari and Phillip D. Zamore. Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19(5):517–29, March 2005.
- [178] Daniel St Johnston, Nicholas H. Brown, Joseph G. Gall, and Michael Jantsch. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22):10979–83, November 1992.
- [179] Jodi M. Ryter and Steve C. Schultz. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *The EMBO Journal*, 17(24):7505–13, December 1998.
- [180] Laura R. Saunders and Glen N. Barber. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *The FASEB Journal*, 17(9):961–83, June 2003.
- [181] Andres Ramos, Stefan Grünert, Jan Adams, David R. Micklem, Mark R. Proctor, Stefan Freund, Mark Bycroft, Daniel St Johnston, and Gabriele Varani. RNA recognition by

## 6. Literaturverzeichnis

- a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *The EMBO Journal*, 19(5):997–1009, March 2000.
- [182] Sambasivarao Nanduri, Bruce Carpick, Yanwu Yang, Bryan Williams, and Jun Qin. Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *The EMBO Journal*, 17(18):5458–65, September 1998.
- [183] Abelhakim Kharrat, Maria J. Macias, Toby J. Gibson, Michael Nilges, and Annalisa Pastore. Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III. *The EMBO Journal*, 14(14):3572–84, July 1995.
- [184] Mark Bycroft, Stefan Grünert, Alexey G. Murzin, Mark Proctor, and Daniel St Johnston. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *The EMBO Journal*, 14(14):3563–71, July 1995.
- [185] Bin Tian, Philip C. Bevilacqua, Amy Diegelman-Parente, and Michael B. Mathews. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(12):1013–23, December 2004.
- [186] Ivo Fierro-Monti and Michael B. Mathews. Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(5):241–6, May 2000.
- [187] Mark Bycroft, Mark Proctor, Stefan M. Freund, and Daniel St Johnston. Assignment of the backbone  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR resonances and secondary structure of a double-stranded RNA binding domain from the *Drosophila* protein staufen. *FEBS Letters*, 362(3):333–6, April 1995.
- [188] Ghislaine Laraki, Guerline Clerzius, Aicha Daher, Carlos Melendez-Pena, Sylvanne Daniels, and Anne Gatignol. Interactions between the double-stranded RNA-binding proteins TRBP and PACT define the Medipal domain that mediates protein-protein interactions. *RNA Biology*, 5(2):92–103, 2008.
- [189] Seisuke Yamashita, Takashi Nagata, Masahito Kawazoe, Chie Takemoto, Takanori Kigawa, Peter Güntert, Naohiro Kobayashi, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Motoaki Wakiyama, Yutaka Muto, and Shigeyuki Yokoyama. Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein. *Protein Science*, 20(1):118–30, January 2011.
- [190] Aicha Daher, Michele Longuet, Dominique Dorin, Florence Bois, Emmanuel Segeral, Sylvie Bannwarth, Pier-Luigi Battisti, Damian F. Purcell, Richard Benarous, Catherine Vaquero, Eliane F. Meurs, and Anne Gatignol. Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36):33899–905, September 2001.

- [191] Vishal Gupta, Xu Huang, and Rekha C. Patel. The carboxy-terminal, M3 motifs of PACT and TRBP have opposite effects on PKR activity. *Virology*, 315(2):283–291, October 2003.
- [192] Sylvanne M. Daniels and Anne Gatignol. The multiple functions of TRBP, at the hub of cell responses to viruses, stress, and cancer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3):652–66, September 2012.
- [193] Christine A. Kozak, Anne Gatignol, Kenneth Graham, Wesley McBride, K. Teh Jeang, and O. Wesley McBride. Genetic Mapping in Human and Mouse of the Locus Encoding TRBP, a Protein That Binds the TAR Region of the Human Immunodeficiency Virus (HIV-1). *Genomics*, 25:66–72, 1995.
- [194] Mariela Duarte, Kenneth Graham, Aicha Daher, Pier-Luigi Battisti, Sylvie Bannwarth, Emmanuel Segéral, Kuan-Teh Jeang, and Anne Gatignol. Characterization of TRBP1 and TRBP2. *Journal of Biomedical Science*, 7:494–506, 2000.
- [195] Sylvie Bannwarth, Lily Talakoub, Franck Letourneur, Mariela Duarte, Damian F. Purcell, John Hiscott, and Anne Gatignol. Organization of the human tarbp2 gene reveals two promoters that are repressed in an astrocytic cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(52):48803–13, December 2001.
- [196] Anne Gatignol, Alicia Buckler-White, Ben Berkhout, and Kuan-Teh Jeang. Characterization of a Human TAR RNA-binding Protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*, 251(5001):1597 – 6000, March 1991.
- [197] Anne Gatignol, Charles Buckler, and Kuan-Teh Jeang. Relatedness of an RNA-binding motif in human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA-binding protein TRBP to human P1/dsl kinase and *Drosophila* staufen. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4):2193–202, April 1993.
- [198] H Park, M V Davies, J O Langland, H W Chang, Y S Nam, J Tartaglia, E Paoletti, B L Jacobs, R J Kaufman, and S Venkatesan. TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11):4713–7, May 1994.
- [199] Moncef Benkirane, Christine Neuveut, Rene F. Chun, Stephen M. Smith, Charles E. Samuel, Anne Gatignol, and K T Jeang. Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *The EMBO Journal*, 16(3):611–24, February 1997.
- [200] Astrid D. Haase, Lukasz Jaskiewicz, Haidi Zhang, Sébastien Lainé, Ragna Sack, Anne Gatignol, and Witold Filipowicz. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Reports*, 6(10):961–7, October 2005.

