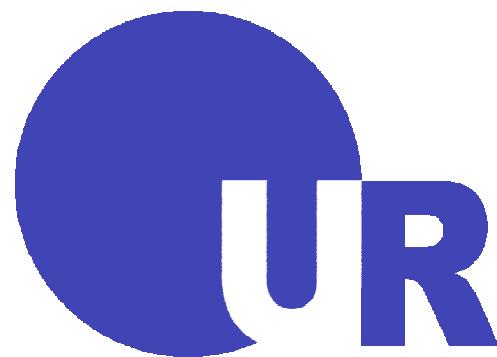


Analyse von kleinen RNAs mit RNA-bindenden Proteinen in *Pyrococcus furiosus*



Dissertation

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Andreas Bosch

aus Deggendorf

im Jahr 2014

Promotionsgesuch eingereicht am: 28.03.2014

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Michael Thomm

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. H. Tschochner

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Thomm
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Meister
3. Prüfer: Prof. Dr. R. Wirth

Unterschrift:

**Meiner Familie,
in Liebe und Dankbarkeit**

„What went wrong? Nothing and everything.“

(Nick Hornby)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden.....	13
1. Bezugsquelle von Substanzen	13
1.1. Chemikalien und Lösungsmittel	13
1.2. Biochemikalien und Enzyme.....	14
1.3. Molekularmassenstandard.....	15
1.4. Kits, Membranen und Filtereinheiten	15
1.5. Antikörper.....	15
1.5.1. Polyklonale Primärantikörper (1° AK).....	15
1.5.2. Sekundärantikörper (2° AK).....	16
2. Kulturmedien.....	16
2.1. $\frac{1}{2}$ SME-Medium	16
2.1.1. Zusammensetzung.....	16
2.1.2. Herstellung und Sterilisation	17
2.2. Standard Kulturmedium <i>Pyrococcus furiosus</i>	17
2.2.1. Zusammensetzung.....	17
2.2.2. Herstellung und Sterilisation	17
2.2.3. Herstellung und Sterilisation für Großanzuchten im Fermenter	18
2.3. LB-Medium und SOC-Medium für <i>E.coli</i>	18
2.3.1. Zusammensetzung.....	18
2.3.2. Herstellung und Sterilisation	18
3. Verwendete Organismen, Kultivierung und Transformation.....	19
3.1. Verwendete Organismen	19
3.2. Kultivierung von <i>E.coli</i>	19
3.3. Transformation in <i>E.coli</i>	19
3.4. Blau-Weiß-Selektion	19
3.5. Isolation von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	20
3.6. Kultivierung von <i>P. furiosus</i>	20
3.7. Kultivierung von <i>P. furiosus</i> auf Gelriteplatten	20
3.8. Transformation von <i>P. furiosus</i>	20
3.9. Isolation von genomischer DNA aus <i>P.furiosus</i>	21
3.9.1. Isolierung für PCR Analysen.....	21
3.9.2. Isolierung in größerem Maßstab mittels Chloroform/Phenol Extraktion	21
3.9.3. DNA-Isolierung Schnelltest.....	22
3.10. Isolation ribosomaler RNA aus <i>P.furiosus</i>	22

4. Verwendete Plasmide, Primer und Oligonukleotide.....	23
4.1. Plasmide	23
4.2. Primer und Oligonukleotide	23
5. Molekularbiologische Methoden	25
5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
5.1.1. Konventionelle PCR	25
5.1.2. Fusion PCR	25
5.1.3. Kolonie PCR.....	26
5.2. Gelelektrophorese.....	27
5.2.1. Agarosegel-Elektrophorese	27
5.2.2. Formaldehyd fixierte Agarosegel-Elektrophorese	27
5.3. Ethanolfällung.....	28
5.4. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	29
5.5. Nuklease-Behandlungen.....	29
5.6. Proteinase-Behandlungen	29
5.7. Sequenzierungen.....	30
5.8. Restriktionsanalysen.....	30
5.9. Ligationen	30
5.10. Markierung von Nukleinsäuren mittels [γ - ³² P]-ATP	31
6. Konstruktion eines Shuttle-Vektors für die Expression von <i>Pf</i> -Ago in <i>Pyrococcus furiosus</i>	31
7. Proteinexpression und Zellaufschluss	33
7.1. Expression in <i>E.coli</i>	33
7.2. Zellaufschluss und Hitzedenaturierungsschritt bei <i>E.coli</i>	33
7.3. Expression in <i>P.furiosus</i>	34
7.4. Zellaufschluss von <i>P.furiosus</i>	34
7.5. Glycerinkulturen	35
8. Chromatographische Trennverfahren.....	35
8.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie	35
8.2. Gelfiltrations-Chromatographie (SEC)	36
8.3. Analytische Gelfiltration	37
8.4. Saccharose-Dichtegradient.....	37
9. Proteinbiochemische Methoden.....	38
9.1. Proteinkonzentrationsbestimmung	38
9.2. Konzentrierung, Umpufferung und Dialyse von Proteinlösungen	38
9.3. Gelelektrophoretische Verfahren.....	38
9.3.1. SDS-PAGE.....	38
9.3.2. Native PAGE.....	40
9.4. Färbung von Proteingelen	41

9.4.1. Coomassiefärbung.....	41
9.4.2. Silberfärbung	41
10. Immunologische Verfahren.....	42
10.1. Gewinnung spezifischer Antiseren und Antikörper	42
10.2. Aufreinigung der erhaltenen Antiseren	42
10.3. Western-Blot	43
10.4. Immundetektion.....	44
11. Co-Immunpräzipitation	44
12. Analyse der Immunpräzipitate durch Western-Blot-Analysen	45
13. Klonierung von small RNA	45
13.1. Barcodes und Adaptoren für small RNA Sequencing	45
13.2. Klonierung und Aufreinigung von small RNAs.....	46
13.2.1. Ligation des 3`-Adaptors	47
13.2.2. Ligation des 5`-Adaptors	47
13.2.3. cDNA Synthese	48
13.2.4. Vervielfältigung der cDNA durch Pilot-PCR	48
13.2.5. Scale up PCR	49
13.2.6. Aufreinigung der klonierten small RNA.....	49
14. Bioinformatische Analysen.....	50
15. MALDI-TOF MS/MS.....	50
16. Northern-Blot	51
17. Protein/Nukleinsäure-EMSA und Protein/Nukleinsäure-Verdau.....	52
17.1. Analyse der Nukleinsäure-Protein-Bindungsaktivität mit Hilfe von EMSA-Versuchen.....	52
17.2. Untersuchung der Nukleinsäure-Protein-Schneideaktivität mittels EMSA-Methode	53
18. Argonaute Knock-out Untersuchungen.....	53
18.1. Herstellung von pUC19-ΔPF0537::Tk-SimR zum Knock-out des Genabschnitts PF0537	53
18.2. Transformation des Knock-out Konstruktes in <i>P. furiosus</i>	56
III. Ergebnisse	57
1. LSm-Protein aus <i>P. furiosus</i> (PF1542).....	57
1.1. Analytische Gelfiltration des LSm-Proteins durch die Superdex 75 10/300 GL – Säule	57
2. Argonaute-Protein (PF0537)	58
2.1. Klonierung von PF0537 in pYS3 für Expression in <i>P. furiosus</i>	58
2.2. Expression und Aufreinigung von <i>Pf</i> -Ago in <i>P. furiosus</i>	61
2.3. Interaktionspartner von PF0537	62
2.3.1. Saccharose-Dichthegradient zur Entschlüsselung möglicher Interaktionspartner	62
2.3.2. Massenspektroskopische Identifizierung möglicher Interaktionspartner	63
2.4. Test der aufgereinigten Ago-Antikörper mittels Western-Blot.....	63

2.5. Überprüfung der Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analysen.....	64
2.6. Analyse der mit dem Ago-Protein interagierenden Nukleinsäuren	65
2.7. sRNA-Klonierung der präzipitierten Nukleinsäuren	66
2.7.1. Ligation der Adapter und Herstellung der entsprechenden cDNA	66
2.7.2. Sequenzierung der klonierten sRNA.....	67
2.8. Auswertung der Sequenzierergebnisse.....	67
2.8.1. Aufschlüsselung der Sequenzen nach Länge und Mapping gegen das <i>P. furiosus</i> -Genom	68
2.8.2. Multiples Sequenzalignment (MSA) der Treffer im Bereich der 16S rRNA.....	72
2.9. Northern-Blot zur Validierung der Sequenzierergebnisse	75
2.10. Interaktionsanalysen des Argonaute-Proteins mit verschiedenen Nukleinsäuren sowie anschließende Spaltexperimente.....	78
2.11. Suche nach möglichen <i>guide</i> RNAs für die abgebaute <i>target</i> RNA (16S rRNA) in den Sequenzierungsergebnissen.....	82
2.12. Bindungsstellen der <i>seed sequence</i> an der 16S rRNA	83
2.13. Konstruktion der <i>P. furiosus</i> Argonaute-Deletionsmutante ΔPF0537:: <i>Tk</i> -SimR	84
2.13.1. Herstellung der ΔPF0537:: <i>Tk</i> -SimR - Kassette.....	85
2.13.2. Herstellung von pUC19-ΔPF0537:: <i>Tk</i> -SimR.....	87
2.13.3. Transformation und Selektion in <i>P. furiosus</i>	88
IV. Diskussion	91
1. Charakterisierung des oligomeren LSm-Proteinkomplexes	91
2. Klonierung und Expression des Argonaute-Proteins in <i>P. furiosus</i>	92
3. Entschlüsselung möglicher Interaktionspartner durch Saccharose-Dichtegradienten.....	93
4. Test der aufgereinigten der IgG-Fraktionen (Ago) durch Western-Blot-Experimente.....	94
5. Überprüfung der Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analysen.....	94
6. Identifizierung der an Ago gebundenen Nukleinsäuren	95
7. Klonierung der präzipitierten Ribonukleinsäure und qualitative Analyse durch das KFB.....	95
8. Auswertung der Sequenzierergebnisse.....	96
9. Northern-Blot zur Validierung der Sequenzierergebnisse	97
10. Interaktionsanalysen des Argonaute-Proteins mit verschiedenen Nukleinsäuren sowie anschließende Spaltexperimente.....	98
11. Suche nach möglichen <i>guide</i> RNAs für die abgebaute <i>target</i> RNA (16S rRNA) in den Sequenzierungsergebnissen.....	100
12. Bindungsstellen der <i>seed sequence</i> an der 16S rRNA.....	100
13. Knock-out des Argonaute-Proteins in <i>P. furiosus</i>	101
V. Zusammenfassung	103
VI. Summary	105
VII. Literaturverzeichnis	107

VIII. Anhang.....	123
1. Abkürzungsverzeichnis	123
2. Sequenzdaten.....	125
2.1. pMUR315.....	125
2.2. pMUR272.....	129
3. Begleit-CD	133
4. Lebenslauf	134
5. Danksagung	135
6. Eidesstattliche Erklärung.....	137

I. Einleitung

"Nichts ist tatsächlich so, wie es scheint in dieser Welt." – Dieser Ausspruch des griechischen Philosophen Platon (427 v. Chr. – 347 v. Chr.) steht sinnbildlich für die vielen ungelösten Rätsel dieses Planeten. Er steht jedoch auch für den ständigen Wissensdurst des Menschen und dessen Versuche, die komplexen Vorgänge in seiner Umgebung besser verstehen zu können. Auf diesem Weg des Verstehens wägte sich der Mensch oft schon auf der sicheren Seite, wurde jedoch häufig eines Besseren belehrt. So galt die 1866 von Haeckel veröffentlichte Theorie, nach welcher Lebewesen in die drei Reiche Animalia (Tiere), Plantae (Pflanzen) und Protista (Protisten/einzellige Organismen) unterteilt werden, als verbindlich und unumstößlich. Gut 100 Jahre später veröffentlichte Carl Woese eine neue Theorie, mit welcher das Leben auf der Erde klassifiziert werden konnte. Laut dieser Theorie lassen sich alle Lebewesen in drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea einteilen. Die Einführung der neuen Domäne der Archaeen änderte die Basis des evolutionären Stammbaums. Erstmals wurde die phylogenetische Taxonomie anhand genetischer Untersuchungen erstellt. Je ähnlicher die Sequenz zweier zu vergleichender Organismen, desto näher sind sie miteinander verwandt. Als zu vergleichende Sequenz wurde die ribosomale Ribonukleinsäure, kurz rRNA gewählt. Da die rRNA zur Grundausrüstung jeder lebenden Zelle gehört und sie in allen Organismen die gleiche Aufgabe erfüllt, war sie als Untersuchungsobjekt ideal. Außerdem evolviert sie in allen Organismen mit ähnlicher Geschwindigkeit und spiegelt so die jeweilige Entwicklungsgeschichte wider.

Nichts ist tatsächlich so, wie es scheint in dieser Welt. Dies trifft auch für die Ribonukleinsäure zu. Früher galt die RNA vorrangig als Bindeglied zur Genausprägung zwischen DNA und Proteinen. Diese Sichtweise hat sich deutlich verändert. Die letzten Jahre haben gezeigt, dass RNA-Moleküle zu Beginn der Evolution dass Maß aller Dinge als Speicher der Erbinformation und auch zentraler Katalysator der Lebensprozesse waren. Außerdem stellte sich kürzlich heraus, dass die RNA weit mehr biologische Funktionen besitzt als bisher angenommen. Ursprünglich wies man der RNA nur drei grundlegende Rollen zu, nämlich als essentieller Bestandteil der Proteinbiosynthesemaschinerie, der Ribosomen, dort in Form der eben erwähnten rRNA und als transfer RNA (tRNA). Außerdem als Botenstoff der Erbinformation in Form von messenger RNA (mRNA), sowie als genetisches Material bestimmter Viren. Es war seit längerer Zeit bekannt, dass RNA selbst, wie Enzyme, katalytisch aktiv sein kann. Auch war gezeigt worden, dass kleine, nicht-translatierte RNAs wichtige Funktionen innerhalb der Zelle besitzen. Außerdem war bekannt, dass nicht-kodierende RNA-Moleküle selbst als Regulator der Genexpression fungieren können. Jedoch schienen sich diese regulatorischen Funktionen hauptsächlich auf bakterielle Plasmide, Phagen oder Transposons zu beschränken. Diese Annahme musste korrigiert werden, als vor wenigen Jahren eine systematische Suche in Bakterien und höheren Lebewesen eine enorme Menge an nichtkodierenden, kleinen RNAs zutage förderte.

Nichtkodierende, kleine RNAs, welche bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen, lassen sich aufgrund ihrer Struktur, Biogenese, Vorkommen und Funktionsweise in verschiedene Klassen unterteilen. Die größten fünf Klassen bilden die kleinen, interferierenden RNAs (engl.: *small interfering RNAs*, kurz: **siRNAs**), die mit PIWI-Proteinen interagierenden RNAs (engl.: *PIWI-interacting RNAs*, kurz **piRNAs**), die microRNAs (**miRNAs**), kleine, nukleäre Ribonukleinsäuren (engl.: *small nuclear RNAs*, kurz: **snRNAs**) sowie kleine, nukleoläre Ribonukleinsäuren (engl.: *small nucleolar RNAs*, kurz: **snoRNAs**).

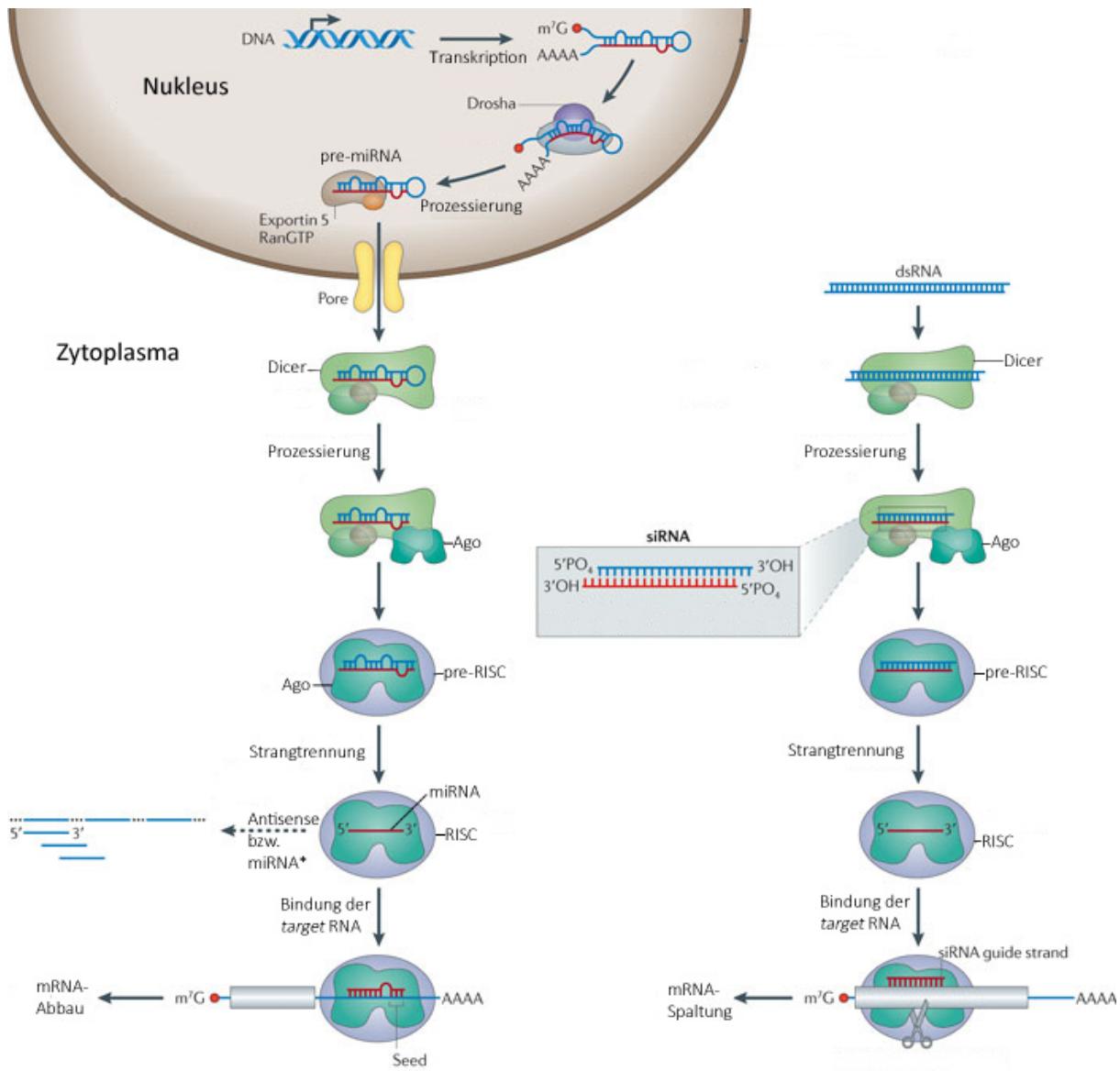


Abbildung 1 miRNA- (links) und siRNA- (rechts) Prozessierung und Aktivität im späteren RISC. Im Falle der miRNA wird durch die RNA Polymerase die pri-miRNA transkribiert und von Drosha zu pre-miRNA prozessiert. Diese enthält eine Haarnadelstruktur und kann außerdem einige „bulges“ aufweisen. Nach dem Export in das Zytosol wird es von Dicer abgebaut und zu einer miRNA-miRNA*-Duplex umgewandelt, welche wiederum vom Argonaute-Protein gebunden wird. Somit bildet sich der pre-RISC. Es erfolgt die Trennung vom „Begleitstrang“ und der RISC ist bereit zur Interaktion mit der target RNA. Der Bereich der *seed sequence* spielt bei der Identifizierung der target RNA eine entscheidende Rolle. Nach der Interaktion erfolgt der Abbau der mRNA bzw. target RNA. Der Weg der siRNA beginnt mit einer doppelsträngigen RNA, welche durch das Protein Dicer prozessiert wird. Die dadurch erhaltene siRNA besitzt 3'-Nukleotidüberhänge sowie 5'-Phosphatgruppen. Anschließend bildet sich der pre-RISC, welcher ein Ago-Protein als Herzstück trägt. Nach der Strangtrennung wird der RISC aktiv und kann die target RNA binden, welche kurz darauf geschnitten wird. (Davidson und McCray, 2011; leicht abgeändert).

Eine wichtige Möglichkeit, wie diese nichtkodierenden RNAs die Genexpression regulieren können, ist die RNA-Interferenz, kurz **RNAi**. Unter RNAi versteht man die durch doppelsträngige RNAs ausgelöste, sequenzspezifische Spaltung einer komplementären RNA. Dieses Phänomen konnte erstmals 1990 in Petunien entdeckt werden. Durch das Einbringen weiterer Genkopien in diese Pflanze sollte die Blütenfarbe intensiviert werden, jedoch schlug dies ins Gegenteil um und die

Petunien zeigten teils weiße Blüten (Napoli *et al.*, 1990). In Tieren, genauer gesagt *Caenorhabditis elegans*, wurde RNAi erst acht Jahre später durch Andrew Fire und Craig Mello entdeckt (Fire *et al.*, 1998) und dieser Befund 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

In vielen Lebewesen wird RNAi durch lange, doppelsträngige RNA induziert (Fire *et al.*, 1998; Hammond *et al.*, 2000), jedoch haben zahlreiche Studien gezeigt, dass auf molekularer Ebene 19 bp lange RNA-Duplices als Auslöser für RNAi gelten. Hierbei handelt es sich um die **siRNA**. Die siRNA resultiert aus diesen langen, doppelsträngigen RNA-Molekülen, welche durch Dicer, einem Ribonuklease (RNase)-III-Enzym, prozessiert werden (Abb. 1). Die siRNA trägt nach der Dicer-Prozessierung charakteristische, ungepaarte Überhänge von zwei Nukleotiden Länge an den 3'- und Phosphatgruppen an den 5'-Enden (Fire *et al.*, 1998, Hamilton *et al.*, 1999, Elbashir *et al.*, 2001). Diese RNA-Duplices setzen sich zusammen aus dem „Leitstrang“ (engl.: *guide strand*) und dem „Begleitstrang“ (engl.: *passenger strand*). Der Leitstrang besitzt nahezu perfekte Sequenzkomplementarität zur *target*-RNA und wird daher oft als *antisense*-Strang bezeichnet. Der Begleitstrang wird dementsprechend als *sense*-Strang tituliert (Rana *et al.*, 2007). Er wird nach der Strangtrennung in der Regel abgebaut. Der Leitstrang hingegen wird in einen Vertreter der Klasse der Argonaute-Proteine (kurz Ago) eingebaut. Die Thermodynamik der Basenpaarung gibt vor, welcher der beiden Stränge Leitstrang und welcher Begleitstrang wird. So wird der Strang, dessen 5'-Ende weniger stabil gebunden ist, Leitstrang (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Über komplementäre Basenpaarung bestimmt er dann die *target*-RNA und positioniert zudem das Argonaute-Protein. Besitzt das Argonaute-Protein endonukleolytische Aktivität, kommt es aufgrund der nahezu perfekten Basenkomplementarität der RNA-RNA-Assoziation zur Spaltung der gebundenen *target*-RNA. Man spricht hierbei vom RNA-induzierten Repressorkomplex (engl.: *RNA-induced silencing complex*, kurz: RISC; Hammond *et al.*, 2000). Auch eine zelleigene Variante der siRNA, die sogenannte **endo-siRNA** (engl.: *endogenous siRNA*), ist an der Regulation der Genexpression beteiligt. Diese sowohl bei Pflanzen, Pilzen als auch Tieren vorkommende interferierende RNA dient im Gegensatz zur exogenen siRNA nicht der Virusabwehr. Bei Tieren, mit Ausnahme von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), konnten im Genom kodierte siRNAs jedoch lange Zeit nicht nachgewiesen werden (Ambros *et al.*, 2003; Ruby *et al.*, 2006; Okamura und Lai, 2008). Man nahm an, dass tierische siRNAs exogenen, beispielsweise viralen Ursprungs sind. Kürzlich konnten jedoch endogene RNAs mit gleichen Charakteristika wie siRNAs sowohl in *Drosophila melanogaster* als auch in murinen Oozyten nachgewiesen werden (Okamura *et al.*, 2008; Czech *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008;). Die genaue Funktion dieser endo-siRNA ist bislang noch nicht entschlüsselt.

Neben der siRNA bilden **piRNAs** eine wichtige Gruppe innerhalb der kleinen, nichtkodierenden RNAs. piRNAs sind 26 – 31 nt lang und einzelsträngig. Sie konnten bislang nur in tierischen Keimzellen, hauptsächlich männlichen, beobachtet werden und stellen in tierischen Zellen die größte Gruppe der nichtkodierenden, kleinen RNAs dar. Bei ihrer ersten Entdeckung in *Drosophila melanogaster* wurden sie als *repeat-associated small interfering RNAs*, kurz rasiRNAs, bezeichnet. Dies lag daran, dass piRNAs vorzugsweise in DNA-Abschnitten auftauchten, welche reich an sich wiederholenden Sequenzen waren. Außerdem lagen sie sehr oft zwischen Gensequenzen (Aravin *et al.*, 2001; Aravin *et al.*, 2003). Auffällig ist, dass piRNA-kodierende Genbereiche oft in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen. Es wird daher häufig von piRNA-*clustern* gesprochen (Aravin *et al.*, 2006; Brennecke *et al.*, 2007). Als Protein-Bindungspartner von piRNAs fungieren die PIWI-Proteine, welche eine Unterklasse der Argonaute-Proteinfamilie darstellen (Aravin *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2007; Brennecke *et al.*, 2007). Die aktuelle Bezeichnung piRNA resultiert

aus dieser Eigenschaft, „PIWI-Protein-interagierende RNA“, kurz piRNA. Anders als im Falle der siRNA ist für die Biogenese der piRNA das Ribonuklease (RNase)-III-Enzym Dicer nicht erforderlich (Vagin *et al.*, 2006; Houwing *et al.*, 2007; Murchison *et al.*, 2007). Es liegt die Vermutung nahe, dass die RNA-Prozessierung stattdessen durch PIWI-Proteine mit einer Endonukleaseaktivität erfolgt (Gunawardane *et al.*, 2007). piRNAs weisen eine strukturelle Eigenheit auf. So befindet sich eine Methoxygruppe am 2'-Kohlenstoffatom des endständigen 3'-Nukleotids (Kirino und Mourelatos, 2007; Saito *et al.*, 2007). Der Grund für diese Modifikation ist nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass dadurch die Stabilität der piRNA gesteigert und die piRNA vor unspezifischem Abbau geschützt wird (Faehnle *et al.*, 2007; Houwing *et al.*, 2007). Die Funktion der piRNAs besteht darin, Retrotransposons zu inaktivieren (Aravin *et al.*, 2007). Retrotransposons sind eine Klasse der transponierbaren DNA-Sequenzen. Sie tragen ihren Namen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Retroviren. Retrotransposons verwenden RNA als mobile Zwischenstufe. Ihre Mobilität kann zu Mutationen führen und damit die Integrität des Genoms gefährden. So führte die Abwesenheit von piRNAs in *Drosophila melanogaster* zu erhöhter Transposonaktivität (Brennecke *et al.*, 2007). Das Fehlen möglicher Proteinbindungspartner für die piRNA führte ebenso zu erhöhter Transposonaktivität (Sarot *et al.*, 2004; Carmell *et al.*, 2007).

Innerhalb der Gruppe der nichtkodierenden, kurzen RNAs sind neben siRNAs und piRNAs auch die **miRNAs** von Bedeutung. miRNAs wurden 1993 erstmals beschrieben (Lee *et al.*, 1993), der Name microRNA wurde jedoch erst 2001 geprägt (Ruvkun, 2001). Bei miRNAs handelt es sich um einzelsträngige, Genom-kodierte RNAs, die in Assoziation mit dem Argonaute-Protein die Genexpression bei Eukaryoten regulieren. MiRNAs sind 21 - 23 nt lang und ubiquitär exprimiert. Nach computerbasierten Vorhersagen könnten etwa 20 - 30 % der Gene im menschlichen Genom durch miRNAs reguliert sein (Lewis *et al.*, 2005). Sie tragen, genau wie die siRNA, eine 5'-Phosphat- sowie eine 3'-Hydroxylgruppe (Krol *et al.*, 2010). Die chemische Eigenschaften sowie der molekulare Aufbau der miRNAs sind dem der siRNA sehr ähnlich. Betrachtet man jedoch die Biogenese sowie die molekulare Wirkungsweise, lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. Die Biogenese der miRNA beginnt mit der Synthese des monocistronischen Primärtranskriptes (engl.: *primary transcript*, kurz: pri-miRNA) (Abb. 1). Drosha, neben Dicer ein weiteres RNase III-Enzym, prozessiert die pri-miRNA zu miRNA-Vorläufermolekülen (engl.: precursor-miRNA, kurz: pre-miRNA). Die pre-miRNA ist einzelsträngig, 70 – 80 Nukleotide lang und hat eine Haarnadelstruktur. Nach dem Transport der Nukleinsäure ins Zytoplasma erfolgt durch das Dicer-Protein ein weiterer Prozessierungsschritt (Kim *et al.*, 2009). Hierbei werden die pre-miRNAs in 17–24 nt lange doppelsträngige miRNAs geschnitten, welche aus der zukünftigen reifen miRNA und dem Gegenstrang miRNA* (engl.: „miRNA star“) bestehen. Der miRNA-Doppelstrang besitzt an den 3'-Enden und 5'-Phosphatgruppen je zwei ungepaarte Nukleotide (Hutvagner *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001). Bei siRNAs sind die Sequenzen beider Stränge perfekt komplementär. Dies ist im Falle von miRNA und miRNA* nicht zwangsläufig der Fall. Die miRNA-Duplex kann ungepaarte Stellen, sogenannte „bulges“, aufweisen. Nach der Trennung der beiden Stränge assembliert die miRNA mit dem Argonaute-Protein und bildet so einen microRibonukleoprotein-Partikel (miRNP) und später dann einen RISC-Komplex. Die gebundene miRNA bestimmt die *target*-RNA, wobei die 5'-terminalen Nukleotide 2 bis 8 der miRNA, die sog. „seed sequence“, besonders wichtig sind. Sie spielen bei der Identifizierung der miRNP-Bindungsstellen via komplementärer Basenpaarung eine entscheidende Rolle (Doench und Sharp, 2004; Brennecke *et al.*, 2005, Bartel, 2009). Die Nukleotide neben bzw. außerhalb dieser *seed sequence* haben für die miRNA-*target*-RNA-Interaktion keine entscheidende Bedeutung. Eine miRNA kann daher viele verschiedene *target*-RNAs haben bzw. kann eine *target*-RNA viele verschiedene

miRNAs beeinflussen (Krek *et al.*, 2005). Die Bindestelle für den miRNP befindet sich, bis auf wenige Ausnahmen, immer im terminalen Sequenzbereich der 3'-UTRs von *target*-RNAs (Rajewsky, 2006; Grimson *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008). Neueste Ergebnisse haben gezeigt, dass die *seed sequence* keine perfekte Komplementarität zur *target* RNA haben muss. Ebenso kann das 3'-Ende der miRNA bei der Interaktion mit der *target* RNA eine wichtige Rolle spielen (Helwak *et al.*, 2013). In der Zelle übernimmt die miRNA die wichtige Funktion der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression. Dafür stehen ihr zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder inhibiert sie die Translation des Transkriptes (in Abb. 1 nicht gezeigt) oder die *target*-RNA wird durch die Rekrutierung von RNA-abbauenden Enzymen destabilisiert (Fabian *et al.*, 2010). Während in Säugetierzellen lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass von diesen beiden Mechanismen die Translationshemmung dominiert, ergaben neuere Studien, dass die Degradation von Ziel-mRNA relativ gesehen für einen größeren Anteil der Inhibition der Proteinproduktion verantwortlich ist (Guo *et al.*, 2010). Besteht zwischen der miRNA und der *target*-RNA perfekte Basenpaarkomplementarität und das interagierende Argonaute-Protein besitzt enzymatische Aktivität, kommt es, wie bei der siRNA, zur Spaltung der *target*-RNA (Yekta *et al.*, 2004). Dieses Ereignis tritt jedoch relativ selten auf. Vor ein paar Jahren wurde außerdem über eine Aktivierung der Expression durch miRNPs berichtet (Vasudevan *et al.*, 2007; Vasudevan und Seitz, 2007), jedoch konnte diese Annahme vor kurzem entkräftet werden (Gokhale und Gadgil, 2012).

Ein weiterer Bestandteil der Gruppe der nichtkodierenden, kurzen RNA bilden die 1966 eher zufällig entdeckten kleinen, nukleären Ribonukleinsäuren (engl.: *small nuclear RNAs*, kurz: **snRNAs**). Wie der Name schon sagt, sind kleine, nukleäre RNAs im Nukleus eukaryotischer Zellen zu finden. Ihre Länge kann zwischen 100 – 300 Nukleotiden betragen, wobei der Großteil der snRNAs etwa 150 Nukleotide lang ist. Für die Transkription der snRNA ist entweder die RNA Polymerase II oder die RNA Polymerase III zuständig. Beide Polymerasen können diese Aufgabe übernehmen. In Abhängigkeit von ihrer Sequenz, sowie den mit ihr assoziierten Proteinen, kann die snRNA in zwei Klassen eingeteilt werden (Matera *et al.*, 2007). Bei den beiden Klassen handelt es sich um die gut untersuchte Klasse der Sm-snRNAs sowie die der LSm-snRNAs. Die Sm-snRNA wird von der RNA Polymerase II transkribiert. Sie durchläuft im Nukleus sowie im Zytosplasma mehrere Prozessierungsschritte, welche für die anschließende Assemblierung mit den Ribonukleoproteinen (RNP), sowie den Weg zurück in den Nukleus, äußerst wichtig sind. Wie der Name schon sagt, handelt es sich bei den RNPs im Falle der Sm-snRNA um Sm-Proteine. Innerhalb der Sm-snRNA unterscheidet man zwischen U1, U2, U4, U4atac, U5, U7, U11 und U12, wobei die U7 snRNA auch bei LSm-snRNAs gefunden werden kann. All diese snRNAs, mit Ausnahme von U7, bilden den Kern des Spliceosoms und sind somit für das Spleißen der mRNA mitverantwortlich (Grabowski *et al.*, 1985; Maniatis und Read, 1987; Guthrie und Patterson, 1988). Die Sm-snRNA U7 übernimmt hingegen bei der 3'-Prozessierung der Histon prä-mRNA eine wichtige Funktion (Mowry und Seitz, 1987). Wie bereits erwähnt bilden die LSm-snRNAs innerhalb der snRNAs die zweite Klasse. Die LSm-snRNAs werden von der RNA Polymerase III transkribiert und durchlaufen mehrere Prozessierungsschritte, wobei sie im Gegensatz zur Sm-snRNA dabei den Nukleus nicht verlassen. Innerhalb der Klasse der LSm-snRNAs wird zwischen U6 und U6atac unterschieden (Kiss, 2004). Die LSm-Proteine treten häufig als hexa- bzw. heptamerer Ring auf. Nach der Interaktion mit der snRNA bilden sie snRNA-LSm-Protein-Ringe welche als Chaperone für RNA-Oligonukleotide fungieren (Khusial *et al.*, 2005).

Die fünfte und letzte Teilgruppe der nichtkodierenden, kurzen RNAs bilden die kleinen nukleolären Ribonukleinsäuren (engl.: *small nucleolar RNAs*, kurz **snoRNAs**). Sie kommen in Eukaryoten und manchen Archaeen vor und haben eine Länge zwischen 60 – 300 Nukleotiden. snoRNAs fungieren als eine Art *guide RNA* indem sie Enzyme an die richtigen Stellen der chemisch zu modifizierenden RNA bringen. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um rRNA und snRNA. Bei den snoRNAs unterscheidet man zwischen zwei Klassen, den C/D box snoRNAs und den H/ACA box snoRNAs. Beide Klassen spielen bei der Prozessierung der ribosomalen RNA eine entscheidende Rolle. Nach der Transkription der prä-rRNA muss diese auf dem Weg zur fertigen rRNA eine Reihe von Prozessierungsschritten über sich ergehen lassen. Hierzu gehört die Methylierung und Pseudouridylation einzelner Nukleotide (Maden und Hughes, 1997). Für die Methylierung sind die C/D box snoRNAs sowie ihre assoziierten Proteine verantwortlich, welche die eigentliche Modifikationen durchführen (Samarsky *et al.*, 1998). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Fibrillarin, Nop56p, Nop58p und Snu13 (L7Ae in Archaeen) (Bachellerie *et al.*, 2002). Der aus diesen Proteinen und der C/D box snoRNA gebildete C/D box snoRibonukleoprotein-Komplex führt die 2' O-Methylierung der Ribosen durch. Die Pseudouridylation wird hingegen von den H/ACA box snoRNAs sowie ihrer gebundenen Proteine Dyskerin, Gar1p, Nhp2p sowie Nop10p ausgeführt (Bachellerie *et al.*, 2002). Sie bilden zusammen den H/ACA box snoRNP, welcher für die Konversion von Uridin zu Pseudouridin verantwortlich ist. Kürzlich wurden der snoRNA neben Methylierung und Pseudouridylation noch weitere Aufgaben zugewiesen. So fand man heraus, dass einige snoRNAs als miRNA fungieren können (Ender *et al.*, 2008; Babiarz *et al.*, 2008, Taft *et al.*, 2009). Außerdem nehmen snoRNAs eine wichtige Funktion bei der Organisation des Chromatins in *Drosophila melanogaster* ein (Schubert *et al.*, 2012).

Kurze, nicht-kodierende RNAs benötigen für die Ausführung ihrer Aufgaben sehr häufig ein Protein als Interaktionspartner. Wie bereits erwähnt stellt das **Argonaute-Protein** für viele der nichtkodierenden, kurzen RNAs den wichtigsten Interaktionspartner dar (Ma *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2005). Während die kurzen RNAs den Effektor-Komplex zur jeweiligen *target RNA* führen, bestimmt das Argonaute-Protein durch Rekrutierung weiterer Proteine das Schicksal der gebundenen *target RNA* (Chekulaeva und Filipowicz, 2009). Die Argonaute-Proteinfamilie erhielt ihren Namen 1998 von dem Blatt-Phänotyp einer *Arabidopsis*-Mutante, in welcher die entsprechenden Gene mutiert waren (Bohmert *et al.*, 1998). Die Blätter hatten starke Ähnlichkeit mit *Argonauta*, einem Vertreter der Kopffüßer (Cephalopoden). Die einzelnen Vertreter der Ago-Proteinfamilie sind evolutionär hoch konserviert (Carmell *et al.*, 2002). Nachdem Ago in *Arabidopsis* entdeckt wurde, konnte ähnliche Gensequenzen auch in anderen Organismen wie Bakterien (*Thermus thermophilus*) oder aber auch in Archaeen (*Pyrococcus furiosus*) gefunden werden. Die Tatsache, dass das Argonaute-Protein somit in allen Domänen des Lebens vorkommt, zeigt den hohen Konservierungsgrad dieser Proteinfamilie und die damit verbundene wichtige physiologische Rolle (Carmell *et al.*, 2002; Hutvagner und Simard, 2008; Höck und Meister, 2008). Ausnahme hierbei bildet *Saccharomyces cerevisiae*, da in seinem Genom keine Gensequenz gefunden werden konnte, welche für das Argonaute-Protein kodiert. Die artverwandte Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* hingegen besitzt einen Ago-Genabschnitt (Volpe *et al.*, 2002). Experimente in *Saccharomyces cerevisiae* haben jedoch gezeigt, dass durch rekombinante Expression von Dicer- und Argonaute-Genen anderer Hefespezies die bekannte RNA-Expressionsregulation rekonstruiert werden kann (Drinnenberg *et al.*, 2009). Zwar kommt das Argonaute-Protein in nahezu allen Organismen vor, jedoch kann die Anzahl der kodierenden Genabschnitte deutlich variieren. So wurden in *Caenorhabditis elegans* 27 Argonaute-ähnliche Gensequenzen gefunden (Yigit *et al.*, 2006), in *Arabidopsis thaliana* zehn (Hunter *et al.*, 2003), im Menschen (*Homo sapiens*) acht (Sasaki *et al.*,

2003) sowie in *Schizosaccharomyces pombe* nur einer (Carmell *et al.*, 2002). Trotz teilweiser hoher Kopienzahlen sind die verschiedenen Ago-Proteine nicht redundant und zeigen teilweise in ihrer enzymatischen Aktivität Unterschiede (Hutvagner und Simard, 2008). Außerdem binden sie jeweils gezielt unterschiedliche Klassen kleiner, nichtkodierender RNAs (Ghildiyal und Zamore, 2009) und besitzen zudem charakteristische Expressionsmuster (Deng und Lin, 2002).