## 6. Literaturverzeichnis

- [201] Zain Paroo, Xuecheng Ye, She Chen, and Qinghua Liu. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell*, 139(1):112–22, October 2009.
- [202] Kin Hang Kok, Ming-Him James Ng, Yick-Pang Ching, and Dong-Yan Jin. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24):17649–57, June 2007.
- [203] Srinivas Chakravarthy, Samuel H. Sternberg, Colleen A. Kellenberger, and Jennifer A. Doudna. Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *Journal of Molecular Biology*, 404(3):392–402, December 2010.
- [204] Ho Young Lee and Jennifer A. Doudna. TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA*, 18(11):2012–9, November 2012.
- [205] Ryan D. Morin, Michael D. O'Connor, Malachi Griffith, Florian Kuchenbauer, Allen Delaney, Anna-liisa Prabhu, Yongjun Zhao, Helen McDonald, Thomas Zeng, Martin Hirst, Connie J. Eaves, and Marco A. Marra. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Research*, 18(4):610–21, April 2008.
- [206] Qinghua Liu, Tim Rand, Savitha Kalidas, Fenghe Du, Hyun-Eui Kim, Dean P. Smith, and Xiaodong Wang. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science*, 301(5641):1921–5, October 2003.
- [207] Yukihide Tomari, Christian Matranga, Benjamin Haley, Natalia Martinez, and Phillip D. Zamore. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306(5700):1377–80, November 2004.
- [208] Dipali G. Sashital and Jennifer A. Doudna. Structural insights into RNA interference. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(1):90–7, February 2010.
- [209] Gregory A. Peters, Rune Hartmann, Jun Qin, and Ganes C. Sen. Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Molecular and Cellular Biology*, 21(6):1908–20, March 2001.
- [210] Xu Huang, Brian Hutchins, and Rekha C. Patel. The C-terminal, third conserved motif of the protein activator PACT plays an essential role in the activation of double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochemical Journal*, 366:175–186, 2002.
- [211] Rekha C. Patel and Ganes C. Sen. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *The EMBO Journal*, 17(15):4379–90, August 1998.
- [212] Ho Young Lee, Kaihong Zhou, Alison Marie Smith, Cameron L. Noland, and Jennifer A. Doudna. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Research*, 41(13):6568–6576, May 2013.



- [213] Veronique Picard, Eva Ersdal-Badju, Aiqin Lu, and Susan Bock. A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 22(13):2587–91, July 1994.
- [214] Jehan Lee, Hye-Jin Lee, Myeong-Kyun Shin, and Wang-Shick Ryu. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 36(3):398–400, March 2004.
- [215] D. Hanahan, J. Jessee, and F. R. Bloom. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204:63–113, January 1991.
- [216] S. C. Gill and P. H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182(2):319–26, November 1989.
- [217] U. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–5, August 1970.
- [218] Andrea Deerberg. *Biochemische Charakterisierung der siRNA-vermittelten Erkennung und Spaltung von target RNA durch humanes Argonaute2 Protein*. Doktorarbeit, Universität zu Lübeck, 2011.
- [219] Bingbing Wang, Shuqiang Li, Hank H. Qi, Dipanjan Chowdhury, Yang Shi, and Carl D. Novina. Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(12):1259–66, December 2009.
- [220] Munishika Kalia. *Insights into the functioning of Argonaute proteins with the aid of Molecular Dynamics simulations*. PhD thesis, Universität zu Lübeck, 2014.
- [221] Grace S. Tan, Barry G. Garchow, Xuhang Liu, Jennifer Yeung, John P. Morris, Trinna L. Cuellar, Michael T. McManus, and Marianthi Kiriakidou. Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic Acids Research*, 37(22):7533–45, December 2009.
- [222] Peter Y. Chou and Gerald D. Fasman. Empirical predictions of protein conformation. *Annual Review of Biochemistry*, 47:251–76, January 1978.
- [223] Shijun Mi, Tao Cai, Yugang Hu, Yemiao Chen, Emily Hodges, Fangrui Ni, Liang Wu, Shan Li, Huanyu Zhou, Chengzu Long, She Chen, Gregory J Hannon, and Yijun Qi. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133(1):116–27, April 2008.
- [224] Dianne S. Schwarz, György Hutvágner, Benjamin Haley, and Phillip D. Zamore. Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. *Molecular Cell*, 10(3):537–548, September 2002.
- [225] Frank Czauderna, Melanie Fechtner, Sibylle Dames, Hüseyin Aygün, Anke Klippel, Gijbertus J. Pronk, Klaus Giese, and Jörg Kaufmann. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 31(11):2705–2716, June 2003.