Die Argonaute-Proteinfamilie lässt sich aufgrund von Übereinstimmungen in der Protein-Sequenz in drei Klassen einteilen. Zur ersten Klasse gehören die PIWI-Proteine, welche in Keimzellen exprimiert werden. Der Name PIWI steht für *P-element induced wimpy testis* (Lin und Spradling, 1997). Zur zweiten Klasse gehören die ubiquitär exprimierten Ago-Proteine. Die dritte und letzte Klasse bilden die Gruppe III-Agos, auch sekundäre AGOs (SAGOs) oder wurmspezifische AGOs (WAGOs) genannt (Yigit *et al.*, 2006; Faehnle und Joshua-Tor, 2007).

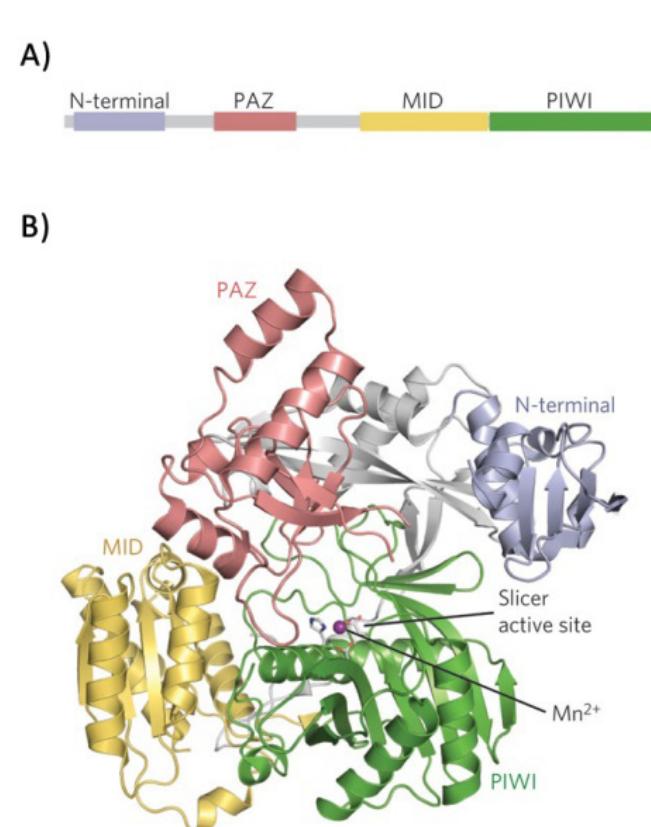


Abbildung 2 Schematische Darstellung und Kristallstruktur des Argonaute-Proteins. A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Ago-Proteinen mit den vier Bestandteilen: N-terminale Domäne (blaugrau), PAZ-Domäne (rot), MID-Domäne (gelb) sowie PIWI-Domäne (grün). Die linker-Bereiche verbinden den N-terminale-Domäne mit der PAZ-Domäne (Linkerregion 1) bzw. die MID- mit der PAZ-Domäne (Linkerregion 2) (grau). B) Kristallstruktur des Argonaute-Proteins aus *Pyrococcus furiosus* mit gebundenem Mn²⁺-Ion. Das Protein zeigt eine zweiflügelige Struktur, wobei N-terminale- und PAZ-Domäne einen Flügel, MID- und PIWI-Domäne den anderen Flügel bilden. Das Mn²⁺-Ion (violett) sitzt im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Aminosäurereste, welche für die Bindung des Metallions verantwortlich sind, werden in stick-Form dargestellt. Die Linker-Regionen werden als graue Bereiche abgebildet. (Jinek und Doudna, 2009).

Im Folgenden wird auf die einzelnen Faltungseinheiten eingegangen. Den Anfang macht die **N-terminale Domäne**, auch N-Domäne genannt. Diese besitzt einen N-terminalen *coil* (deutsch: Windung) welcher über die Linkerregion 1 mit der PAZ-Domäne verbunden ist. Es wird angenommen, dass die N-terminale Domäne die Trennung der *guide* RNA-target RNA-Duplex nach dem Schneideereignis fördert (Wang *et al.*, 2008 a, 2009 b; Parker, 2010). Neueste Ergebnisse lassen

Argonaute-Proteine sind basische Proteine mit einem Molekulargewicht von durchschnittlich 100 kDa. Sie besitzen zwei charakteristische Domänen: die PIWI/Argonaute/Zwille- (kurz PAZ-) sowie die *P-element induced wimpy testis*- (kurz PIWI-) Domäne. Neben diesen beiden Domänen gibt es mit der N-terminalen Domäne, sowie der MID-Domäne, noch zwei weitere Faltungseinheiten (Abb. 2).

jedoch vermuten, dass die N-Domäne in Verbindung mit der PAZ-Domäne für den Schutz des 3'-Endes der *guide* RNA verantwortlich ist (Hur *et al.*, 2013). Außerdem können Bereiche der N-terminalen Domäne die Nuklease-Aktivität der Piwi-Domäne beeinflussen (Hauptmann *et al.*, 2013).

Wie bereits erwähnt ist die N-terminale Domäne ist über die Linkerregion 1 mit der **PAZ-Domäne** verbunden. Die PAZ-Domäne stellt für das Argonaute-Protein eine charakteristische Domäne dar und besitzt eine Länge von etwa 130 Aminosäuren. Neben dem Ago-Protein findet man die PAZ-Domäne auch noch in dem RNase-III-Enzym Dicer. Sie beinhaltet eine Bindungstasche für das 3'-Ende der kleinen RNA. Die Bindung basiert hierbei auf den zahlreichen Interaktionen verschiedener Aminosäureseitenketten mit dem Ribose-Phosphatrückrat der gebundenen RNA (Lingel *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2005). Die Bindung des 3'-Endes ist daher vorwiegend basensequenzunabhängig. Genauer geht es jedoch bei der Identifikation der beiden ungepaarten 3'-Nukleotiden einer miRNA-Duplex zu. Diese beiden Nukleotide werden mit hoher Sorgfalt ausgewählt und erkannt (Ma *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004).

Linkerregion 2 verbindet die PAZ-Domäne mit der **MID-Domäne**. Die MID-Domäne beinhaltet die Bindetasche für das 5'-Ende der kleinen RNA. Während bei der Bindung in der PAZ-Bindetasche viele Interaktionen zwischen Aminosäurekette und Ribose-Phosphatrückrat stattfinden, ist die Bindung in der MID-Bindetasche spezieller und definierter. Mutagenesestudien sowie Kristallstrukturen (Parker *et al.*, 2005; Boland *et al.*, 2010) haben gezeigt, dass beim PIWI-Protein aus *Archaeoglobus fulgidus* die Tyrosinseitenkette Tyr123 (bzw. Y123) und beim humanen AGO2 Protein die Seitenkette von Y529 eine entscheidende Rolle spielen (Hall, 2005). Hydroxylgruppe dieses Aminosäurerestes bildet mit der 5'-Phosphorylgruppe der RNA eine Wasserstoffbrücke. Außerdem treten die π -Elektronen des aromatischen Ringsystems vom Tyrosinrest und der Base des ersten 5'-Ribonukleotids in Wechselwirkung. Die Wasserstoffbrücke ermöglicht also die Erkennung des miRNA-charakteristischen 5'-Phosphatrestes, die Wechselwirkung der Elektronen dient der sequenzunabhängigen Fixierung der kleinen RNA (Hall, 2005).

Die vierte und größte Domäne des Ago-Proteins bildet die **PIWI-Domäne**. Kristallstrukturuntersuchungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass eine Ähnlichkeit zu RNase H-Enzymen besteht (Song *et al.*, 2004). Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von RNA in RNA-DNA-Hybridren Champoux und Schultz, 2009). Untersuchungen in *Aquifex aeolicus* und *Archaeoglobus fulgidus* unterstützen die Theorie, dass diese Domäne eine hohe Affinität für kleine DNAs besitzt (Ma *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005). In höher entwickelten Spezies zeigte sich jedoch recht schnell, dass das Ago-Protein seine enzymatische Wirkung lediglich bei RNA-Duplices erreicht (Meister *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2006). Im menschlichen Ago-Protein Ago2 sind vier Aminosäureseitenketten für die Hydrolyse der RNA von besonderer Bedeutung: Asparaginsäurerest-597 (D597), Glutamatsäurerest-637 (E637), Asparaginsäurerest-669 (D669), sowie Histidinrest-807 (H807) (Rivas *et al.*, 2005, Nakanishi *et al.*, 2012). Aufgrund der Zusammensetzung werden diese vier Aminosäuren als DEDH-Tetraden bezeichnet. Das Vorhandensein dieser Tetraden ist jedoch kein eindeutiger Hinweis auf eine katalytische Spaltung der RNA. Das humane Ago3 Protein zum Beispiel besitzt diese Tetraden, hydrolysiert gebundene *target* RNA aber nicht (Meister *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Die Aktivität von Ago3 kann jedoch durch Sequenzveränderungen in der N-Domäne wieder hergestellt werden. Im C-terminalen Bereich der PIWI-Domäne liegt die PIWI-Box, welche für die Interaktion mit dem RNase-III-Enzym Dicer zuständig ist (Wang *et al.*, 2009 a). Sie ist ca. 40 Aminosäuren lang und evolutionär hoch konserviert (Cox *et al.*, 1998). Aufgrund der Ähnlichkeit zu Dicer werden RNA-spaltende Ago-Proteine auch als *slicer* bezeichnet (Lingel und Sattler, 2005).

Ein aus Argonaute-Protein und miRNA assemblierter Komplex wird, wie bereits erwähnt, microRibonukleoprotein-Partikel (kurz miRNP) genannt. Damit dieser miRNP seine enzymatische Aktivität entfalten kann, muss er mit weiteren Proteinen interagieren. Eine entscheidende Rolle hierbei spielen die Proteine der **GW182-Proteinfamilie**. Sie konnten bisher in mehreren verschiedenen Organismen identifiziert werden und funktionale Studien haben gezeigt, dass GW182 Proteine auch mechanisch an der Expressionsregulation durch kleine RNAs beteiligt sind (Ding *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2005; Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006 a, b; Eulalio *et al.*, 2008; Landthaler *et al.*, 2008; Chekulaeva *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009 a, b; Lazzaretti *et al.*, 2009; Miyoshi *et al.*, 2009; Takimoto *et al.*, 2009; Zipprich *et al.*, 2009; Pfaff *et al.*, 2013). Die Anzahl an GW182 Vertretern kann von Organismus zu Organismus variieren. In *Drosophila* existiert beispielsweise nur ein GW182 Protein, bei Säugerzellen hingegen sind drei Homologe vorhanden. Die Proteine dieser Familie haben ein Molekulargewicht von etwa 180 kD und verfügen über 12 (*Drosophila*) bzw. 21 – 33 (*Homo sapiens*) Glycin-Tryptophan-(GW/WG-) Sequenzwiederholungen am N-Terminus (Eulalio *et al.*, 2009 c). Über diesen speziell ausgestatteten N-Terminus erfolgt letztendlich die RNA-unabhängige Interaktion mit dem Ago-Protein (Eulalio *et al.*, 2009 b). Ein GW182 Protein kann im Organismus mit mehreren Ago-Komplexen zugleich assoziieren (Takimoto *et al.*, 2009). Außerdem interagieren ausschließlich solche Ago-Proteine mit GW182 Proteinen, welche in der miRNA-vermittelten, posttranskriptionellen Genexpressionsregulation involviert sind (Eulalio *et al.*, 2009 c).

Die posttranskriptionelle Genexpressionsregulation kann jedoch auch noch durch andere RNA-bindende Proteine unterstützt werden. Zu ihnen zählen die vorher bereits erwähnten Mitglieder der **Sm- und Sm-like** Proteinfamilie, deren bakterieller Vertreter **Hfq** genannt wird. Diese Proteine können die Interaktion zweier RNA-Moleküle erleichtern und inhibitorische Sekundärstrukturen auflösen. Man nennt sie dadurch auch RNA-Chaperone. Das bakterielle Hfq Protein wurde 1968 in *E. coli* als wichtiger Faktor für die Replikation des Bakteriophagen Q_β identifiziert und erhielt so seinen Namen (engl.: *host factor Q*) (Eikhom *et al.*, 1968; Franze de Fernandez *et al.*, 1968; Franze de Fernandez *et al.*, 1972; Shapiro *et al.*, 1968). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses konservierte Protein mit einer Molekulmasse von 12,5 kDa charakterisiert, welches in der aktiven Form als Hexamer vorlag. Erst 1993 wurde herausgefunden, dass das Hfq Protein bei Konformationsänderungen der Q_β RNA eine entscheidende Rolle spielt und so die Replikationsinitiation stimuliert (Barrera *et al.*, 1993). Kurze Zeit später wurde gezeigt, dass Hfq mehrheitlich mit Ribosomen assoziiert vorliegt und die Anwesenheit von Hfq in der Zelle von der Wachstumsphase abhängt (Kajitani *et al.*, 1994). Dies waren Hinweise auf eine wichtige Funktion innerhalb nicht-infizierten Zellen von *E. coli*. Untersuchungen des Phänotyps der ersten hfq-Insertionsmutante von *E. coli* hatten schwerwiegende pleiotrope Effekte auf die Physiologie der Zelle sowie die Sensitivität gegenüber Stressbedingungen (Tsui *et al.*, 1994). Später zeigte sich der Einfluss von Hfq auf die Glykogensynthese, den Nährstoffmangel und weitere Stressbedingungen (Hitzestress, H₂O₂) (Muffler *et al.*, 1997). Mittlerweile ist bekannt, dass Hfq die Translation der beiden wichtigen Stresstranskriptionsfaktoren σS (RpoS) und σE (RpoE) reguliert (Guisbert *et al.*, 2007). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einiger sRNAs (z.B. MicX) in *Vibrio cholerae* (Davis *et al.*, 2007).

Wie bereits erwähnt gehören die bakteriellen Hfq-Proteine zu der phylogenetisch konservierten Familie der **Sm- und Sm-like (LSm)-Proteine**. Diese Proteinfamilie kommt in allen drei Domänen des Lebens vor (Scofield und Lynch, 2008) und spielt bei zahlreichen Vorgängen des RNA-Metabolismus eine entscheidende Rolle (z.B. RNA-Prozessierung, prä-mRNA-Spleißen, mRNA-Degradation) (Key *et al.*, 1998; He und Parker, 2000; Tharun *et al.*, 2000). Das erste Sm-Protein wurde 1966 bei einer Patientin namens Stephanie Smith gefunden. Diese war an Lupus erythematoses, einer Autoimmunkrankheit, erkrankt. Das körpereigene Immunsystem war fehlreguliert und produzierte Antikörper gegen nukleare Proteine, in diesem Fall gegen das eigene Sm-Protein. Die Antikörper nannte man Sm-Ag (engl.: *smith antigen*) und so entstand der Name für diese Proteine (Tan und Kunkel, 1966; Lerner und Seitz 1979). Die eukaryotischen Vertreter der Sm- und LSm-Proteinfamilie zeigen eine charakteristische Assemblierung zu ringförmigen Oligomeren. Diese Ringstrukturen binden spezifisch an einzelsträngige, Uridinreiche Sequenzmotive definierter RNA-Moleküle. Man unterscheidet zwischen sieben individuellen Sm-Proteinen (SmB/B', D1, D2, D3, E, F, G) mit Molekulargewichten von 9 bis 29 kDa (Lehmeier *et al.*, 1990). Diese bilden ein Hetero-Heptamer und assemblieren zusammen mit unterschiedlichen snRNAs zu small nuclear Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNP), welcher wiederum die Untereinheiten des Spleißosoms formen (Will und Lührmann, 2001; Beggs, 2005). Im Falle der eukaryotischen LSm-Proteine unterscheidet man zwischen 16 verschiedenen Varianten (LSm1 – 16). Sie assemblieren nicht wie das Sm-Protein ausschließlich zu Hetero-Heptameren, sondern können auch Hetero-Hexamere Strukturen einnehmen (Achsel *et al.*, 1999; Beggs, 2005). Es ist sogar möglich, dass wie in *Archaeoglobus fulgidus* zwei Sm-Proteine in einem Organismus vorkommen, welche beide oligomere Strukturen repräsentieren (Abb. 3 B).

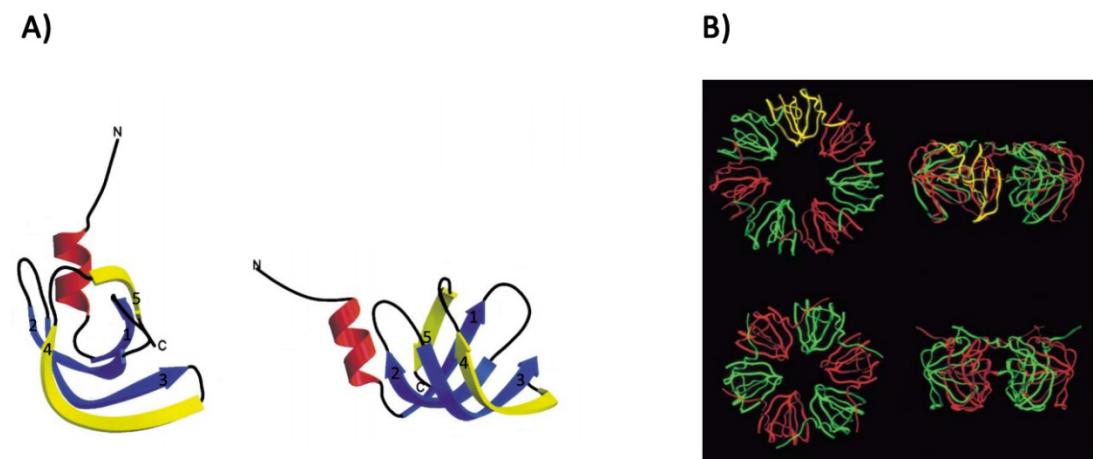


Abbildung 3 Verschiedene Darstellungsmöglichkeiten des Sm-Proteins. A) Sekundärstruktur des Sm-Proteins aus *Archaeoglobus fulgidus* dargestellt in zwei Orientierungen. Die N-terminale Helix ist rot eingefärbt, die Faltblätter β 1-3 in blau sowie β 4 und β 5 in gelb. Die Faltblätter β 1-5 sind mit 1-5 entsprechend nummeriert. B) Ribbondarstellung des Sm-Heptamer- (oben) sowie Sm-Hexamer- (unten) Komplexes aus *Archaeoglobus fulgidus*. Die oligomeren Komplexe sind von oben (links) und seitlich (rechts) dargestellt. Die Sm-Monomere sind abwechselnd grün bzw. rot dargestellt sowie ein monomeres Protein in gelb. (Törö *et al.*, 2002; leicht abgeändert).