## 6. Literaturverzeichnis

- [226] Shintaro Iwasaki, Maki Kobayashi, Mayuko Yoda, Yuriko Sakaguchi, Susumu Katsuma, Tsutomu Suzuki, and Yukihide Tomari. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*, 39(2):292–9, July 2010.
- [227] Tomohiro Miyoshi, Akiko Takeuchi, Haruhiko Siomi, and Mikiko C. Siomi. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(8):1024–6, August 2010.
- [228] Megha Ghildiyal, Jia Xu, Hervé Seitz, Zhiping Weng, and Phillip D. Zamore. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA\* strands into the RNA interference pathway. *RNA*, 16(1):43–56, January 2010.
- [229] Hervé Seitz, Jogender S. Tushir, and Phillip D. Zamore. A 5'-uridine amplifies miRNA/miRNA\* asymmetry in *Drosophila* by promoting RNA-induced silencing complex formation. *Silence*, 2(1):4, January 2011.
- [230] Winfried Wünsche and Georg Sczakiel. The activity of siRNA in mammalian cells is related to the kinetics of siRNA-target recognition in vitro: mechanistic implications. *Journal of Molecular Biology*, 345(2):203–9, January 2005.
- [231] Simon Dornseifer, Sarah Willkomm, Rosel Kretschmer Kazemi-Far, Sandra Laufer, Thomas Martinetz, Georg Sczakiel, Jens Christian Claussen, and Tobias Restle. RNAi revised - target mRNA-dependent acceleration of product release likely controls gene silencing. *Manuskript kurz vor Einreichung*, 2015.
- [232] Mayuko Yoda, Tomoko Kawamata, Zain Paroo, Xuecheng Ye, Shintaro Iwasaki, Qinghua Liu, and Yukihide Tomari. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1):17–23, 2009.
- [233] Tomoko Takahashi, Takuya Miyakawa, Shuhei Zenno, Kenji Nishi, Masaru Tanokura, and Kumiko Ui-Tei. Distinguishable in vitro binding mode of monomeric TRBP and dimeric PACT with siRNA. *PLoS One*, 8(5):e63434, January 2013.
- [234] Greg S. Parker, Tuhin Subhra Maity, and Brenda L. Bass. dsRNA binding properties of RDE-4 and TRBP reflect their distinct roles in RNAi. *Journal of Molecular Biology*, 384(4):967–79, December 2008.
- [235] Gregory P. Cosentino, Sundararajan Venkatesan, Fabrizio C. Serluca, Simon R. Green, Michael B. Mathews, and Nahum Sonenberg. Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21):9445–9, October 1995.
- [236] Johannes Heidemann. Biochemische Charakterisierung von rekombinanten hTRBP und hPACT. *Bachelorarbeit*, 2011.

## 7. Abkürzungen

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
A <sub>260</sub>	bei 260 nm gemessene Absorption
A <sub>280</sub>	bei 280 nm gemessene Absorption
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex Aeolicus</i>
<i>A. fulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Ago	Argonaute
agRNA	<i>antigene</i> RNA
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMP	Cytosinmonophosphat
CTP	Cytosintriphosphat
D	Aspartat
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
dsRBD	dsRNA-bindenden Domäne
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

## 7. Abkürzungen

EIF2C	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2C
EMSA	Gelverzögerungsanalyse
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FAM	Carboxyfluorescein
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H	Histidin
hAgo2	humanes Argonaute 2 Protein
HF	hohe Genauigkeit
Hsc70	konstitutiv exprimierte Form des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70)
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
K	Lysin
<i>k</i>	Ratenkonstante
<i>k<sub>cat</sub></i>	Wechselzahl
<i>K<sub>m</sub></i>	Michaelismenten-Konstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Meter
M	Mol l <sup>-1</sup>
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
Mid	<i>middle</i>
min	Minuten
miRNA	<i>microRNA</i>
MjAgo	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> Argonaute
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
ml	Milliliter
mRNA	<i>messengerRNA</i>
n	nano
NMR	Nukleäre Magnetresonanz
NSL	Nukleotidspezifitäts-Schleife
nt	Nukleotid
NTP	Ribonukleotidtriphosphat

OB	Oligonukleotid/Oligosaccharid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte, die bei 600 nm gemessen wurde
P	Prolin
PAA	Polyacrylamid
PACT	Proteinkinase R-Aktivator
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	PIWI Argonaute Zwillie
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PfAgo	<i>Pyrococcus furiosus</i> Argonaute
pH	<i>potentium hydrogenii</i>
PIWI	<i>P-element-induced wimpy testis</i>
PKR	Proteinkinase R
pre-miRNA	<i>precursor</i> miRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> miRNA
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RITS	<i>RNA-induced initiation of transcriptional silencing</i>
RLC	<i>RISC-loading complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RsAgo	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> Argonaute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ss	einzelsträngig
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAR	<i>transactivating response</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TFB	<i>terrific broth</i>
TTP	Thymidintriphosphat
TLR	<i>toll-like receptor</i>

## 7. Abkürzungen

TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>
Trp	Tryptophan
tRNA	Transfer RNA
TtAgo	<i>Thermus thermophilus</i> Argonaute
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
UMP	Uracilmonophosphat
UTP	Uraciltriphosphat
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
XC	Xylencyanol
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Xlrbpa	<i>Xaenopus laevis RNA-binding protein A</i>

## 8. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Durchführung meines Promotionsvorhabens unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank **Prof. Dr. Tobias Restle**, der mir dieses interessante und auch herausfordernde Thema überlassen hat. Vielen Dank für die Unterstützung, Zeit und Betreuung über die letzten dreieinhalb Jahre! Ich möchte mich außerdem für die Freiheiten bei der Entwicklung meines Promotionsprojektes bedanken. **Prof. Dr. Georg Sczakiel** möchte ich für die Aufnahme in sein Institut und die Unterstützung meiner Arbeit unter anderem auch durch die Übernahme der Mentorenschaft für meine Promotion danken. Bei **Dr. habil. Jens Christian Claussen** bedanke ich mich für die Übernahme der Aufgabe als Zweitbetreuer meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei **Dr. Dina Grohmann** und **Adrian Zander** für die unkomplizierte Kooperation im Rahmen des MjAgo Projektes bedanken. Ebenfalls danke ich der **Graduate School for Computing in Medicine and Life Sciences** der Universität zu Lübeck für die finanzielle Unterstützung.

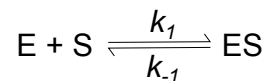
Mein Dank gilt ebenfalls allen **Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin**. Insbesondere danke ich **Dr. M. Kalia** für die gute Kooperation in unseren Ago Projekten, die Durchführung der *in silico* Arbeiten und vor allem die moralische Unterstützung und ablenkende Unternehmungen abseits der Promotion. Außerdem danke ich **Dr. Rosel Kretschmer Kazemi-Far** für die Überlassung von Protokollen, hilfreichen Tipps und moralische Unterstützung. Mein Dank gilt auch **Dr. Andrea Deerberg** für die praktische Einarbeitung im Labor. Für das gute Arbeitsklima bedanke ich mich bei **Petra Höltig**, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand und **Kirsten Frank**, die mich bei technischen Fragen unterstützte. **Michael Schütt** möchte ich für die gute Zusammenarbeit im Gruselkeller, Unterstützung bei allen Fragen rund um den Computer und das gute Arbeitsklima danken. Meinen **Bachelor- bzw. RISE Studenten** danke ich für die motivierte Mitarbeit an meinen Projekten.

Ich danke **meinen Freunden und meiner Familie** für die ständige Unterstützung und ihr Verständnis. Ganz besonders danke ich meinem Vater **Helmut Willkomm** für die Korrektur meiner Arbeit. Ganz besonders danke ich auch meinem Mann **Samuel Willkomm** für sein Verständnis und seine Geduld, Unterstützung in allen Situationen, Hilfe bei der Formatierung dieses Textes und den Glauben an mich und meine Fähigkeiten. Ohne Dich hätte ich es sicherlich nicht bis hierher geschafft!

# A. Theoretische Grundlagen der verwendeten Methoden

## A.1. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante unter Gleichgewichtsbedingungen

Enzym (E) und Substrat (S) reagieren zu einem Enzymsubstratkomplex (ES):



Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  wird anhand des Massenwirkungsgesetzes definiert durch:

$$K_D = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} \quad (\text{A.1})$$

Nach dem Massenerhaltungssatz gilt Folgendes:

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (\text{A.2})$$

und

$$[S]_0 = [S] + [ES] \quad (\text{A.3})$$

$[E]_0, [S]_0$  = Gesamtkonzentration von Enzym und Substrat

$[E], [S], [ES]$  = Konzentration von freiem Enzym, freiem Substrat und Enzymsubstratkomplex

Aus Gleichung A.2 und A.3 folgt:

$$K_D \times [ES] = ([E]_0 - [ES]) \times ([S]_0 - [ES]) \quad (\text{A.4})$$

$$K_D \times [ES] = ([E]_0 \times [S]_0) - [ES] \times ([E]_0 + [S]_0) + [ES]^2 \quad (\text{A.5})$$

$$0 = [ES]^2 - [ES] \times ([E]_0 + [S]_0 + K_D) + [E]_0 \times [S]_0 \quad (\text{A.6})$$



## A. Theoretische Grundlagen der verwendeten Methoden

Die Auflösung der quadratischen Gleichungen ergibt zwei mögliche Lösung, jedoch macht nur die mit einem negativen Vorzeichen vor der Wurzel physikalisch einen Sinn:

$$[ES] = \frac{([E]_0 + [S]_0 + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([E]_0 + [S]_0 + K_D)^2}{4} - [E]_0 \times [S]_0} \quad (\text{A.7})$$

Die quadratische Bindungsgleichung muss immer dann eingesetzt werden, wenn die Konzentration des konstant gehaltenen Bindungspartners in diesem Fall  $[S]_0$  den Wert  $K_D/5$  übersteigt. Ist dies nicht der Fall, kann auch eine hyperbolische Funktion zur Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante eingesetzt werden.

Die quadratische Bindungsgleichung A.7 dient als Grundlage, um die in dieser Arbeit durchgeführten Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen auszuwerten. Bei Bindung kommt es zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals  $\Delta F$  des konstant gehaltenen fluoreszenten Bindungspartners.  $\Delta F$  ist proportional zum Bindungsgrad definiert durch das Verhältnis von  $[ES]$  und  $[S]_0$ . Unter Sättigungsbedingungen stellt die maximale Änderung der Fluoreszenz  $\Delta F_{\max}$  die Proportionalitätskonstante dar.