Die Mitglieder der Sm- und LSm-Protein-Familie sind durch das evolutionär hoch konservierte Sm-Faltungsmotiv gekennzeichnet. Dieses setzt sich je nach Aminosäuresequenz aus den Abschnitten Sm1 (32 Aminosäuren) und Sm2 (14 Aminosäuren) zusammen, welche mittels einer variablen Region miteinander verbunden sind (Hermann *et al.*, 1995; Séraphin, 1995). Das Faltungsmotiv bildet eine Struktur, welche sich aus fünf anti-parallelen β -Faltblättern (β 1-5) und einer α -Helix (α 1) zusammensetzt (Abb. 3 A). Zum Sm1-Abschnitt des Faltungsmotivs gehört die Helix α 1 sowie die

Faltblätter β 1-3, zum Sm2-Bereich die Faltblätter β 4 und β 5. Die entgegen gesetzt gelegenen Stränge β 4 und β 5 sind schleifenartig miteinander verbunden und so bildet das Protein Monomer eine charakteristische β -barrel-Struktur. Das Protein nimmt dadurch, wie der Name schon sagt, eine Art Fassform ein. Außerdem interagieren die Stränge β 4 und β 5 benachbarter Monomere via Wasserstoffbrücken miteinander und sind daher an den Kontakten der einzelnen Monomeren miteinander verantwortlich. Sie bilden die Basis für die charakteristischen ringförmigen oligomeren Strukturen der Sm- und LSm-Proteinfamilie (Hermann *et al.*, 1995; Kambach *et al.*, 1999; Khusial *et al.*, 2005). Für die Interaktion mit den RNA-Molekülen sind die Schleifen zwischen den Strängen β 2 und β 3 sowie β 4 und β 5 verantwortlich. Sie ragen in die Pore der Ringstruktur hinein und interagieren dort mit RNA-Molekülen. Neben der barrel-Struktur verfügt das Protein Monomer über keine weiteren funktionellen oder strukturellen Domänen. Seltener beschriebene größere Varianten der LSm-Proteine (LSm12-16) besitzen längere Fortsätze am C-Terminus. Diese sind zusätzlich mit einer Methyltransferase-Domäne ausgestattet (Albrecht und Lengauer, 2004).

Dank ihrer Nähe zum Ursprung des Lebens bilden die Mitglieder der Domäne der **Archaeen** ein wichtiges Forschungsobjekt. Außerdem liegen viele Proteine und enzymatische Abläufe in diesen „alten“ Organismen in möglichst einfacher, ursprünglicher Form vor und tragen somit zum Verständnis komplexer Abläufe in höher entwickelten Organismen bei. Rückschlüsse auf entsprechende Proteine in höher entwickelten Lebensformen sind somit einfacher nachzuvollziehen. Viele kultivierte Arten der Archaeen sind an extreme Milieubedingungen angepasst. So konnten einerseits Mikroorganismen aus kalten Regionen wie der Arktis und Antarktis isoliert werden. Diese psychrophilen Organismen zeigen auch bei Temperaturen um den Gefrierpunkt (Delong *et al.*, 1994; Massana *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1998) noch Wachstum. Andererseits wurden thermophile Mikroorganismen z. B. aus den Schloten der schwarzen Raucher der Tiefsee isoliert (Jones *et al.*, 1983; Huber *et al.*, 1998; Burggraf *et al.*, 1990). Einer dieser hyperthermophilen Mikroorganismen ist der Euryarchaeot **Pyrococcus furiosus** (*P. furiosus*) aus der Ordnung der *Thermococcales*. Dieser kugelförmige Organismus mit einem Durchmesser von 0,8 bis 2,5 5 μm wurde zum ersten Mal aus dem geothermal erhitzten Sediment am Strand von Porto di Levante, auf Vulkano in Italien, isoliert. Er wächst bei Temperaturen zwischen 70°C und 103°C und erreicht bei seiner optimalen Wachstumstemperatur von 100°C eine Verdoppelungszeit von 37 Minuten. *P. furiosus* besitzt einen Vertreter der vorher bereits erwähnten **LSm**-Proteinfamilie. In Archaeen wurden Proteine dieser Familie erstmals 1999 gefunden (Mayes *et al.*, 1999; Salgado-Garrido *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2001). Einige Archaeen, darunter die halophilen Archaeen sowie Vertreter der *Pyrococcus* Spezies, besitzen nur ein Sm-like Protein (LSm1), wohingegen andere zwei Versionen des Proteins besitzen (LSm1 und LSm2) (Salgado-Garrido *et al.*, 1999). *Crenarchaeota* bilden eine Ausnahme, denn sie verfügen über ein zusätzliches LSm-Protein, LSm3 (Mura *et al.*, 2003; Khusial *et al.*, 2005). Es ist aufgrund der Kristallstruktur bekannt, dass das archaeelle LSm1-Protein Heptamere bildet (Achsel *et al.*, 2001; Mura *et al.*, 2001; Törö *et al.*, 2001) und RNA binden kann (Achsel *et al.*, 2001; Thore *et al.*, 2003; Törö *et al.*, 2001). Durch spezielle massenspektrometrische Methoden (LILBID = *Laser-induced Liquid Bead Ion Desorption-MS*) konnte der heptamere Komplex des LSm1-Proteins am Beispiel *Haloferax volcanii* bestätigt werden (Fischer *et al.*, 2010). Das LSm2-Protein aus *Archaeoglobus fulgidus* ist in der Lage, einen hexameren (Törö *et al.*, 2002) oder heptameren (Achsel *et al.*, 2001) Komplex zu formen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das LSm3-Protein der *Crenarchaeota* in Komplexe aus 14 monomeren Proteinen bilden kann (Mura *et al.*, 2003 b). Auch einige der LSm1-Proteine sind dazu in der Lage (Mura *et al.*, 2003 a). Über die Funktion der Sm- und LSm-Proteinfamilie ist jedoch wenig bekannt. Neue *in vitro* Ergebnisse haben gezeigt, dass das LSm-

Protein aus *Haloferax volcanii* tRNAs und sRNAs bindet. Außerdem konnten durch Co-Immunpräzipitationsversuche Interaktionspartner des LSm-Proteins identifiziert werden (Fischer *et al.*, 2010). Die genaue Funktion der Sm- bzw. LSm-Proteinfamilie ist in *Archaeen* jedoch noch unbekannt.

Neben den LSm-Proteinen kann man in der Domäne der *Archaea* auch Vertreter der **Argonaute**-Proteinfamilie finden. Soweit bisher bekannt, spielen sie nicht wie in Eukaryoten eine Rolle bei der RNA-Interferenz, da diese in Prokaryoten bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Cerutti und Mollano, 2006). Ein der RNAi der Eukaryoten jedoch weitgehend ähnlicher Prozess ist der CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Mechanismus. Er dient zur Verteidigung gegen das Eindringen fremden Erbguts durch z.B. Viren (Jansen *et al.*, 2002; Bolotin *et al.*, 2005; Barrango *et al.*, 2007). Mit Hilfe von kristallographischen Untersuchungen des archaeellen Ago-Proteins aus *P. furiosus* konnte die PAZ Domäne sowie ihre Bindetasche entschlüsselt werden (Song *et al.*, 2004; Jinek und Doudna, 2009). Nicht alle prokaryotischen Ago-Proteine besitzen wie ihr eukaryotisches Pendant eine PAZ Domäne. Nahezu alle prokaryotischen Agos, welchen die PAZ Domäne fehlt, scheinen keine Nukleaseaktivität zu besitzen. Ist diese Domäne jedoch vorhanden, zeigt das Argonaute-Protein das enzymatische Verhalten einer Nuklease (Makarova *et al.*, 2009). Das Ago-Protein aus *P. furiosus* besitzt die PAZ Domäne. *In vitro* Untersuchungen des bakteriellen Argonaute-Proteins aus *Aquifex aeolicus* und *Thermus thermophilus* zeigten eine RNase H ähnliche Ribonukleaseaktivität, indem sie die RNA in einer DNA/RNA-Duplex durchtrennten (Yuan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008 a). Neueste Kristallstrukturuntersuchungen am bakteriellen Ago-Protein aus *Thermus thermophilus* gaben eine detaillierte Einsicht in die Schneideaktivität des Proteins bei Zugabe einer *guide* DNA und entsprechendem DNA *target* (Sheng *et al.*, 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das bakterielle Argonaute-Protein aus *Rhodobacter sphaeroides* sowohl kurze DNA, als auch kurze RNA binden kann und möglicherweise bei der Erkennung und Beseitigung fremder Nukleinsäuren eine Rolle spielt (Olovnikov *et al.*, 2013). Im Falle des Ago-Proteins aus *Thermus thermophilus* wurde mittels *in vivo*-Daten bestätigt, dass es bei der Abwehr fremder DNA eine entscheidende Rolle spielt (Swarts *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde der oligomere Komplex des LSm-Proteins aus *P. furiosus* untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob dieses archaeelle LSm-Protein eine hexamere oder heptamere Struktur einnimmt oder sich sogar zu einem großen Komplex aus 14 Proteinmonomeren zusammenfügt. Ein weiteres Ziel war die Klonierung des Argonaute-Proteins aus *P. furiosus* in einen Expressionsvektor und dessen anschließende Aufreinigung in *E. coli*. Das aufgereinigte Protein sollte zur Bildung von Antikörpern genutzt und die dadurch erhaltenen Immunglobuline für Co-Immunpräzipitationsuntersuchungen eingesetzt werden. Die dadurch präzipitierten Nukleinsäuren sollten kloniert und schließlich sequenziert werden um Hinweise auf eine mögliche Funktion des Argonaute-Proteins in Archaeen zu erhalten. Da für *P. furiosus* mittlerweile ein genetisches System etabliert wurde, war die Expression des Proteins in *Pyrococcus* sowie dessen knock-out ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Außerdem sollten durch Saccharosedichthegradienten und massenspektroskopische Untersuchungen mögliche Interaktionspartner des Argonaute-Proteins identifiziert werden.

II. Material und Methoden

1. Bezugsquelle von Substanzen

1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Substanz	Hersteller
Acetonitril	J. T. Baker, Deventer (NL)
Acrylamid 2x, research grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Acrylamid 4x, analytic grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Quality	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumoersulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bacto TM Agar	Difco Laboratories Inc., Detroit (USA)
Bacto TM Hefeextrakt	Difco Laboratories Inc., Detroit (USA)
Bacto TM Trypton	Difco Laboratories Inc., Detroit (USA)
Borsäure	Merck, Darmstadt
BSA	Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe
Complete Mini TM Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA-frei	Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe
Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	J. T. Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt
Gelrite	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerin, 100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
HEPES	Merck, Darmstadt
Imidazol, ACS Reagenz 99%	Sigma Aldrich GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	J. T. Baker, Deventer (NL)
Isotop [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP]	Hartmann Analytic, Braunschweig
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosyl	Fluka, Seelze
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid, 2x	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RNaseZap	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (37%)	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	USB, Cleveland (USA)
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe

1.2. Biochemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (<i>CIP</i>)	New England Biolabs, Frankfurt
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Proteinase K	Fermentas, Burlington (USA)
RNase A	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
RNase H	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific Fisher GmbH, Dreieich
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
T4 RNA Ligase 1	New England Biolabs, Frankfurt
T7 DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt

1.3. Molekularmassenstandard

Massenstandards	Hersteller
DNA PAGE Ruler Ultra Low Range	Fermentas, Burlington (USA)
PageRuler Unstained Protein Ladder (SM0661)	Fermentas, Burlington (USA)
PageRuler Prestained Protein Ladder (SM0671)	Fermentas, Burlington (USA)
GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific Fisher GmbH, Dreieich
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific Fisher GmbH, Dreieich
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Thermo Scientific Fisher GmbH, Dreieich
Molecular Weight Marker Kit for Gel Filtration Chromatography (29-700 kDa)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen

1.4. Kits, Membranen und Filtreinheiten

Artikel	Hersteller
Corning® Costar® Spin-X® Plastic Centrifuge Tube Filters	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Micro Bio-Spin Chromatography Columns	Bio-Rad, Hercules (USA)
Immunoprecipitation Kit – Dynabeads Protein G	Invitrogen, Darmstadt
Immobilion™-P Transfermembran	Millipore, Bedford (USA)
Nylon membranes, positively charged	Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe
Protran™ Nitrocellulose Membran	Whatman, Dassel
Membranfilter (Cellulosemischester)	Whatman, Dassel
Sequagel UreaGel System	National Diagnostics, Atlanta (USA)
SuperScriptIII Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen, Darmstadt
Vivaspin™ (Polyethersulfan)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

1.5. Antikörper

1.5.1. Polyklonale Primärantikörper (1° AK)

Antikörper	Ursprung des Antigens	Antigen produziert in	Hersteller
rabbit anti-Ago	<i>P. furiosus</i>	rekombinant in <i>E.coli</i>	Davids, Regensburg

Für die Generierung des anti-Ago-Antikörpers wurde das Gen PF0537 in *E.coli* kloniert und exprimiert. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend einem Kaninchen injiziert.

1.5.2. Sekundärantikörper (2° AK)

Antikörper	Hersteller
Dylight 649 goat anti-rabbit IgG	Thermo Scientific Fisher GmbH, Dreieich
goat anti-rabbit IgG + HR Peroxidase	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen

2. Kulturmedien

2.1. ½ SME-Medium

2.1.1. Zusammensetzung

SME-Medium	½ SME-Medium
NaCl	474 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	28,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	27,1 mM
KCl	8,1 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5,1 mM
NaBr	0,97 mM
Borsäure	0,49 mM
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,056 mM
KJ-Lsg. 0,05%	0,3 µM

Wolfes Mineralien, 10 x, pH 1,0, ohne Titriplex

NaCl	171,10 mM
MgSO ₄	121,70 mM
MnSO ₄	29,60 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 5 H ₂ O	7,09 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	6,80 mM
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	6,40 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	6,30 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3,60 mM
Borsäure	1,63 mM
Na ₂ SeO ₄	0,53 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,41 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,40 mM
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,38 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,30 mM
pH 1,0	

2.1.2. Herstellung und Sterilisation

Die Bestandteile des Mediums wurden frisch eingewogen und in eine 1 l Duranglasflasche (Schott, Mainz) abgefüllt. Die Flaschen wurden mit einem Gummistopfen und einer durchbohrten Schraubkappe versehen. Um den Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen wurde das Medium 30 min unter Druckausgleich mit N₂/CO₂ (80:20, v/v) durchgast. Durch Zugabe von Na₂S bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin, wurde der noch im Medium verbliebene Sauerstoff entfernt.

Die Medien wurden in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, USA) abgefüllt. Dabei wurde je 20 ml des Mediums in 120 ml Serumflaschen (Natronkalksilikatglas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) überführt. Die Serumflaschen wurden mit Butylsepten (Ochs, Bovenden) verschlossen. Eine Sicherung der Flaschen wurde durch Aluminiumbördelkappen (WICOM, Heppenheim) gewährleistet. Anschließend wurden die Serumflaschen an der Gasstation je dreimal evakuiert und H₂/CO₂ (80:20, v/v) mit 300 kPa aufgepresst.

Die Bestandteile der Wolfes Mineralienlösung werden eingewogen und in H₂O_{Millipore} gelöst. Der pH-Wert wird auf 1,0 eingestellt. Die Lösung wird anschließend steril filtriert (Porengröße 0,2 µm und bei 4 °C dunkel gelagert.

2.2. Standard Kulturmedium *Pyrococcus furiosus*

2.2.1. Zusammensetzung

Standard-Kulturmedium für <i>P. furiosus</i>		Standard-Gelriteplatten für <i>P. furiosus</i>	
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)	Gelrite	1,5 % (w/v)
Pepton	0,1 % (w/v)	Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
Stärke	0,1 % (w/v)	Pepton	0,1 % (w/v)
½ SME, pH 7,0		Stärke	0,1 % (w/v)
		Na ₂ S x 3 H ₂ O	0,2 g
		½ SME ohne Resazurin, pH 7,0	

2.2.2. Herstellung und Sterilisation

Bei der Herstellung des Standard-Kulturmediums für *P. furiosus* wurden alle Bestandteile eingewogen und in ½ SME gelöst. Je 20 ml des Mediums wurden in 120 ml Serumflaschen (Natronkalksilikatglas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) überführt. Nach begasen mit N₂ (dreifacher Gasaustausch) wurde der Stickstoffdruck auf 0,8 bar eingestellt.

Bei der Herstellung der Standard-Gelriteplatten wurde ähnlich verfahren. Alle Komponenten, außer Na₂S x 3 H₂O, wurden gelöst, in eine Druckflasche umgefüllt und mit N₂ durchgast. Die Dauer der Begasung hing dabei vom Volumen der Medium-Lösung ab und lag zwischen 15 Minuten (250 ml Medium) und 45 Minuten (2 Liter Medium). Nach der Begasung erfolgte die Reduktion des noch vorhandenen Sauerstoffs durch die Zugabe von Na₂S x 3 H₂O. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und bei 95 °C aus dem sich abkühlenden Autoklaven entnommen. Nach vorsichtigem Entgasen wurde die Druckflasche in die

Anaerobenkammer eingeführt. Das Medium wurde auf die vorbereiteten Petrischalen verteilt (25 – 30 ml pro Schale).

2.2.3. Herstellung und Sterilisation für Großanzuchten im Fermenter

Die Salze des Mediums wurden eingewogen, im Fermenter (HTE, Bioengineering, Wald, CH) in der entsprechenden Menge $H_2O_{Millipore}$ gelöst und das Medium anschließend mit N_2/CO_2 (80:20 v/v) durchgast. Abschließend wurde das Medium im Fermenter für 40 min autoklaviert. Wie unter 2.2.1. beschrieben, werden noch weitere Zusätze wie Hefeextrakt, Pepton und Stärke benötigt. Na_2S wurde ebenso wie 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Pepton sowie 0,1 % Stärke gesondert in $H_2O_{Millipore}$ gelöst und für 20 min autoklaviert. Vor dem Animpfen wurde Na_2S , Hefeextrakt, Pepton und Stärke in den Fermenter gegeben sowie der pH-Wert mit steriler N_2SO_4 eingestellt.

2.3. LB-Medium und SOC-Medium für E.coli

2.3.1. Zusammensetzung

LB-Medium		LB-Agar-Medium	
Trypton	1 % (w/v)	Agar	1,8 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Trypton	1 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
pH 7,5		NaCl	0,5 % (w/v)
		pH 7,5	

SOC-Medium	
Trypton	2 % (w/v)
KCl	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
pH 7,0	

2.3.2. Herstellung und Sterilisation

Bei der Herstellung des LB- bzw. des SOC-Mediums wurden alle Bestandteile in $H_2O_{Millipore}$ gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mittels NaOH auf pH 7,5 (LB-Medium) bzw. 7,0 (SOC-Medium) eingestellt. Die Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Im Falle der LB-Agar-Medien wurde zusätzlich zu den Bestandteilen des LB-Mediums noch Agar eingewogen. Nach dem Einstellen des pH-Wertes durch NaOH wurde die Lösung autoklaviert und bei 60 °C aus dem sich abkühlenden Autoklaven genommen. Das Medium wurde auf die vorbereiteten Petrischalen verteilt (25 – 30 ml pro Schale).

3. Verwendete Organismen, Kultivierung und Transformation

3.1. Verwendete Organismen

Artnamen	Stamm
<i>Escherichia coli</i>	DH5- α
<i>Escherichia coli</i>	BL 21 Star TM
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Vc1 (DSM 3638)

3.2. Kultivierung von *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte, falls nicht anders beschrieben, bei 37°C in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Platten. Nach Transformation der Zellen wurde das Medium mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion von Transformanten versetzt.

3.3. Transformation in *E.coli*

Zur Transformation von Plasmiden wurden kompetente DH5- α - oder BL 21 StarTM-Zellen verwendet. Durch Inkubation bei 20 °C statt bei 37 °C wurde die Kompetenz zur Aufnahme von DNA erheblich erhöht. Beide Stämme standen am Lehrstuhl zur Verfügung.

Zur Transformation wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut und zu je 50 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäß aufgeteilt. Anschließend wurden 1-3 µl Ligationsansatz zugegeben. Als Negativkontrolle fungierte ein Ligationsansatz ohne Insert, als Positivkontrolle 1 ng pUC19 DNA. Die Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C. Die Zellen wurden dann erneut zwei Minuten ins Eis gestellt. Danach wurden die Ansätze mit jeweils 800 µl SOC-Medium vermengt und 1h bei 37 °C ständig schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 2000rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 100 µl frisches SOC-Medium aufgenommen, resuspendiert und auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Es folgten 15 h Inkubation bei 37 °C.

3.4. Blau-Weiß-Selektion

Bei den auf dem Plasmid pUC19 basierenden Klonierungen erfolgte eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion von *E.coli* Kolonien, die das pUC19 Plasmid mit integriertem Insert aufgenommen hatten. Diese Kulturen erlangten durch Aufnahme dieses Plasmids eine Ampicillin-Resistenz. Jedoch verlieren die *E.coli* Bakterien dadurch die Fähigkeit, X-Gal zu Galactose und einem blauen Indigofarbstoff zu hydrolysieren. Grund für diesen Verlust ist, dass die Klonierungsstelle für das Insert in einem Sequenzbereich gewählt wurde, welcher für das Peptidfragment des lacZ Gens codiert. Durch den Verlust dieses Peptids wird das Enzym β -Galactosidase bei einer erfolgreichen Klonierung inaktiviert. Da dieses Enzym für die Hydrolyse von X-Gal zuständig ist, kann diese Reaktion durch die Aufnahme des Inserts nicht mehr stattfinden. Kolonien, welche das Plasmid mit Insert aufgenommen haben,

bleiben somit farblos. Kolonien, welche das Plasmid ohne Insert in sich tragen, färben sich hingegen blau.