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \times \frac{[ES]}{[S]_0} \quad (\text{A.8})$$

$\Delta F$  = Änderung des Fluoreszenzsignals nach jedem Titrationsschritt

$\Delta F_{\max}$  = maximale Änderung der Fluoreszenz

Nach jedem Schritt der Titration wird die gesamte Fluoreszenz  $F$  gemessen, die den ungebundenen fluoreszenten Bindungspartners und die Änderung bei Bindung des Bindungspartners E an das fluoreszente Substrat S repräsentiert.

$$F = F_{\max} - (\Delta F_{\max}) \times \frac{\frac{([E]_0 + [S]_0 + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([E]_0 + [S]_0 + K_D)^2}{4} - [E]_0 \times [S]_0}}{[S]_0} \quad (\text{A.9})$$

Die Bindung der beiden Bindungspartner kann eine Signalzunahme oder eine Signalabnahme induzieren. Im Falle einer Signalabnahme gilt Gleichung A.9. Führt die Bindung jedoch zu einer Zunahme der Gesamtfluoreszenz, gilt folgende Gleichung:

$$F = F_{\min} + (\Delta F_{\max}) \times \frac{\frac{([E]_0 + [S]_0 + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([E]_0 + [S]_0 + K_D)^2}{4} - [E]_0 \times [S]_0}}{[S]_0} \quad (\text{A.10})$$

Die in den Gleichgewichtstitrationen gemessenen Datenpunkte können mit Hilfe dieser quadratischen Gleichung mathematisch ausgewertet werden. Dabei werden  $F_{\max}$  und  $F_{\min}$  als Konstanten eingesetzt.

## A.2. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante mit Hilfe von Konkurrenztitration unter Gleichgewichtsbedingungen

Die Affinität eines Proteins zu einem Liganden kann auch dann bestimmt werden, wenn die Interaktion zwischen diesem Liganden und dem Protein nicht direkt detektiert werden kann. Es wird ein anderer Ligand benötigt, dessen Bindung an das Protein detektiert werden kann. Weiterhin ist es notwendig, dass die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Proteins mit dem alternativen Liganden bekannt ist. Durch Titration des Komplexes aus Protein und bekannten Liganden mit dem unbekanntem Liganden, kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante über die Änderung der Fluoreszenz bei Dissoziation des bekannten Liganden aus dem Komplex bestimmt werden. Die Daten konnten mit Hilfe des Programms Scientist (siehe Tabelle 3.1.12) mathematisch ausgewertet werden. Dazu wurde folgendes Modell verwendet:

**Tabelle A.1.: Modell zu Ermittlung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante durch Konkurrenztitration.**

### Modell

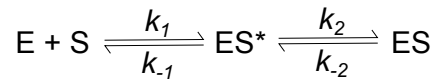
IndVars	Ctot
DepVars	Af, Bf, AB, AC, Cf, F
Params	Kd1, Kd2, Atot, Btot, Yb, Yab
AB = Af x Bf/Kd1	
AC = AF x Cf/Kd2	
Atot = Af + AB + AC	
Btot = Bf + AB	
Ctot = Cf + AC	
0 < Af < Atot	
0 < Bf < Btot	
0 < Cf < Ctot	
F = Bf x Yb + AB x Yab	

### Definitionen

A	Protein
B	fluoreszenzmarkiertes Substrat
C	unmarkiertes Substrat
f	freie Konzentration
tot	gesamte Konzentration
F	Fluoreszenz
Kd1	Kd von B
Kd2	Kd von C
Yb	$F_{Btot, frei}/[Btot]$
Yab	$F_{AB, im\ Komplex}/[AB]$

### A.3. Bestimmung der *pre-steady state* Ratenkonstanten mit Hilfe der *stopped flow* Methode

Mit Hilfe der *stopped flow* Methode wurde die Bildung bzw. die Dissoziation von Protein-Substrat Komplexen untersucht und so die *pre-steady state* Ratenkonstanten der Assoziation und der Dissoziation binärer und ternärer Komplexe bestimmt. Die Bildung der Protein-Substrat-Komplexe erfolgt über eine oder mehrere Zwischenstufen (ES\*):



Die Ratenkonstante  $k_1$  ist dabei in den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Experimenten eine Ratenkonstante zweiter Ordnung mit der Einheit  $M^{-1} s^{-1}$ . Die erste Phase, beschrieben durch  $k_1$ , repräsentiert in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten die diffusionskontrollierte und konzentrationsabhängige Bildung eines Kollisionskomplexes zwischen den Bindungspartnern. Die Ratenkonstanten  $k_{-1}$ ,  $k_2$  und  $k_{-2}$  haben die Einheit  $s^{-1}$ .