Bei der Anwendung dieser Selektion wurden auf LB_{Amp}-Platten 50 µl X-Gal (50 mg/ml in DMSO gelöst) ausplattiert. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden 20 µl IPTG mit 50 µl H₂O vermischt und ausplattiert. Die Verdünnung erfolgte, um das gleichmäßige Ausplattieren zu gewährleisten.

3.5. Isolation von Plasmid DNA aus *E.coli*

Positive *E.coli* Transformanten wurden in 5 ml LB-Flüssigmedium bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C unter gleichmäßigem Schütteln über Nacht inkubiert. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurde das LB-Flüssigmedium mit 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) versetzt. Zur Isolation der Plasmide mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) wurden 2-5 ml *E.coli* Kultur verwendet. Die Durchführung der Plasmidpräparation erfolgte laut Herstellerangaben.

3.6. Kultivierung von *P. furiosus*

Die Kultivierung von *P. furiosus* erfolgte, falls nicht anders beschrieben, in 20 ml ½ SME Medium mit 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Pepton und 0,1 % Stärke in Serumflaschen unter einem Stickstoffdruck von 0,8 bar. Die Inkubationstemperatur betrug 85 °C.

3.7. Kultivierung von *P. furiosus* auf Gelriteplatten

Die Kultivierung von *P. furiosus* auf ½ SME-Gelriteplatten mit 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Pepton und 0,1 % Stärke erfolgte, falls nicht anders beschrieben, in Anaerobentöpfen. Diese Töpfe wurden nach dreifachem Gaswechsel mit 0,6 bar Stickstoff begast. Die Inkubationstemperatur betrug 85 °C.

3.8. Transformation von *P. furiosus*

<i>P. furiosus</i> Transformationspuffer	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	80 mM
Na-Pyruvat	40 mM
NH ₄ Cl	4,67 mM
½ SME (ohne KHCO ₃), pH 7,0	

Die Wahl der *P.furiosus* Kulturen, welche zur Transformation von DNA-Konstrukten und Expressionsplasmiden verwendet wurden, erfolgte in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Alle Kulturen, die zur Transformation in Frage kamen, befanden sich in der späten exponentiellen Phase (2-4 x 10⁸ Zellen/ml). Zur Transformation wurden grundsätzlich frische Übernachtkulturen verwendet.

Unter anaeroben Bedingungen wurden ca. 1,5 ml frische *P. furiosus* Kultur bei 9000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl Transformationspuffer resuspendiert und in 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Präzipitation von Calcium-Kationen und Phosphat-Anionen zu verhindern, enthielt der Transformationspuffer kein Kaliumhydrogenphosphat.

Es folgte eine ca. 90-minütige Inkubation bei 4 °C im Thermocycler (Mastercycler Personal Model 5332, Eppendorf), ein 3-minütiger Hitzeschock bei 80 °C sowie erneut eine Inkubation bei 4 °C (10 Minuten). Nach 30 Minuten des Inkubationsschrittes bei 4 °C erfolgte, falls nicht anders beschrieben, die Zugabe von jeweils 0,3 pmol linearer DNA bzw. 0,5 pmol bei der Transformation von Expressionsplasmiden. Bei Verwendung des Wildtyps von *P. furiosus* wurden die Ansätze nach Beendigung des Inkubationsprogramms in selektives ½ SME Medium mit 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Pepton, 0,1 % Stärke sowie 10 µM Simvastatin in Serumfläschchen angeimpft. Nach mehrmaligen Überimpfungen konnten die Kulturen auf Gelriteplatten ausplattiert werden. Dies war notwendig, um Reinkulturen der Transformation erhalten zu können.

Die verwendete Simvastatin-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt. Eine Simvastatin-tablette (40 mg) wurde in 100 ml Ethanol (99,8% p.A.) gelöst. Die Endkonzentration lag somit bei 1 mM. Die löslichen Bestandteile wurden durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) in eine sterile, mit N₂ begaste, Serumflasche gefüllt.

3.9. Isolation von genomischer DNA aus *P.furiosus*

3.9.1. Isolierung für PCR Analysen

Zur Isolation von genomischer DNA (gDNA) im kleinen Maßstab wurden 1,5 ml gut bewachsene *P.furiosus* Kultur fünf Minuten bei 9000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl TE (10:1) resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) folgten 30 min Inkubation bei 65 °C. Im nächsten Schritt wurden 4 µl RNase A (100 mg/ml) zugegeben und 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der gDNA. Dazu verwendete man das Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) und die dazugehörigen Säulchen. Dieser Reinigungsschritt wird wiederholt, um den Reinheitsgrad der gDNA zu erhöhen. Das Elutionsvolumen betrug 30 µl TE-Puffer (10:0,1).

3.9.2. Isolierung in größerem Maßstab mittels Chloroform/Phenol Extraktion

Zur Isolation von gDNA im großen Maßstab wurden 0,1 g gefrorenes Zellmaterial von *P.furiosus* mit 567 µl TE-Puffer (10:0,1) versetzt und solange gevortext, bis die Suspension viskos wurde. Nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 0,5 %), 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) sowie 4 µl RNase A (10 mg/ml) erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei 60 °C. Anschließend wurde NaCl (Endkonzentration 0,3 M) zugegeben. Im nächsten Schritt wurde die DNA-Lösung einer Chloroform-Phenol-Extraktion unterzogen. Dazu gab man 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 8) dem Ansatz bei und mischte gründlich. Nach fünf minütiger Zentrifugation (9000 rpm) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut einer Phenolextraktion unterzogen. Anschließend wurden der wässrigen Phase 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben, gründlich gemischt und fünf Minuten zentrifugiert (9000 rpm). Die wässrige Phase wird im nächsten Schritt in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanolfällung (II. 5.3.) unterzogen.

TE 10:1	
Tris, pH 8,0	10 mM
EDTA (Titriplex II)	1 mM

3.9.3. DNA-Isolierung Schnelltest

Um gentechnisch veränderte *P. furiosus* Zellen möglichst schnell auf einen möglichen Knock-out nach der Trafo des dementsprechenden Vektors untersuchen zu können, wurde ein Schnelltest durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml einer gut angewachsenen *P. furiosus* Zellkultur ($\sim 1 \times 10^8$ Zellen / ml) 5 min bei 6000 g abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 μ l TE-Puffer (10:1) resuspendiert, 20 μ l Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und 30 min auf 56 °C erhitzt. Um störende RNA zu entfernen, wurden 4 μ l RNase A (100 mg/ml) zugefügt und der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. 625 μ l des im QIAquick PCR Purification Kit enthaltenen Puffer PB werden zugegeben und auf eine in diesem Kit enthaltene Säule gegeben. Nach einer 30 – 60 sec Zentrifugation bei 13000 rpm konnte der Durchlauf entsorgt werden. Die Säule wurde mit 750 μ l des im Kit beinhalteten PE-Puffers gewaschen, abzentrifugiert und nach einer Trockenzentrifugation erfolgte die Elution der DNA durch 50 μ l TE-Puffer (10:1). Anschließend wurde eine komplette Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt.

3.10. Isolation ribosomaler RNA aus *P.furiosus*

0,1 g gefrorenes Zellpellet wird in 625 μ l Extraktionspuffer aufgenommen und gut gemischt, bis die Suspension viskos ist. Je besser die Viskosität, desto höher die spätere Ausbeute. Anschließend werden 62,5 μ l Natriumacetat (2 M, pH 4), 625 μ l Phenol (pH 4,5) und 125 μ l Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben. Nach kurzem Vortexen stellt man die Lösung 5 Minuten auf Eis und zentrifugiert sie anschließend 20 min bei 13000 rpm und 4 °C ab. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen, zweimal mit je 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (pH 8) und einmal mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (siehe auch 3.9.2., Isolierung in größerem Maßstab). Anschließend erfolgt eine Ethanolfällung (II. 5.3.). Das Pellet wurde in 150 μ l TE (10:0,1) aufgenommen.

RNA-Extraktionspuffer	
Guanidiniumthiocyanat	4 M
Natriumcitrat	25 mM
Sarkosyl	0,5 %
B-Mercaptoethanol	0,1 M

4. Verwendete Plasmide, Primer und Oligonukleotide

4.1. Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pUC19	Klonierungsvektor zur Herstellung von pUC19- Δ PF0537::Tk-SimR
pUC19- Δ PF0537::Tk-SimR	Plasmidvektor zur Transformation von <i>P.furiosus</i> am Genlocus PF0537 zur Deletion des Gens PF0537. Hergestellt im Rahmen dieser Doktorarbeit.
pMUR41	Vektor zur Amplifikation der Resistenzkassette Tk-SimR
pMUR93	Positivkontrolle für die Knock-out-Experimente (von Robert Reichelt etabliert und positiv getestet).
pMUR315	konstruierter Vektor für den Knock-out des Ago-Proteins in <i>P. furiosus</i>
pYS3	Ausgangsvektor zur Erstellung von pYS3- <i>Pf</i> -Ago. Hergestellt im Rahmen dieser Doktorarbeit.
pYS3- <i>Pf</i> -Ago (pMUR272)	Vektor zur Expression von <i>Pf</i> -Ago in <i>P. furiosus</i>

4.2. Primer und Oligonukleotide

Einige Primer wurden durch Restriktionsschnittstellen modifiziert. Die Restriktionsenzyme sowie die entsprechenden Schnittstellen sind unterstrichen

Herstellung pYS3-*Pf*-Ago

FwdFr-BPPromotorPstI

5'- cacctgcagtccctaacatttctccaaaat – 3'

RevFr-BPPromotor

5'- cgctttatgggtgatgatggcattttcacccagaatttacaaactta – 3'

FwdAgoProteinFr-BPPromotor

5'- gaggtgaaaaatgcaccatcatcaccacataaagcgaaagtgttattattctg – 3'

RevAgoTerminatorPstI

5'- cacctgcagtctcaggctactgaaggatt – 3'

Herstellung von pUC19-ΔPF0537::Tk-SimR

leftPF0538+EcoRV

5'- gcatagatatctcatcaacagggaggaagagct – 3'

rightPF0538

5'- ataaaaatgatgaaatgcccttatctaaatatacataagttcttgatcg – 3'

leftPF0536

5'- acagaagtttaaggccttcgcattaaacttttctatttaaacaatttctaa – 3'

rightPF0536EcoRV

5'- gcaatagatatcttatcactgtctcgtaattgc – 3'

TkSimRProm1F

5'- gggcatttcatcattttatgaa – 3'

TkSimRTerm2R

5'- cgaaggctaaacttctgtttcg – 3'

Oligonukleotide/Sonden für den Northern-Blot

Alle aufgelisteten Oligonukleotide wurden über MWG Eurofins bezogen.

Sonden für die 16SrRNA-Bereiche

5'- gcatggcttagtcggaccccatagc – 3'

5'- gcagcccgcatccgaact – 3'

5'- gtcccattgtcccgcccatt – 3'

5'- accgcacgctccacccctt – 3'

5'- agtgctcccccgcattttttt – 3'

5'- gccaccggcctgcccagccctt – 3'

Sonde für die 23SrRNA

5'- cggtcgcggggatcgaa – 3'

Sonde für die 5SrRNA

5'- acaaccggatcgctggggggctta – 3'

Sonde für die snoRNA PF_s027A

5'- agtccgtcactccctcatcat – 3'

Primer für die Überprüfung der Positivkontrolle (pMUR93) nach Trafo in *P. furiosus* Zellen

TFENups-93F

5'- aactcttcttctgttatctatcctgac – 3'

TFENDownR

5'- ccatccaaattctttatcatt – 3'

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine enzymatische Methode dar, mit Hilfe derer es möglich ist, DNA-Fragmente *in vitro* mit einer sehr hohen Spezifität zu amplifizieren. Wichtig hierfür ist eine temperaturstabile DNA-Polymerase. Ursprünglich verwendete man die Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase). Heutzutage gibt es eine große Auswahl verschiedener thermostabiler Polymerasen. Wie lange die zu amplifizierenden DNA-Fragmente werden, hängt von den spezifischen Primern ab. Innerhalb mehrerer Zyklen wird die DNA denaturiert, die Primer hybridisieren („Annealing“) und die DNA-Stränge werden von der gewählten Polymerase ergänzt („Extension“). Die PCR wurde zur Konstruktion und Amplifikation von Plasmiden, zur Überprüfung von *E.coli* Klonen durch Kolonie-PCR sowie zur Analyse von *P.furiosus* Transformanten verwendet. Man unterscheidet verschiedene Arten der PCR.

5.1.1. Konventionelle PCR

Für die konventionellen PCRs wurde die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Sie ist von der Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* abgeleitet. Durch die Modifikation der *Pfu* Polymerase (zusätzliche Bindedomäne für doppelsträngige DNA) wurde die Prozessivität des Enzyms erhöht. Die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase wurde verwendet um besonders hohe Ausbeuten mit einer geringen Fehlerrate zu erreichen. Die erhaltenen PCR Produkte wurden anschließend aufgereinigt.

5.1.2. Fusion PCR

Die Fusion von DNA Fragmenten erfolgte ebenfalls durch die Polymerase-Kettenreaktion. Die zu fusionierenden Elemente wurden dabei durch die Primer so modifiziert, dass sie ca. 15-25 bp lange homologe Bereiche an den entsprechenden Enden hatten. Die als Template verwendeten PCR-Produkte wurden vor dem Fusions PCR-Schritt über horizontale Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und über das QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

Für die Fusions PCR wurden die jeweiligen Fragmente in äquimolaren Mengen eingesetzt. Als Polymerase wurde die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Die restlichen Bestandteile des Reaktionsansatzes entsprachen den Angaben des Herstellers.

Das Fusion PCR-Protokoll war in zwei Schritte aufgeteilt. Im ersten Schritt erfolgen fünf komplette Zyklen aus Denaturierung, *Annealing* und *Extension* ohne Primer im Reaktionsansatz. Dadurch wurde eine Hybridisierung der beiden DNA Fragmente an den homologen Bereichen gewährleistet. Die Polymerase ergänzte die fehlenden Nukleotide. In einem zweiten Schritt wurden die entsprechenden Primer (je 0,2 µM) zu den Ansätzen im Thermocycler (Mastercycler Personal Model 5332, Eppendorf) pipettiert. Anschließend folgten 30 komplette PCR-Zyklen zur Amplifikation des gesamten Fragments.

Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
98	30	1
98	5	
X ¹	15	5
72	15-30 sec / kbp des größten Teilfragments	
50	180 (Zugabe der Primer)	1
98	5	
X ¹	15	30
72	15 sec / kbp des gesamten Fragments	
72	300	1
4	∞	1

¹ Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit des GC-Gehalts der Primer bzw. der Überhänge gewählt.

Nach der Fusions PCR wurde der Reaktionsansatz über präparative Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt, da es häufig zu Nebenprodukten kam. Um die Konzentration der Nukleinsäuren zu erhöhen und Verunreinigungen zu minimieren, wurden die Reaktionsansätze vor dem Auftragen aufs Gel, wie in II. 5.3. beschrieben, einer Ethanolfällung unterzogen. Dadurch verbesserte sich das Verhältnis von DNA zu Agarose und somit auch der Reinheitsgrad.

5.1.3. Kolonie PCR

Zur Detektion von Insert Fragmenten nach erfolgter Ligation und Transformation in *E. coli*-Zellen, wurde Zellmaterial von *E. coli* Kolonien mit einer weißen, sterilen Pipettenspitze aufgenommen und direkt in 20 µl PCR-Ansatz gegeben. Mit derselben Spalte wurde anschließend 5 ml LB-Flüssigmedium angeimpft. Zur Beibehaltung des Selektionsdrucks wurden dem LB-Medium Ampicillin zugegeben. Bei positivem Ergebnis der Kolonie-PCR konnte mit diesen Über-Nacht-Kulturen am darauffolgenden Tag eine Plasmidpräparation durchgeführt werden.

Zur Amplifikation wurde die Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific Fisher GmbH) verwendet. Der initiale Denaturierungsschritt wurde hierbei auf 3 Minuten verlängert. Die weitere Durchführung entsprach den Herstellerangaben. Nach erfolgter Kolonie PCR wurde der Reaktionsansatz auf einem horizontalen Agarosegel analysiert.

5.2. Gelelektrophorese

5.2.1. Agarosegel-Elektrophorese

10 x TBE		Auftragspuffer für Agarosegele (6x)	
Tris, pH 8,0	90 mM	Saccharose	50%
Borsäure	90 mM	Harnstoff	4,0 M
EDTA (Titriplex II)	2 mM	EDTA (Titriplex II)	50 mM
		Bromphenolblau	0,1%

Um DNA Fragmente nach Größe aufzutrennen und analysieren zu können wurde die horizontale Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zum positiven Pol eines elektrischen Feldes und werden nach ihrer Größe aufgetrennt.

Es wurden 1%ige(w/v) Agarose-Gele verwendet. Hierzu wurde die Agarose in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Vor dem Gießen wurde die Agarose-Lösung leicht abgekühlt und mit 0,01 % Ethidiumbromid (w/v) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und dient somit als Farbstoff. Durch die Fluoreszenz von Ethidiumbromid werden die DNA Fragmente unter UV-Licht sichtbar. Diese Visualisierung erfolgt mittels einer Geldokumentationsanlage (UVP, San Gabriel, USA). Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer vermischt. Dadurch konnte die Dichte der DNA-Lösungen erhöht und somit das Pipettieren in die jeweiligen Geltaschen erleichtert werden. Als Größenstandards wurde die GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific Fisher) und die GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific Fisher) verwendet. Die zur Auftrennung benötigte Spannung betrug ca. 100 Volt.

Die Isolation einzelner DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte mittels eines Skalpells. Anschließend wurden die Gelstücke mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

5.2.2. Formaldehyd fixierte Agarosegel-Elektrophorese

MOPS-Puffer (10x), pH 7,0		Laupuffer für Formaldehydgel (1x)	
MOPS	200 mM	MOPS-Puffer (10x)	100 ml
Natriumacetat x 3 H ₂ O	100 mM	Formaldehyd (37%)	20 ml
EDTA (0,5 M), pH 8,0	20 mM	H ₂ O _{Millipore} (RNase frei)	ad 1000 ml

Auftragspuffer für Formaldehyd fixierte Agarosegele (5x)	
MOPS-Puffer (10 x)	40 % (v/v)
Formamid	30 % (v/v)
Glycerol	20 % (v/v)
Formaldehyd (37 %)	7 % (v/v)
EDTA (500 mM, pH 8,0)	0,8 % (v/v)
Bromphenol-Lösung (gesättigt)	0,15 % (v/v)

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen. Sie wandern deshalb abhängig von ihrer Größe in einem elektrischen Feld zur Anode. Einzelsträngige RNA-Moleküle neigen allerdings, im Gegensatz zu DNA, zur Ausbildung von Sekundärstrukturen. Diese können das Wanderungsverhalten im Gel beeinflussen. Daher wurde die Agarosegel-Elektrophorese in Anwesenheit des denaturierenden Agens Formaldehyd durchgeführt. Formaldehyd reagierte hierbei mit den freien Aminogruppen der RNA und inhibierte dadurch die Ausbildung von A-U-Basenpaaren.

Angesichts der Verbreitung und Stabilität von RNAsen ist ihre Inaktivierung besonders wichtig. Die verbreitetste Methode, Lösungen RNAsen frei zu bekommen, ist die Behandlung mit Diethylcarbonat, kurz DEPC. Durch DEPC werden Histidinreste zu N-Carbethoxyhistidin modifiziert, was zur Hemmung der RNAsen führt. Um DEPC-behandeltes Wasser herzustellen, wurde destilliertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ steril filtriert, mit DEPC versetzt (1:1000), über Nacht auf dem Magnetrührer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung autoklaviert, wodurch DEPC in CO_2 und Ethanol zerfiel.

Ein 1 %iges Formaldehyd fixiertes Agarosegel setzte sich aus 0,3 g Agarose, 3 ml MOPS-Puffer (10x), 27 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ (DEPC-behandelt), 3 μl EtBr und 540 μl Formaldehyd zusammen, wobei das EtBr sowie das Formaldehyd erst nach Abkühlen der vorher aufgekochten Lösung zugegeben wurde. Durch die Zugabe von EtBr wurden die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar. Die zu analysierenden RNA-Proben wurden mit 5 x Auftragspuffer für Formaldehyd fixierte Agarosegele vermengt. Die zur Auf trennung benötigte Spannung betrug ca. 100 V.

Die Isolation und Aufreinigung der RNA-Moleküle erfolgte wie bei Agarosegelen (II. 5.2.1.).

5.3. Ethanolfällung

Zum Aufkonzentrieren und Reinigen von DNA-Fragmenten wurden Ethanol-Fällungen durchgeführt. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit Natriumacetat und anschließend mit Ethanol behandelt, was zu einer Präzipitation der Nukleinsäure führt.

Das Vorgehen in der Praxis lautet wie folgt. Die DNA-Lösung wurde mit 2-3 Volumen 99 %igen Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 4,6) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei -80 °C. Die Dauer dieser Inkubation kann sich jedoch auch erhöhen. Dies hängt von der Länge der Nukleinsäure ab. Je kürzer die Nukleinsäure, desto länger die Inkubationszeit. Nach der Inkubation erfolgte ein Zentrifugation (13.000rpm) für eine Stunde bei 4 °C. Im Anschluss wurde das

Pellet in 3 Volumen 70 %-igen Ethanol gelöst und erneut 15 Minuten zentrifugiert (13.000rpm). Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet für etwa 10 Minuten bei 40 °C getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Pellet in TE (10:0,1) resuspendiert.

TE 10:0,1

Tris, pH 8,0	10 mM
EDTA (Titriplex II)	0,1 mM

5.4. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration von Lösungen wurde das Spektrophotometer Nanodrop ND1000 (PeqLab) verwendet. Anhand des Gerätes konnte die Nukleinsäurekonzentration in ng/µl bestimmt werden. Außerdem erlaubten die zusätzlich erhaltenen Verhältniswerte der Absorption von 260/280 nm und 280/260 nm Rückschlüsse auf mögliche Verunreinigungen durch Proteine, Phenol oder andere Stoffe.

5.5. Nuklease-Behandlungen

Die Funktion von Nukleasen besteht darin, Nukleinsäuren teilweise oder vollständig abzubauen. Zum Abbau von DNA wurden die Nuklease DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe) verwendet. RNA hingegen benötigte zu dessen Abbau die RNase H (Roche Diagnostics GmbH, Karlsruhe).

Im Falle der DNase I wurden 100 mg in 5 ml Aufbewahrungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM CaCl₂ in 50% Glycerol) gelöst, wodurch eine Aktivität von 40 U/µl vorlag. Die DNase I benötigte für die volle Funktionsfähigkeit einen Reaktionspuffer. Die optimale Reaktionstemperatur lag bei 37 °C.

DNase I Reaktionspuffer (10x)		RNase H Reaktionspuffer (10x)	
Tris-HCl, pH 7,5	100 mM	Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
MgCl ₂	25 mM	NaCl	500 mM
CaCl ₂	5 mM		

Die RNase H lag bereits gelöst in einer Konzentration von 1 U/µl vor. Um sowohl einzel- als auch doppelsträngige RNA verdauen zu können, benötigte die RNase H einen Reaktionspuffer, dessen NaCl-Menge zwischen 0 und 100 mM lag. Die optimale Reaktionstemperatur der RNase H lag bei 37 °C.

5.6. Proteinase-Behandlungen

Proteinasen greifen Peptidbindungen in Proteinen an und spalten diese. Die verwendete Proteinase K wurde für den Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäuren verwendet. Sie wurde in einer Konzentration von 40 µg/ml eingesetzt und mit dem Proteinase K Puffer vermengt. Die Ansätze wurden 15 min bei 65 °C inkubiert.

Proteinase K Puffer	
Tris, pH 7,5	200 mM
NaCl	300 mM
SDS	2 % (v/v)
EDTA	25 mM

5.7. Sequenzierungen

Für Sequenzanalysen von Plasmid-DNA, welche aus *E. coli* isoliert worden war, wurden ca. 500-600 ng mit dem entsprechenden Primer (Endkonzentration 10 μ M) versetzt und auf ein Volumen von 7 μ l aufgefüllt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt.

5.8. Restriktionsanalysen

Restriktionsanalysen wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Diese Enzyme schneiden die DNA an spezifischen Stellen. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Die Hydrolysen wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Sie hatten ein Volumen von 20 oder 50 μ l.

Restriktionshydrolysen wurden zur Verifizierung und Linearisierung von Plasmiden, sowie zur Erzeugung von kompatiblen Enden für nachfolgende Ligationen durchgeführt.

Plasmide, welche im Anschluss für Ligationen eingesetzt wurden und nur eine Schnittstelle aufwiesen, mussten an ihren Enden dephosphoryliert werden. Eine Selbstligation konnte somit verhindert werden. Die Katalyse der Dephosphorylierung der DNA übernahm das Enzym *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (New England Biolabs).

Die Versuchsansätze wurden über ein 1 %iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

5.9. Ligationen

Zur Integration von Fragmenten in Plasmidvektoren wurden das Plasmid und das Insert mit identischen Restriktionsenzymen geschnitten. Dadurch konnten jeweils kompatible Enden erzeugt werden. Die beiden aufgereinigten, linearen Fragmente wurden im Anschluss zusammen mit der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) und den entsprechenden Puffern für 4 h bei RT inkubiert. Das Volumen der Ligationsansätze betrug zwischen 10 und 20 μ l. Das Vektor:Insert – Verhältnis lag bei 1:3 und 1:5. Die T4 DNA Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy-Ende und 5'-Phosphat-Ende der DNA-Fragmente.

5.10. Markierung von Nukleinsäuren mittels [γ - ^{32}P]-ATP

Die zuvor aus Agarosegelen isolierten Nukleinsäuren wurden in einem 20 μl Ansatz radioaktiv markiert. Das hierzu benötigte [γ - ^{32}P]-ATP wurde von Hartmann Analytic, Braunschweig, bezogen. Die T4 Polynukleotidkinase katalysierte die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf den 5'-OH Terminus in doppel- und einzelsträngiger DNA oder RNA. Folgender Ansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert:

extr. DNA / RNA (50–100 ng)	x μl
T4 PNK Puffer (10 x)	2 μl
T4 PNK (10 U / μl)	1 μl
[γ - ^{32}P]-ATP	0,5 μl
spez. Aktivität: 111 TBq / ml	
Konzentration: 370 MBq / ml	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ (DEPC-behandelt)	x μl
	20 μl

Anschließend wurde die PNK durch Inkubation für 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert. Um die unspezifische Radioaktivität von den markierten Nukleinsäure-Molekülen trennen zu können, wurde eine Bio-Rad *Micro-spin 6 Chromatographie Column* eingesetzt. Der Einsatz der Säulchen erfolgte laut Herstellerangaben.

6. Konstruktion eines Shuttle-Vektors für die Expression von *Pf-Ago* in *Pyrococcus furiosus*

Für die Expression des Argonaute-Proteins in *P. furiosus* wurde der Vektor pYS3 benutzt (Waege *et al.*, 2010). Dieser Vektor kann von *P. furiosus* aufgenommen werden und ermöglicht in Kombination mit einem starken Promotor die Expression des Argonaute-Proteins. Der Vektor verfügt über eine Simvastatin-Resistenzkassette, wodurch eine Selektion der Organismen, welche den Vektor aufgenommen haben, durchgeführt werden kann. Als Promotor diente der Fructose-1,6-Bisphosphatase (*fbp*)-Promotor. Durch Zugabe von Pyruvat als Kohlenstoffquelle werden die Proteine der Glukoneogenese aktiviert, was zu einer erhöhten Expression der daran beteiligten Proteine führt. Die Fructose-1,6-Bisphosphatase ist ein Teil der Gluconeogenese. Daher werden dieser Promotor und somit auch das damit verbundene Argonaute-Protein im pYS3-Vektor stark exprimiert. Um die anschließende Aufreinigung des Proteins zu erleichtern, wurde das Protein N-terminal nach dem Start-Codon mit einem His₆-Tag versehen.

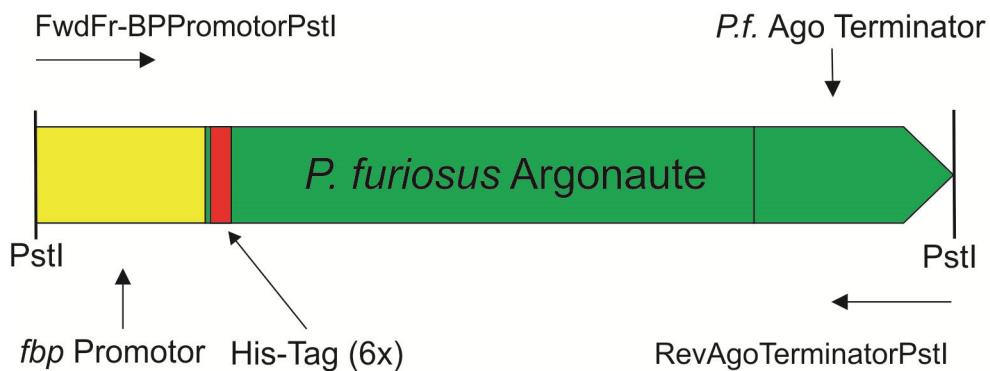


Abbildung 4 DNA-Konstrukt in den Vektor pYS3 zur Expression in *P. furiosus*. Das Insert besteht aus dem Fructose-1,6-Bisphosphatase (*fbp*)-Promotor (gelb) und dem Argonaute-Genabschnitt plus Terminator (grün). Nach dem Startcodon wurde ein His₆-Tag eingebaut (rot). An den Enden des Konstruktts befindet sich für den Einbau in den pYS3-Vektor jeweils eine *PstI*-Schnittstelle.

Das Vektorinsert bestand aus der *fbp*-Promotorsequenz und dem *Pf*-Ago mit Terminator (Abb. 4), welche mittels Fusion-PCR miteinander verbunden wurden. Zur Amplifikation der beiden Teile aus der gDNA von *P. furiosus* wurden folgende Primer für die PCR verwendet. Die Extension-Zeit wurde laut Herstellerangaben gewählt.

Sequenzen	Primer-Paar	Annealing-Temperatur
<i>fbp</i> Promotor (~ 250 bp)	FwdFr-BPPromotorPstI	58 °C
	RevFr-BPPromotor	
<i>Pf</i> -Ago+Term (~ 2500 bp)	FwdAgoProteinFr-BPPromotor	58 °C
	RevAgoTerminatorPstI	

Zur Aufreinigung wurden jeweils 25 µl der entsprechenden PCR-Ansätze über ein horizontales Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und anschließend einer Gelextraktion unterzogen. Dazu wurde das Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Nukleinsäurekonzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Zur Fusion der einzelnen DNA-Fragmente mittels Fusion-PCR wurden jeweils äquimolare Mengen der entsprechenden Fragmente eingesetzt. Grundlage hierfür bietet das kürzere Fragment, wovon jeweils 10 ng eingesetzt wurden.

Fusioniertes Fragment	Primer-Paar	Annealing-Temperatur
<i>fbp</i> Promotor (~ 250 bp)	FwdFr-BPPromotorPstI	58 °C
	RevAgoTerminatorPstI	

Durch die Fusion des *fbp* Promotors mit *Pf*-Ago+Term entstand das Endprodukt mit einer Gesamtlänge von ~2750 bp. Dieses Produkt wurde über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und dessen Konzentration anschließend photometrisch ermittelt.

Zur identischen Vervielfältigung des Konstrukts erfolgte eine Klonierung in den Vektor pYS3, welcher anschließend in *E. coli*-Zellen transformiert wurde. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *PstI* hydrolysiert. *PstI* schneidet den Vektor an genau einer Stelle. Um eine Religation zu verhindern, musste der linearisierte Vektor nach der Hydrolyse an den Enden dephosphoryliert werden. Verwendet wurde dazu die *calf intestine alkaline phosphatase (CIP)*. Die Dephosphorylierung erfolgte für 1 h bei 37 °C. Der geschnittene Vektor wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Das konstruierte Insert wurde ebenso mit *PstI* geschnitten und über präparative Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt.

Die beiden geschnittenen DNA-Fragmente wurden im Anschluss 2 h bei Raumtemperatur ligiert (II 5.9.). Die Transformation erfolgte in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen. Um die Selektion der positiven Ligationsprodukte zu erleichtern, wurden diese auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Nach der Inkubation der transformierten DH5α-Zellen auf LB_{Amp}-Platten über Nacht bei 37 °C konnten Kolonien gepickt werden. Die Verifizierung der Ligation und Plasmidaufnahme erfolgte über Kolonie PCR (II. 5.1.3.). Als Primer für die Kolonie PCR dienten die Primer der Fusions-PCR. Positiv getestete Klone wurden in 5 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von diesen Kulturen erfolgte tags drauf eine Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). Die Konzentration des extrahierten Plasmids wurde photometrisch bestimmt und abschließend durch eine Sequenzanalyse verifiziert.

7. Proteinexpression und Zellaufschluss

7.1. Expression in *E.coli*

Für die Proteinexpression in *E.coli* wurde über Nacht eine Vorkultur angezogen. Hierfür wurden 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) versetzt. Das Medium wurde im Anschluss steril mit Hilfe einer Impföse angeimpft und über Nacht bei 37 °C rollend inkubiert. Diese Vorkultur wird tags drauf in 500 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium überführt und schüttelnd bei 37 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-1,0 erreicht war. Die OD₆₀₀ wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Bei OD₆₀₀ 0,6-1,0 wurde mit IPTG (0,4 mM) die Expression induziert. Der Kolben wurde dann über Nacht bei RT geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 6000g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

7.2. Zellaufschluss und Hitzedenaturierungsschritt bei *E.coli*

<i>E.coli</i> -Auftragspuffer	
Imidazol	500 mM
NaCl	300 mM
Na-Hepes (pH 7,8)	20 mM
MgCl ₂	7 mM
Glycerin	12,5 % (v/v)
PMSF (0,5 M)	0,1 % (v/v)
Tween 20	0,1 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	0,07 % (v/v)
H ₂ O _{Millipore} ad 1000 ml	

Zum Zellaufschluss wurde eine French Press Druckzelle (Aminco, Silver Spring, USA) vor Gebrauch sterilisiert (EtOH, 70%) und dreimal gewaschen ($H_2O_{Millipore}$ + 1 mM PMSF). *E.coli*-Zellen wurden in *E.coli*-Auftragspuffer suspendiert (ca. 4 g Zellmasse in 10 ml, Auftragspuffer vorher mit Complete Mini™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA-frei versetzen) in die gewaschene Druckzelle überführt und durch dreimalige Passage bei 500 psi (3,4 MPa) aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde mit DNase I versetzt. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und es erfolgte ein Reinigungsschritt mittels Hitzedenaturierung. Dazu wurde der Überstand für 15 min auf 90 °C erhitzt und erneut für 30 min bei 20000 g abzentrifugiert. Dies hatte zur Folge, dass die *E.coli*-Proteine denaturieren und aus dem Überstand größtenteils verschwinden. Die hyperthermophilen, in *E.coli* rekombinant exprimierten *P.furiosus* Proteine sind hiervon nicht betroffen. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

7.3. Expression in *P.furiosus*

Für die Proteinexpression in *P.furiosus* wurde eine frisch angewachsene Kultur verwendet. Zur Anzucht im 100 l Fermenter benötigte man hierzu etwa 4 l Kultur. Die mit dem pYS3 Vektor versehenen *P.furiosus* Kulturen wurden in ½ SME-Medium mit Pyruvat angezogen, da dieser Vektor unter gluconeogenetischen Bedingungen exprimiert wird. Das Medium enthielt 10 µM Simvastatin und wurde bei 85 °C über Nacht inkubiert. Der Gasdruck der N_2CO_2 -Mischung lag bei 2 bar, der Rührer wurde auf 200 rpm eingestellt. Nach 19 Stunden wurde der Fermenter abgekühlt und die Zellen mittels Zentrifugation geerntet, bevor sie mit Hilfe von Stickstoff eingefroren wurden.

7.4. Zellaufschluss von *P.furiosus*

<i>P.furiosus</i> -Aufschlusspuffer (pH 7,5)	
NaCl	300 mM
Na-Hepes	40 mM
Imidazol	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Ultraschallbehandlung

P.furiosus besitzt eine äußerst stabile äußere Hülle. Um diese Organismen aufzuschließen zu können werden sie einer Ultraschallbehandlung unterzogen. In einem 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) wurden ca. 5 g *P.furiosus* Zellen vorgelegt und in 15 ml *P.furiosus*-Aufschlusspuffer gelöst. Der Aufschlusspuffer wurde vorher mit Complete Mini™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA-frei versetzt. Die Zellsuspension wurde in 4 Zyklen abwechselnd für 30 s beschallt (Output: 4, Duty Cycle: 30 %) und für 1 Min auf Eis gekühlt. Der Schallkopf des Ultraschall-Desintegrators (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA) wurde beim Beschallen langsam in der Zellsuspension auf und ab bewegt, ohne die Lösung dabei aufzuschäumen. Das erhaltene Homogenisat wurde mit DNase I versetzt und die Aufschlusseffizienz lichtmikroskopisch kontrolliert.

FastPrep®-24 Zellmühle

Das Homogenisat wurde nach der Ultraschallbehandlung in 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (Sarstedt, Nümbrecht) vorgelegt. Darauf wurden 0,5 g sterile Glasperlen (d= 0,1 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben. Die Lösung wurde in der FastPrep®-Zellmühle (FastPrep®-24, MPBIO, Solon, USA) dreimal für 60 sec bei einer Intensität von 6,0 m/s) geschüttelt. Zwischen den Schüttelschritten wird für 5 min auf Eis gekühlt. Die Glasperlen wurden sedimentiert (2 min, 1000g, 4 °C) und der Überstand in ein neues, steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Aufschlusseffizient konnte am Lichtmikroskop überprüft werden.

7.5. Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung wurden von den *E. coli* – Zellen mit den verschiedenen Vektorsystemen Glycerinkulturen angelegt, welche für etwa ein Jahr bei -80°C gelagert werden können. Hierzu wurde eine frische Übernachtkultur mit Glycerinlösung vermengt und sofort eingefroren.

Glycerinlösung für *E.coli* Dauerkulturen

Glycerin	65%
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 M
Tris, pH 8,0	0,025 mM

8. Chromatographische Trennverfahren

Die chromatographischen Arbeiten zur Anreicherung und Aufreinigung von Proteinen aus komplexen Proteinlösungen erfolgten an einem FPLC-System (Fast Protein Liquid Chromatography) unter Verwendung von vorgepackten Säulen (GE Healthcare, Uppsala, S). Die verwendeten FPLC-Systeme (ÄKTA™*basic*, ÄKTA™*purifier*; GE Healthcare, Uppsala, S) waren mit einer UV-Messzelle (280 nm), ausgestatten. Als Steuerungssoftware diente UNICORN™ (GE Healthcare, Uppsala, S). Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor dem Gebrauch filtriert (0,45 µm) und gegebenenfalls mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die einzelnen chromatographischen Arbeiten konnten sowohl unter gekühlten Bedingungen bei 4 °C (ÄKTA™*purifier*) als auch bei Raumtemperatur (ÄKTA™*basic*) durchgeführt werden.

8.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Mit der Affinitätschromatographie (AC) lassen sich gezielt Proteine (oder andere Substanzen) aufgrund einer reversiblen Wechselwirkung zwischen dem Protein (oder Teilen des Proteins) und einem spezifischen Liganden, der an eine chromatographische Matrix gebunden ist, aus einem Gemisch isolieren.

Für die affinitätschromatographische Aufreinigung wurde eine Ni-NTA-Säule (HiTrap Chelating, 1 ml, GE Healthcare) verwendet. Ni-NTA-Säulen besitzen Ni²⁺-Ionen, welche Nitrilotriessigsäure (NTA) an das Säulenmaterial gebunden wurden. Die Proteine binden über die benachbarten Histidinreste an

das Ni^{2+} und somit an die Chromatographiematrix. Das Protein mit His-Tag kann durch einen Überschuss an Imidazol wieder von der Säule verdrängt werden.