Der Zerfall und Aufbau der Spezies ES und ES\* wird jeweils durch eine einfach exponentielle Gleichung mathematisch beschrieben. Dabei repräsentiert A die Amplitude des jeweiligen Prozesses:

$$\frac{[ES^*]}{[E]_0} = A_{ES^*} \times e^{-k \times t} \quad (A.11)$$

$$\frac{[ES]}{[E]_0} = A_{ES} \times e^{-k \times t} \quad (A.12)$$

Die mathematische Auswertung eines mehrstufigen Bindungsprozesses erfolgt somit über die Addition der exponentiellen Terme.

### A.4. Bestimmung von Partikelgrößen mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Mit Hilfe der DLS Methode kann die Größenverteilung von Partikeln, die im Vergleich zu Wellenlänge klein sind, in Lösung bestimmt werden. Dabei wird die Streuung des Lichts eines Lasers in dieser Lösung aufgezeichnet. Die dynamische Information wird mittels einer Autokorrelationsfunktion der im Experiment gemessenen Intensitäten gewonnen:

$$g^2(q; \tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (A.13)$$

$I(t)$  = Intensität zum Zeitpunkt  $t$

$\tau$  = experimentelle Verzögerungszeit

$q$  = Streuvektor

#### A.4. Bestimmung von Partikelgrößen mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung (DLS)

In einer monodispersen Lösung (Polydispersität bis etwa 30 %) kann die Autokorrelationsfunktion wie ein einfach exponentieller Abfall behandelt werden:

$$g^1(q; \tau) = e^{(-\tau\Gamma)} \quad (\text{A.14})$$

$\Gamma$  = Zerfallsrate

Dies erlaubt mit Hilfe der Definition für den Streuvektor,

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right) \quad (\text{A.15})$$

$n$  = Brechungsindex des Lösungsmittels

$\Theta$  = Streuwinkel

$\lambda$  = Wellenlänge

die Berechnung des Diffusionskoeffizienten  $D$ :

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (\text{A.16})$$

Über die Stokes-Einstein Beziehung erlaubt dies die Kalkulation des hydrodynamischen Radius der sich in Lösung befindenden Partikel:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (\text{A.17})$$

$k_B$  = Boltzmannkonstante

$T$  = Temperatur

$\eta$  = Viskosität des verwendeten Puffers

Der hydrodynamische Radius gibt keine Auskunft über die tatsächliche Größe eines Partikels. Er gibt Auskunft über die Größe eines sphärischen Partikels, welcher sich in Lösung mit Hilfe Brown'scher Molekularbewegung so bewegt wie der gemessene Partikel und ist somit meist geringer als der tatsächliche Radius. Mit Hilfe des Molekulargewichts des zu untersuchenden Proteins kann jedoch dessen hydrodynamischer Radius abgeschätzt werden.

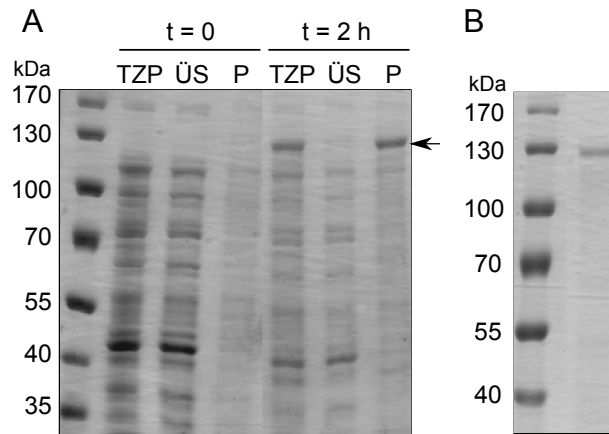


## **B. Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine**

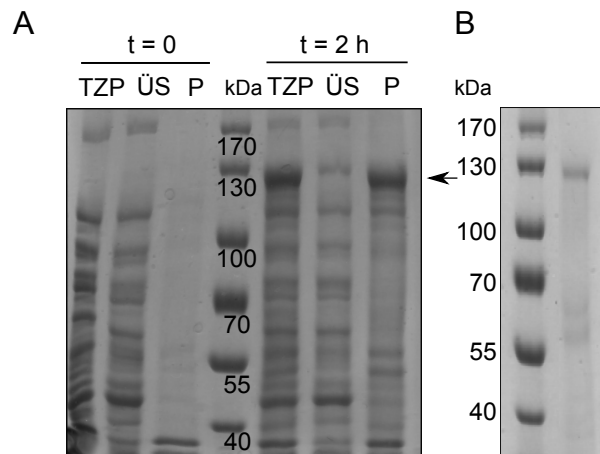
Im folgenden Abschnitt sind beispielhaft Coomassie-gefärbte Gele mit Expressionskontrolle und Darstellung der gereinigten Proteine abgebildet. Abbildungsteil A zeigt jeweils die Expressionskontrolle mit den Proben: TZP = Totalzellprotein, ÜS = Überstand, P = Pellet zum Zeitpunkt  $t = 0$  vor Induktion der Proteinexpression mit IPTG und zum Zeitpunkt  $t = 1$  h bzw.  $t = 2$  h nach Induktion mit IPTG. Der Pfeil markiert jeweils die Position des überexprimierten Proteins. Abbildungsteil B zeigt jeweils eine SDS-PAGE Analyse der jeweils gereinigten rekombinanten Proteine. Für die hAgo2 Mutanten wurden Trenngele mit 8 % Polyacrylamid verwendet, während für hPACT bzw. die hTRBP Mutanten Trenngele mit 10 % Polyacrylamid eingesetzt wurden. Details zum Expressions- und Reinigungsprotokoll sind unter Material und Methoden beschrieben (siehe Abschnitt 3).

B. Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

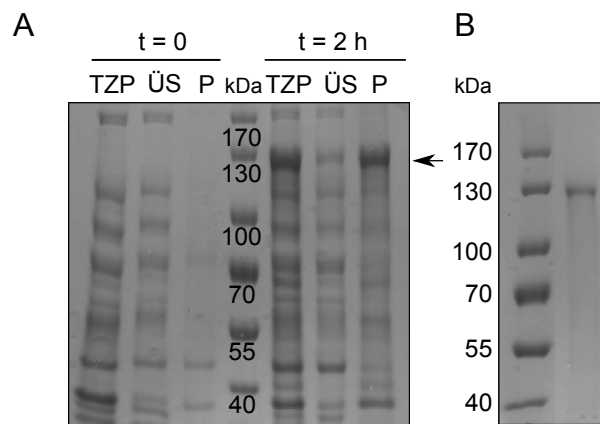
**hAgo2**



**hAgo2-PAZ9**

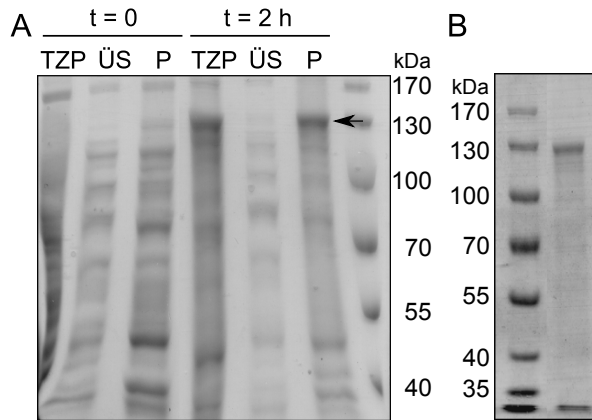


**hAgo2-Mid3**



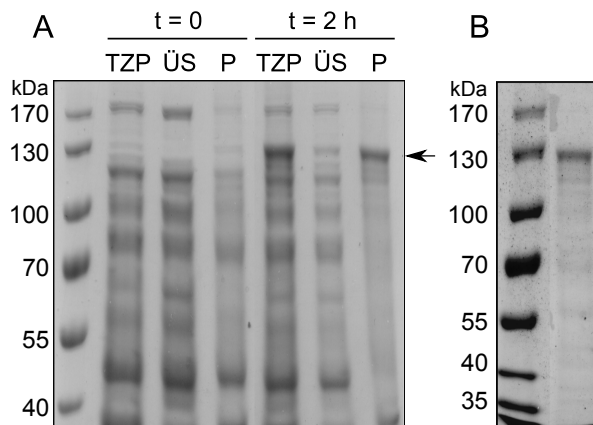
### **hAgo2-E637A**

(Expression und Reinigung in Zusammenarbeit mit J.Ernesti durchgeführt.)



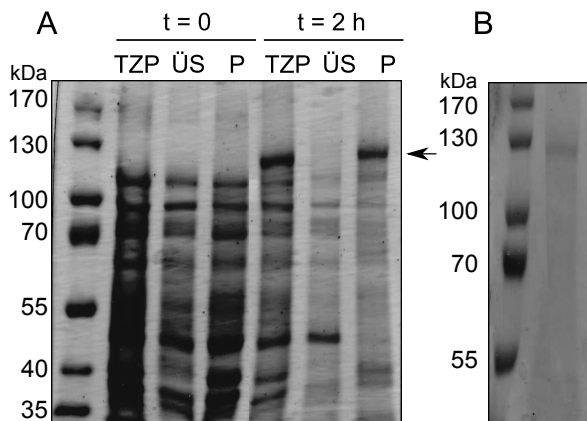
### **hAgo2-E637A-D669A**

(Expression und Reinigung in Zusammenarbeit mit J.Ernesti durchgeführt.)



### **hAgo2-D669A**

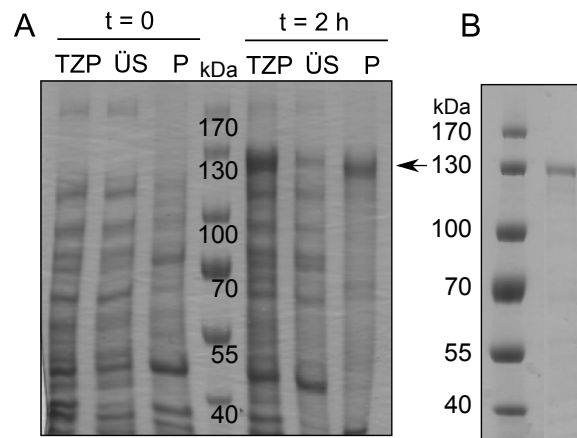
(Expression und Reinigung in Zusammenarbeit mit S. Hanika durchgeführt.)