Vor dem Beginn der Aufreinigung wurde die Säule mit *E.coli*-Auftragspuffer bzw. *P.furiosus*-Aufschlusspuffer und dem jeweiligen Elutionspuffer equilibriert. Der Auftrags-/Aufschlusspuffer unterschied sich vom Elutionspuffer in der Imidazolkonzentration. Im Elutionspuffer befanden sich 500 mM Imidazol. Nach dem Equilibrierungsschritt wurde die Probe mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Ni-NTA-Säule aufgetragen und diese anschließend mit ca. 50 ml Auftrags-/Aufschlusspuffer gewaschen. Das Protein konnte anschließend mit dem Elutionspuffer von der Säule eluiert werden. Die im FPLC-System verbaute UV-Lampe erlaubte es, den genauen Zeitpunkt der Elution festzuhalten.

8.2. Gelfiltrations-Chromatographie (SEC)

Die Gelfiltration (SEC = *Size Exclusion Chromatography*) ist eine Art der Flüssigkeitschromatographie. Bei dieser Methode werden Moleküle aufgrund ihrer Größe in Lösung, sprich dem spezifischen hydrodynamischen Volumen, aufgetrennt. Die Säulenmatrix besteht aus einzelnen Partikeln, sogenannten Beads, welche hochporös sind. Dies führt dazu, dass große Moleküle diese Beads leichter passieren und somit schneller eluiieren als kleine Moleküle. Die verminderte Laufgeschwindigkeit von kleinen Molekülen, Salzen und Puffersubstanzen resultiert auf der verlängerten Laufstrecke, bedingt durch das Eintreten in die poröse Säulenmatrix. Eine niedrige Flussrate und eine lange Trennstrecke wirken sich hierbei positiv auf die Trennleistung der Gelfiltration aus. Diese Art der Chromatographie wird als schonend angesehen, da während der Elution keine Veränderung des Puffersystems stattfindet. Es ist allerdings ratsam, stets eine gewisse Menge NaCl/KCl im Puffer mitzuführen, da hydrophobe Proteine bei einer geringen Ionenstärke zu starken Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix tendieren können.

Vor der Chromatographie wurden die Säulen mit 2 CV (*column volume*) SEC-Puffer äquilibriert. Die Probe über eine Probenschleife aufgetragen und die einzelnen Proteine bei einem Fluss von 0,3 – 1,0 ml pro Minute eluiert. Die Probe wurde gegebenenfalls vor dem Auftrag über die Probenschleife filtriert (0,45 µm). Dadurch konnte verhindert werden, dass störende Schwebteilchen in das FPLC-System eingebbracht werden. Die Fraktionen des Eluats wurden nach erfolgreicher Auftrennung biochemisch auf die Anwesenheit des Zielproteins untersucht. Fraktionen, welche das gesuchte Protein enthielten, wurden gegebenenfalls vereinigt. Die exakte Flussgeschwindigkeit des Laufpuffers sowie der maximale Druck waren abhängig von der Säule und richteten sich nach den jeweiligen Angaben des Herstellers. Nach 3 – 5 Chromatographien wurden die Säulen mit 2 CV 0,5 M NaOH gereinigt und mit 5 CV filtriertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gewaschen. Anschließend konnten die Säulen wieder verwendet oder in 20 % EtOH gelagert werden.

SEC-Säulen	SEC-Puffer (pH 8,0)
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	Tris 25 mM
Superdex 75 10/300 GL	NaCl 300 mM
Superdex 200 10/300 GL	Glycerin 10 % (v/v)
	DDM 0,05 % (w/v)
	PMSF 0,1 mM

8.3. Analytische Gelfiltration

Da das Prinzip der Gelfiltration auf der Trennung von Proteinen nach ihrer Größe beruht, kann mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie das Molekulargewicht dieser bestimmt werden. Hierfür werden Proteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, mit deiner Geschwindigkeit von 0,5 ml/min auf einer Superdex 75 10/300 GL Säule aufgetragen und eluiert. Durch die Elutionsprofile konnte der Zeitpunkt der Elution des Proteins bestimmt werden. Anhand dieser Werte sowie der jeweiligen Molekulargewichte (welche vorher logarithmiert wurden), konnte eine Eichgerade gebildet werden. Die Proteine, welche als Standard benutzt wurden, waren die Alkoholdehydrogenase aus Hefe, BSA, Carboanhydrase sowie Cytochrom C.

8.4. Saccharose-Dichtegradient

Mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau der Werkstatt) wurde ein linearer Saccharosegradient (15 – 55%) in 12 ml Ultrazentrifugenröhren (Beckman Ultra-Clear Tubes, 14 x 89 mm; Beckman Coulter, Unterschleißheim) hergestellt. Hierfür wurden jeweils 4,75 ml einer 15 %igen und 4,75 ml einer 55%igen Saccharoselösung eingesetzt. Auf diese Art wurde ein vom Boden des UZ-Röhrchens nach oben hin abnehmender, linearer Gradient erzeugt. Die dementsprechende Menge an Saccharose wurde zuvor in 1 x Gradientenpuffer gelöst und die dabei entstandenen Lösungen filtriert. Es ist bei der Herstellung der 55 %igen Lösung darauf zu achten, dass die Saccharose langsam zugegeben wird. Ein leichtes Erhitzen hierbei beschleunigt das Lösen der Saccharose im Gradientenpuffer.

Je nachdem wie viel Probe zugegeben wurde, musste die Saccharoselösung des entstandenen Gradienten oben abgenommen werden. Das Abnehmen der Lösung erfolgte mittels einer 1 ml Pipette, welche in kreisrunden Bewegungen an der Oberfläche die überflüssige Lösung abnahm. Der anschließende Probenauftrag geschah mittels einer Pipette möglichst an der Tubewand. Somit konnte sich die Probe gleichmäßig an der Gradientenoberfläche verteilen. Die Tubes wurden vorsichtig in die Zentrifugenbehälter (SW Rotor 40Ti, Beckman Coulter, Unterschleißheim) gegeben. Dies erfolgte mit Hilfe einer Pinzette. Nach dem Austarieren der einzelnen Zentrifugenbehälter wurden diese in die Ultrazentrifuge gegeben. Die beladenen UZ-Röhrchen wurden anschließend zentrifugiert (Beckman Optima LE-80K, 30000 rpm, 18 h, 4 °C, Acceleration: slow, Brake: off).

Gradientenpuffer (10x)	
KCl	1,5 M
Tris-HCl (pH 7,5)	250 mM
EDTA	20 mM

9. Proteinbiochemische Methoden

9.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Gesamtprotein in einer Lösung wurde mittels Bradford Färbe test durchgeführt. Bei diesem Assay wurde der blaue Säurefärbestoff Coomassie-Brilliant-Blue G250 verwendet. In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von 465 zu 595 nm. Der Farbstoff bindet hierbei unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine.

Von der verwendeten Stammlösung wurden jeweils 1 ml zu der zu untersuchenden Probelösung (100 µl) gegeben. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt und nach 5 min Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm gemessen.

Zur quantitativen Abschätzung wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) bekannter Konzentration eine Eichkurve erstellt. Anhand dieser Eichkurve konnte die Proteinkonzentration in der Probelösung ermittelt werden.

Stammlösung Bradford-Assay	
Coomassie-Brilliant-Blue G250	0,1 % (w/v)
Ethanol (96 %)	5 % (v/v)
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	1 % (v/v)

9.2. Konzentrierung, Umpufferung und Dialyse von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden in VivaSpin™-Zentrifugenrörchen (Sartorius AG, Göttingen) mit einem MWCO (*molecular weight cut off*) von 100 kDa, 30 kDa oder 10 kDa nach Angaben des Herstellers konzentriert. Diese Zentrifugenrörchen konnten auch zur Umpufferung benutzt werden z.B. bevor eine Proteinlösung nach der Elution auf eine andere Säule mit anderem Puffersystem übertragen wurde. Für die Dialyse von Proteinlösungen die entsprechenden Membranen (Serva, Heidelberg) in H₂O_{Millipore} autoklaviert. Vor dem Einsatz der Membranen wurden sie mehrfach mit dem entsprechenden Puffer gespült und für mindestens 12 h darin äquilibriert. Anschließend wurden die Proteinlösungen gegen das 400 fache Probenvolumen dialysiert. Je nach Versuch erfolgte die Dialyse über Nacht bei RT oder für mehrere Tage bei 4 °C.

9.3. Gelelektrophoretische Verfahren

9.3.1. SDS-PAGE

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) denaturierter Proteine wird verwendet, um die Proteine einer Lösung ihrer molekularen Masse nach aufzutrennen. Das Gel wirkt dabei als Trennmedium, ähnlich eines Molekularsiebes, wodurch kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern. Durch die Zugabe von SDS wird die Eigenladung der denaturierten Proteine überdeckt. Das Verhältnis von Ladung zu Größe ist somit für jedes Protein annähernd gleich. Die negativen Ladungen des SDS führen zu einer gegenseitigen Abstoßung, was zusammen mit der Denaturierung durch Aufkochen zu einer Linearisierung der Proteine führt. Dies erlaubt eine Auftrennung nach der Kettenlänge,

proportional zur Molekülmasse, denn die längeren Proteine werden im Gel stärker zurückgehalten als kürzere Proteine.

Die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurde standesgemäß in einem Mini-Protean™ Tetra System (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bis zum Einlaufen der Probe in das Trengel bei 20 mA pro Gel. Sobald die Probe im Sammelgel angekommen war, wurde die Spannung auf 30 – 40 mA erhöht. Die zugehörigen Gele hatten eine Größe von 10 x 8 cm und waren 0,75 mm oder 1 mm dick. Das Trengel hatte üblicherweise eine Konzentration von 15 %. Für eine exakte Auftrennung eines größeren Proteingrößenspektrums wurde jedoch ein lineares Gradientengel (8 – 20 %) benutzt. Dies geschah mit Hilfe eines Gradientenmixers (Eigenbau der Werkstatt). Dazu wurden jeweils 3 ml 8%ige und 3 ml 20%ige Trengellösung eingesetzt. Die Zusammensetzung der Gelbestandteile war wie folgt:

Trengelpuffer, pH 8,8		Sammelgelpuffer, pH 6,8	
Tris/HCl	1,5 M	Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4 % (v/v)	SDS	0,4 % (v/v)

	Trengel 15 %	Trengel 8%	Trengel 20%	Sammelgel 4,5%
Trengelpuffer, pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml	---
Sammelgelpuffer, pH 6,8	---	---	---	1,5 ml
Rotiphorese® Gel 30	---	5,33 ml	---	1,2 ml
Rotiphorese® Gel 40	7,5 ml	---	10 ml	---
H ₂ O _{Millipore}	7,5 ml	9,67 ml	5 ml	5,1 ml
APS 10% (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach der Denaturierung wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und anschließend aufgetragen.

Laemmli Auftragspuffer (5x), pH 6,8		Laemmli Laufpuffer (10x), pH 8,3	
Tris/HCl	250 mM		
Glycerin	50 % (v/v)	Tris	250 mM
SDS	5% (w/v)	Glycin	1,92 M
β-Mercaptoethanol	5% (w/v)	SDS	1 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01% (w/v)		

9.3.2. Native PAGE

Die *Native-PAGE* ist eine Methode zur Trennung nativer Proteinkomplexe. Die Komplexe behalten hierbei ihre endogene Untereinheitenzusammensetzung. In Abhängigkeit von ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt sind die meisten Proteine bei pH-Werten von 8 bis 9 (dem pH-Wert gängiger Laupuffer) leicht negativ geladen und bewegen sich zur Anode hin, die sich bei Vertikalgelen am Boden befindet. Je mehr negative Ladungen ein Protein unter diesen Bedingungen trägt, desto schneller wird es sich durch das Gel bewegen. Im Gegensatz zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei der nativen Gelelektrophorese eine Trennung nach Ladung und Größe des Proteins. Die native PAGE wird besonders dann eingesetzt, wenn multimere Proteine bzw. Proteinkomplexe im Gel detektiert werden sollen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 200-300 V, 50 W und 5 mA pro Gel. Zugehörige Gele hatten eine Größe von 20 x 20 cm und waren 1,5 mm dick. Je nach Probenlösung wurden verschiedene Gelkonzentrationen verwendet.

Natives Gel Stammlösungen	4 %	6 %	8 %	12 %	20 %
10 x TBE Puffer	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
Glycerin	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Rotiphorese® Gel 30	33,33 ml	50 ml	66,66 ml	---	---
Rotiphorese® Gel 40	---	---	---	75 ml	125 ml
H ₂ O _{Millipore}	181,67 ml	165 ml	148, 34 ml	140 ml	90 m

Auftragspuffer für Natives Gel (2x), pH 6,8

Tris/HCl	150 mM
Glycerin	20 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1%

Für die entsprechenden Gele wurden jeweils 25 ml Stammlösung mit 250 µl APS und 30 µl TEMED versetzt. Nach der Polymerisation konnten die mit 2 x Auftragspuffer versetzten Proben aufgetragen werden.

9.4. Färbung von Proteingelen

9.4.1. Coomassiefärbung

Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gele wurde durch die Anfärbung der Gele mit Coomassie-Lösung. Hierzu wurde das Gel nach der erfolgten Elektrophorese in Färbelösung Coomassie Blue gelegt, in der Mikrowelle kurz erhitzt und 30 min leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Färbelösung abgekippt und das gefärbte Gel mit Entfärbelösung bedeckt. Das Gel wurde so lange geschüttelt, bis die Proteinbanden die gewünschte Intensität vorweisen konnten.

Färbelösung Coomassie Blue		Entfärbelösung Coomassie Blue	
Brilliant Blue R 250	0,2 g (v/v)	Isopropanol	25 %
Isopropanol	40 % (v/v)	Eisessig	5 %
Eisessig	7 % (v/v)	H ₂ O _{Millipore}	70 %

9.4.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) gehört zu den sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamid-Gele. Sie ist deutlich sensitiver als die Coomassie-Färbung. Bei der Silberfärbung wurden die Gele nacheinander in je 200 ml der folgenden Lösungen inkubiert:

Inkubationsschritt	Dauer	Lösung
		50 % (v/v) Methanol
Fixieren	1h oder über Nacht	12 % (v/v) Eisessig 0,37 % (v/v) Formaldehyd
Waschen 1	3 x 1 min	50 % (v/v) Ethanol
Blockieren	1 min	0,8 mM Na ₂ S ₂ O ₃
Waschen 2	3 x 20 sec	H ₂ O _{Millipore}
Imprägnieren	15 – 20 min	12 mM AgNO ₃ 0,28 % (v/v) Formaldehyd
Waschen 3	2 x 20 sec	H ₂ O _{Millipore}
Entwickeln	bis zum Sichtbarwerden der Banden	0,3 M Na ₂ CO ₃ (10 x H ₂ O) 4 ml Blockierlösung 0,19 % (v/v) Formaldehyd
Stoppen	10 min	60 mM EDTA (Titriplex III)
Waschen 4	3 x 1 min	H ₂ O _{Millipore}

10. Immunologische Verfahren

10.1. Gewinnung spezifischer Antiseren und Antikörper

Für die Herstellung von Antiseren wurden die entsprechenden Proteine gereinigt und einem Kaninchen injiziert (Davids Biotechnologie, Burgweinting). Das Antiserum konnte nach 2-3 Monaten gewonnen werden.

10.2. Aufreinigung der erhaltenen Antiseren

Die Reinigung von Kaninchen-IgG-Faktionen aus den Immunseren erfolgte über eine HiTrap Protein G HP Säule mit einem Volumen von 1 ml (GE Healthcare, Uppsala (SWE)) an der Äkta bei 4°C. Die Flussrate betrug 1 ml/ min. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde für jeden Antikörper eine eigene Säule verwendet. Die Säulen wurden mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0) gespült und mit gefilterten 25 ml des jeweiligen Immunserums beladen. Danach wurden die Säulen solange mit Bindepuffer gewaschen bis im Durchlauf kein Material mehr über den UV280-Wert nachgewiesen werden konnte, aber mindestens mit 10 Säulenvolumen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl, pH 2,7) und die Eluate wurde in Fraktionen von 1,2 ml aufgefangen. In den Auffanggefäß für die Fraktionen wurden zur Neutralisation jeweils 40 µl 1M Tris-HCl, pH 9,0 vorgelegt. Die Fraktionen mit Antikörpern (über den UV280-Wert bestimmt), wurden vereinigt und der pH-Wert, der neutral sein sollte, getestet und falls notwendig mit 1M Tris-HCl, pH 9,0 eingestellt. Nach der Vereinigung wurden die Antikörper-Pools über Nacht in 1l PBS-Puffer bei 4°C dialysiert. Die dialysierten Antikörper-Pools wurden am nächsten Tag in Reaktionsgefäß überführt und nach Aliquotieren entweder bei 4°C für höchsten einen Monat oder bei -20°C nach Zugabe von Glyzerin (Endkonzentration 50 %) oder bei -80°C gelagert.

PBS-Puffer (pH 7,4)	
NaCl	140 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Die Argonaute-Antikörper wurden wie beschrieben aufgereinigt. Dabei erhielt man das in Abbildung 5 dargestellte Elutionsprofil und SDS-Gel. Zur genaueren Bestimmung der Konzentrationen der gereinigten Antikörper wurde ein Bradford-Test (II. 9.1.) durchgeführt. Die Konzentration des Argonaute-Antikörpers lag bei 2,0 mg/ml.

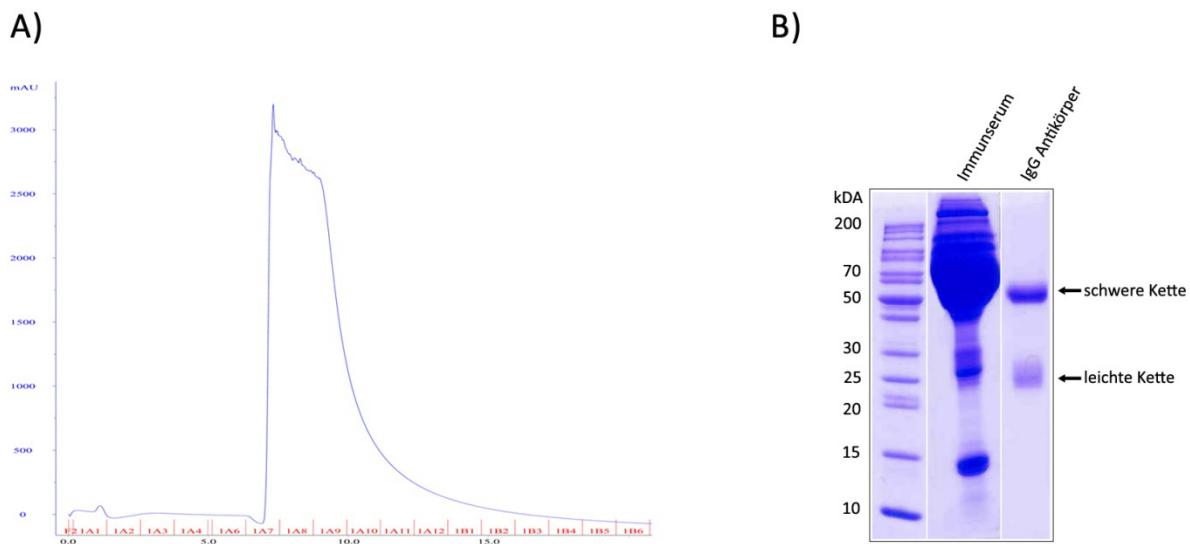


Abbildung 5 Aufreinigung der Argonaute-Antikörper. A) Verlauf der Elution des Argonaute-Antikörpers über die Protein G-Säule. 25 ml Ago-spezifisches Immunserum wurden in die Säule injiziert. Diese wurde mit Bindespuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0) gewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen von je 1,2 ml mit Glycin-Puffer, pH 2,7. Die y-Achse zeigte die relative Absorption bei 280 nm. Auf der x-Achse war das Volumen des Elutionspuffers zu sehen. Die Elution des Antikörpers erfolgte in den Fraktionen 1A7-1A10. B) SDS-PAA-Gele nach Reinigung der Antikörper. Je 1 µl des jeweiligen Immunserums (1:3 verdünnt) und 1 µl der IgG-Fraktion wurden nach der Reinigung aufgetragen. Standard Protein Ladder Unstained (SM0661).