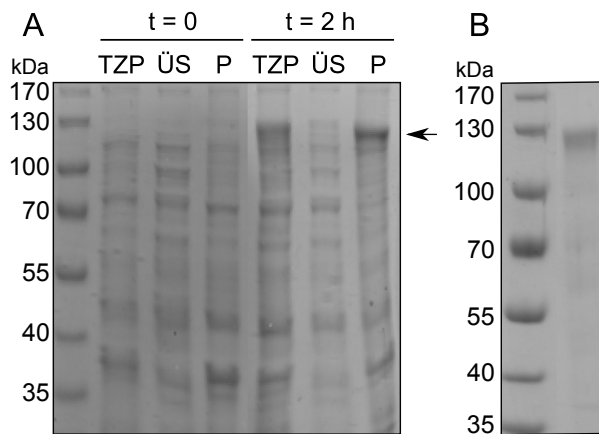
B. Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

**hAgo2-D358A**

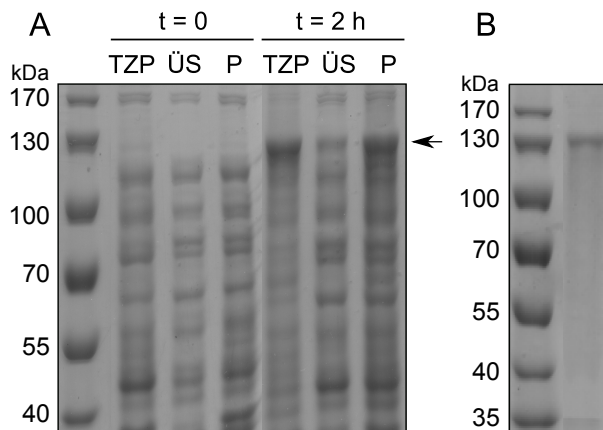


**hAgo2-I365A**

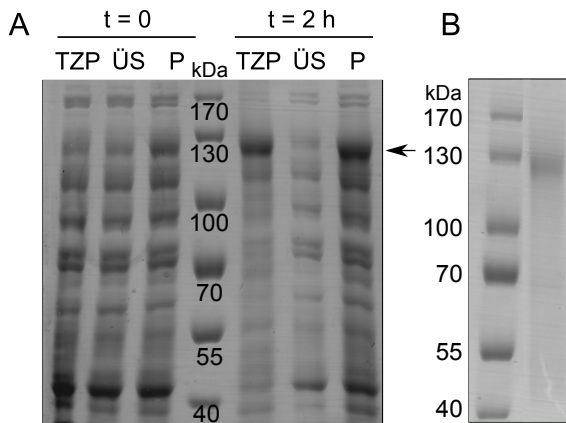
(Expression und Reinigung in Zusammenarbeit mit J.Ernesti durchgeführt.)



**hAgo2-D597A**

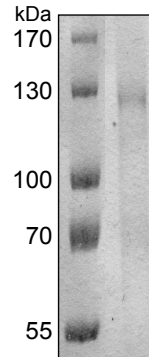


### hAgo2-D597A-E637A-D669A



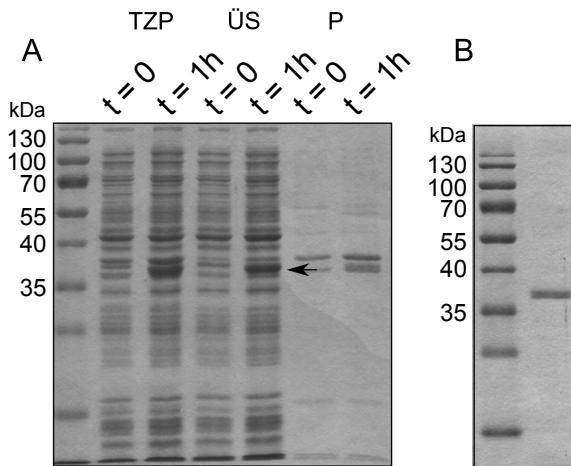
### hAgo2-K525A

(Expression und Reinigung in Zusammenarbeit mit J. Ernesti durchgeführt.)

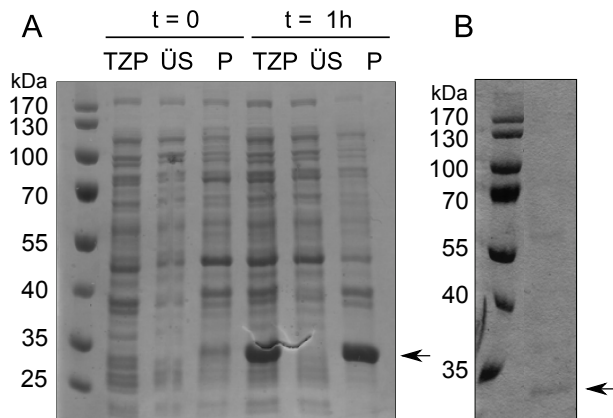


### hPACT

(Expression und Reinigung in Zusammenarbeit mit F. Flügge durchgeführt.)



### hTRBP-D23



### hTRBP-D12

(Expression und Reinigung in Zusammenarbeit mit R. Hu und J. Meine durchgeführt.)