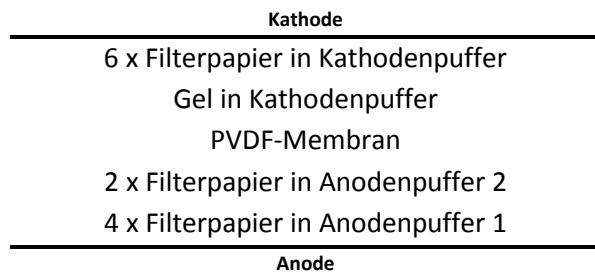
10.3. Western-Blot

Proteine aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen wurden bei dieser Methode auf PVDF-Membranen (Imobilon-P, Millipore, Bedford, USA) transferiert. Dies erfolgte mittels Elektroblot in einer Semi-Dry-Apparatur (Trans Blot SD Trans Blot, Bio-Rad, München; 60 min bei 2 mA/cm^2) oder einer Tank-Blot-Apparatur (Mini-Trans Blot, Bio-Rad, München; ü.N. bei konstant 30 V, max. 90 mA, 4 °C) in einem kontinuierlichen Puffersystem (25 mM Tris / HCl, 192 mM Glycin, 20 % MeOH (v/v), pH 8,3; (Towbin *et al.*, 1979)). Ob die Transformation erfolgreich war, konnte mit Hilfe einer PonceauS-Lösung festgestellt werden. Die Proteine wurden dadurch auf der Membran sichtbar. Anschließend konnte die Membran mit TBS-T wieder entfärbt werden.

Puffer für den Semy-Dry-Blot:

	Anodenpuffer 1	Anodenpuffer 2	Kathodenpuffer
Tris / HCl	0,3 M	25 mM	25 mM
Methanol	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
ε-Aminocapronsäure	---	---	45 mM
pH-Wert	pH 10,4	pH 10,4	pH 9,4

Schematischer Aufbau der Apparatur:



10.4. Immundetektion

TBS-Puffer (10x)		TBS-T-Puffer (1x)	
Tris, pH 7,5	0,5 M	TBS-Puffer (10x)	100 ml
NaCl	1,5 M	Tween 20	200 µl
		H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml

Die Membran wurde nach kurzem Schwenken in 1x TBS-T über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung (1 x TBS-T, 5 % Milchpulver (w/v)) inkubiert.

Nach der Blockierung über Nacht wurde die Blockierungslösung abgegossen und es erfolgte eine Inkubation der Membran für 1 h in 10 ml frischer Blockierungslösung, die mit dem jeweiligen primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung versetzt wurde. Danach wurde die Membran 3x mit TBS-T und 1x mit Blockierungslösung für 10 bis 15 min gewaschen und es folgte eine weitere Inkubation für 1 h mit Blockierungslösung. Zu dieser Lösung wurde der sekundäre Antikörper in der Verdünnung 1:7500 zugegeben. Als sekundärer Antikörper wurde die goat anti-rabbit IgG + HR Peroxidase (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen) verwendet. Nach 4x Waschen in TBS-T (jeweils 15 Minuten) konnte die Detektion der Proteine auf der Membran auf zwei verschiedene Arten geschehen: 1) Der Waschpuffer wurde entfernt und die Membran mit je 2 bis 3 ml POD-Substrat, präzipitierend überschichtet und im Dunkeln inkubiert. Nach Ende der Farbreaktion nach ca. 15 min wurde die Membran mit H₂O_{Millipore} gewaschen und dokumentiert. Die Membran konnte im Dunkeln aufbewahrt werden; 2) Nach Entfernen des Waschpuffers wurden die Membran in Lumi-Light Western-Blotting Substrat nach Angaben des Herstellers entwickelt und umgehend am Phosphorimager Fuji LAS- 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) ausgewertet. Hierzu verwendete man das Programm AIDA Image Analyzer v.3.28 Software (Raytest, Straubenhardt). Für die Kennzeichnung des Molekulargewichtsstandards benutzte man einen Lumineszenzstift.

11. Co-Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation (IP) ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Der Nachweis der Protein-Interaktion erfolgt bei einer IP *in vitro*, indem mit Hilfe eines Antikörpers ein bestimmtes Protein samt Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert wird. Den Interaktionspartner stellten in unserem Falle die

Nukleinsäuren dar, welche mit dem Ago Protein interagierten. Für die IP wurde das Dynabeads® Protein G Immunoprecipitation Kit (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Protein G ist hierbei an magnetische Dynabeads® gekoppelt und bindet den Antikörper. Das Antigen präzipitiert anschließend am Antikörper und kann nach mehreren Waschschritten eluiert werden.

50 µl (1,5 mg) Dynabeads® Protein G wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Mit Hilfe eines Magneten wurden die Beads von der Lösung getrennt, in welcher sie aufbewahrt wurden. 1 – 10 µg Antikörper wurden 200 µl PBS-T-Puffer (1 x PBS+Tween®-20) zugegeben und den Beads beigefügt. Die Beads wurden in dieser Lösung 10 Minuten bei RT leicht geschüttelt. Der Überstand wird anschließend mit Hilfe eines Magneten entfernt und die Beads in 200 µl PBS-T gewaschen. Nach erneutem Entfernen des Überstands konnte das Antigen, in diesem Fall der *Pyrococcus furiosus* Zellextrakt, zugegeben werden. Um eine Bindung des Antigens an den Antikörper sicherzustellen wurde der Ansatz über Nacht bei 4 °C leicht geschüttelt. Am nächsten Tag konnte dann mittels eines Magneten der Überstand bzw. Zellextrakt abgenommen werden. Die Beads wurden anschließend dreimal in Washing Buffer (Citronensäure-Phosphatpuffer, pH 5,0) gewaschen. Der Dynabeads®-Antikörper-Antigen-Komplex wurde in 100 µl Washing Buffer suspendiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nachdem der Überstand mit Hilfe eines Magneten abgenommen wurde, erfolgte die Elution des Antikörper-Antigen-Komplex durch Zugabe von 20 µl Elutionspuffer (0,1 M Citrat, pH 5,0) und 2 minütiger Inkubation bei RT. Der Überstand, welcher den Komplex beinhaltet, wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt.

12. Analyse der Immunpräzipitate durch Western-Blot-Analysen

Für die Western-Blot-Analysen der Immunpräzipitate erfolgte die Immunpräzipitation wie in II. 11. beschrieben. Nach dem Elutionsschritt wurde die Probe mit Laemmli-Auftragspuffer (5x) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Nach dem Auftragen auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran (II. 10.3.). Die Membran wurde blockiert und der Argonaute-Antikörper als primärer Antikörper zugegeben. Nach mehreren Waschschritten und der Zugabe des sekundären Antikörpers Dylight 649 goat anti-rabbit IgG (Thermo Scientific) konnte das Ergebnis des Western-Blots am Phosphorimager Fuji LAS- 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) ausgewertet werden.

13. Klonierung von small RNA

13.1. Barcodes und Adaptoren für small RNA Sequencing

Sequenzen der flankierende Adaptoren:

3'-Adaptor 5'-AAAAAAATGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-3'

5'-Adaptor 5'-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC-3'

Nach der Ligation beider Adaptoren (die Adenylierung des 3'-Adaptors wird bei der Ligation wieder entfernt):

5`-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC-**INSERT**- TGGAATTCTGGGTGCCAAGG-3`

Primer für die Vervollständigung des Produktes inkl. Index-Sequenzen mittels PCR:

Forward Primer 5`-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA-3`

Reverse Primer 5`-AACTCCAGTCAC-#####-ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTT-3`

Upstream von small RNA-Insert-Sequenz:

5`-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CGTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC-**INSERT(...)**
3`-GGACTATGCCGCTGGTGGCTCTAGATGAGCAAGTCTCAAGATGTCAGGCTGCTAG-**insert(...)**

Downstream von small RNA-Insert-Sequenz:

(...)**Insert**-

TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC#####ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTT-3`

(...)**insert**-

ACCTTAAGAGCCCACGGTCCCTGAGGTCAGTG#####TAGAGCATACGGCAGAACGAAAC-5`

Als Index-Sequenz wurde folgende Abfolge gewählt:

5` - **CAGATC** – 3`

13.2. Klonierung und Aufreinigung von small RNAs

Um small RNAs sequenzieren zu können, mussten diese mit Adaptoren versehen, in cDNA umgeschrieben und über PCR vervielfältigt werden (Abb. 6). Anschließend erfolgten eine Aufreinigung und die Sequenzierung mit einem Illumina Sequenzer.

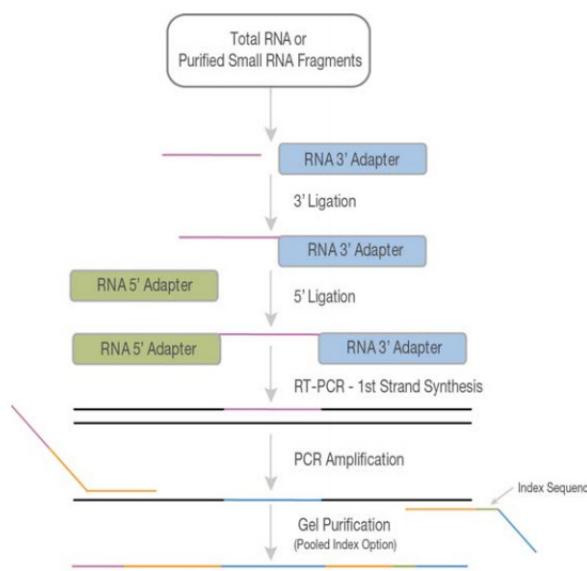


Abbildung 6 Klonierung von sRNA. Nach der Ligation der Adapter erfolgte die cDNA Synthese. Nach einer Vervielfältigung durch PCR und der Aufreinigung der klonierten sRNA kann diese sequenziert werden.

13.2.1. Ligation des 3`-Adaptors

Die sRNA wurde mit 3`-Adaptoren ligiert. Hierzu verwendete man eine trunkierte RNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt). Diese arbeitet ATP unabhängig und benötigt zur Ligation prä-adenylierte Adaptoren.

Isolierte RNA (aus einem Co-IP-Ansatz)	x µl
Ligation Puffer (10 x)	2,0 µl
DMSO (100%)	3,0 µl
3`-adenylierter Adapter (10 mM)	1,0 µl
	20 µl

Ligation Puffer (10 x)	
Tris pH 7,6	0,5 M
MgCl ₂	0,1 M
β-Mercaptoethanol	0,1 M
BSA	0,1 % (w/v)

Die Probe wurden erhitzt (30 sec / 90 °C) und 2 µl trunkierter RNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) zugegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert und die Ligase abschließend 10 min bei 65 °C inaktiviert.

13.2.2. Ligation des 5`-Adaptors

Folgende Komponenten wurden zum vorherigen Ligationsansatz zugegeben.

DMSO (100 %)	3,0 µl
Ligation Puffer (10 x)	2,0 µl
ATP (100 mM)	0,4 µl
5`-Adapter (RNA Oligo 10 mM)	1,0 µl
H ₂ O _{Millipore}	11,6 µl
	18 µl

Dieser Ansatz wurde 30 Sekunden auf 90 °C erhitzt. Nach Zugabe von 2 µl T4 RNA Ligase 1 (NEB) erfolgte ein Inkubationsschritt von 1 h bei 37°C. Anschließend wurde der Ligationsansatz auf Eis gestellt.

13.2.3. cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das SuperScriptIII Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Folgender Ansatz wurde pipettiert.

RNA Ligaseansatz	6 µl
Reverse Transkriptase Primer (100 µM)	1 µl
Annealing Buffer (Kit)	1 µl

Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 65 °C im Thermocycler (Mastercycler Personal Model 5332, Eppendorf) inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2x First-Strand Mix (10 µl) und SSIII/RNaseOut (2 µl) wurde kurz gevortext und der Ansatz für 50 Minuten auf 50 °C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der SSIII/RNaseOut durch Erhitzen auf 85 °C (5 Minuten).

13.2.4. Vervielfältigung der cDNA durch Pilot-PCR

Die Pilot PCR diente dazu, die bisherigen Klonierungsschritte zu überprüfen und um eine optimale Zyklenzahl für die Scale up PCR zu ermitteln.

cDNA	1,0 µl
Primer forward (10 µM)	0,2 µl
Primer reverse (10 µM)	0,2 µl
dNTPs (10 mM)	0,25 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	0,1 µl
Phusion HF Buffer (5 x)	2,0 µl
H ₂ O _{Millipore}	6,25 µl
	10,0 µl

Folgendes PCR-Programm wurde gewählt:

Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
98	60	1
98	10	
60	30	20
72	15	
72	600	1
4	∞	1

Nach der PCR wurde die Probe mit 10 µl Marker (DNA PAGE Ruler Ultra Low Range) und 2 µl Phusion HF Buffer (5 x) vermischt und auf ein 6 %iges Polyacrylamid-Gel (SequaGel, National Diagnostics, Atlanta, USA) aufgetragen. Der Gelauf erfolgte für 2,5 Stunden bei 400 V in 1 x TBE Buffer. Nach dem Anfärben des Gels mit EtBr und der weiteren Analyse mit der Geldokumentationsanlage wurde die erfolgreiche Klonierung verifiziert und die Zyklenzahl für die Scale up PCR je nach Stärke der Banden eingestellt.

13.2.5. Scale up PCR

Mit Hilfe der Scale up PCR wurde die cDNA in größerem Maßstab vervielfältigt. Die Erkenntnisse der Pilot PCR (II. 13.2.4.) wurden hierbei mit eingebbracht.

cDNA	10,0 µl
Primer forward (10 µM)	1,0 µl
Primer reverse (10 µM)	1,0 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
Phusion HF Buffer (5 x)	10,0 µl
H ₂ O _{Millipore}	26,25 µl
	50 µl

Als Programm für die PCR wurde das unter 13.2.4. bereits erwähnte Pilot PCR-Programm gewählt. Die Anzahl der Zyklen lag aufgrund der Erkenntnisse der Pilot PCR bei 20 Zyklen.

Die Probe wurde auf ein 6 %iges Polyacrylamid-Gel (SequaGel, National Diagnostics, Atlanta, USA) aufgetragen und nach der Auftrennung entsprechende Banden ausgeschnitten.

13.2.6. Aufreinigung der klonierten small RNA

Die klonierte sRNA musste noch aus den ausgeschnittenen Banden des Polyacrylamid-Gels aufgereinigt werden. Hierzu wurde in den Boden eines 0,5 ml Eppendorfcups mittels einer dünnen Nadel (z.B. Neolus 21 G, 0,8 mm) ein Loch gebohrt. Die ausgeschnittene Gelbande wurde in das präparierte Cup gegeben und beides in ein 1,5 ml Eppendorfcup gesteckt. Der anschließende Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 3 Minuten) beider Eppendorfgefäße führte zu einem Schreddern der Gelstücke. Nachdem das kleine Cup entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 150 µl Elution Buffer (300 mM NaCl, 2 mM EDTA). Um die klonierte small RNA aus den Gelstücken gewinnen zu können, wurde dieser Ansatz über Nacht bei 25 °C schüttelnd (800-1000 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag konnte das Eluat von den Gelstücken getrennt und über eine Corning®Costar®Spin-X®Plastic Centrifuge Säule (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen) aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte laut den Herstellerangaben. Nach der Aufreinigung wurde eine Ethanolfällung (II. 5.3.) durchgeführt.

Die Proben wurden in das KFB Regensburg (Biopark) geschickt und mit einem Illumina Sequenzierer sequenziert. Im KFB wurden vor dem Sequenziervorgang mittels Bioanalyzer Läufen und qPCRs Qualitätsanalysen der einzelnen Proben durchgeführt.

Bei der Sequenzierung wurde eine Leselänge von 50 Nukleotiden gewählt.

14. Bioinformatische Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken und Algorithmen zur Auswertung von Protein- und Nukleinsäuresequenzen verwendet. Die dabei benutzten Programme sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Datenbank/Anwendung	Referenz
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UCSC Archaeal Genome Browser	http://www.archaea.ucsc.edu/
CLUSTALW Multiple Sequence Alignment	http://www.genome.jp/tools/clustalw/
Galaxy	https://usegalaxy.org
Multiple Sequence Alignment ClustalW2	http://www.simgene.com/ClustalW

15. MALDI-TOF MS/MS

Im Vorfeld der MALDI-TOF MS/MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) wurden die zu analysierenden Proteine mittels Trypsin im Gel verdaut. Hierzu wurden die entsprechenden Proteinproben elektrophoretisch aufgetrennt, dass SDS-Gel mit Coomassie gefärbt, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gewaschen (über Nacht) und die passenden Proteinbanden durch Ausschneiden isoliert. Die Volumina der ausgeschnittenen Gelfragmente wurde durch Wiegen bestimmt und diese in kleine Würfel (Kantenlänge ca. 1 – 1,5 mm) geschnitten. Dadurch konnte die Reaktionsoberfläche für weitere Behandlungen vergrößert werden. Die Gelwürfel wurden in 2 ml Eppendorfcups gegeben und unter leichtem Schütteln für jeweils 30 Minuten in 700 μl der folgenden Lösungen gewaschen:

- 1) 50 mM NH_4HCO_3
- 2) 50 mM NH_4HCO_3 , 25 % (v/v) Acetonitril (ACN)
- 3) 25 % (v/v) ACN
- 4) 50 % (v/v) ACN

Die Gelwürfel wurden anschließend in ein 0,5 ml Eppendorf-Cup überführt und für mindestens 1 h bis zur Trockene lyophilisiert (Lyophilie: Typ Alpha 1-4; Christ, Osterode). Die lyophilisierten Gelwürfel wurden für den proteolytischen Verdau mit Trypsin-Lösung versetzt. Das Trypsin wurde nach Herstellerangaben in 1 mM HCl gelöst und auf eine Konzentration von 25 μg / 100 μl eingestellt. Die Gelwürfel wurden für 5 min in der noch inaktiven, sauren Trypsin-Lösung inkubiert (2 μg Trypsin / 100 μl Gelvolumen). Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mittels 100 mM NH_4HCO_3 auf pH 8 – 8,5 eingestellt, was eine Aktivierung des Trypsins zur Folge hatte. Die Proteine wurden unter leichtem Schütteln für 2 h bis 18 h bei 37 °C verdaut.

Nach dem Verdau erfolgte die Extraktion der gewonnenen Peptide aus den Gelwürfeln. Der Überstand des Trypsinverdaus wurde abgenommen und die Gelwürfel für jeweils 1 – 2 h zweimal mit je 30 µl 100 mM NH₄HCO₃ sowie einmal mit einem Gemisch aus 100 mM NH₄HCO₃ und 25 % ACN bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit dem vorher abgenommenen Überstand des Trypsinverdaus vereinigt und bis zur Trockene lyophilisiert. Die anschließende massenspektroskopische Analyse der gewonnenen Peptide und deren Identifikation wurde von Eduard Hochmuth am Institut für Biochemie der Universität Regensburg am Labor von Prof. Dr. Deutzmann an einem 4700 Proteomics MALDI-TOF MS/MS-Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

16. Northern-Blot

Denhardt's Solution (50 x)	
Albumin Fraction V	1 %
PolyvinylpyrrolidonK30	1 %
Ficoll 400	1 %

SSC (20 x), pH 7,0	
NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M

Waschpuffer I	
SSC (20 x)	25 % (v/v)
SDS (10 %)	10 % (v/v)

Waschpuffer I	
SSC (20 x)	5 % (v/v)
SDS (10 %)	10 % (v/v)

Hybridisierungslösung	
SSC (20 x)	12,5 ml
SDS (10 %)	35 ml
Denhardt's Solution(50 x)	1 ml
Na ₂ HPO ₄ (1 M)	1 ml

EDC Crosslinking Lösung (pro Membran)	
Methylimidazol	61,25 µl
HCl (1 M)	75 µl
EDC	0,18825 g
H ₂ O Millipore	ad 6 ml

RNA sample loading buffer	
Formamid	99,95 % (v/v)
Xylencyanid	0,025 % (w/v)
Bromphenolblau	0,025 % (w/v)

Die unter 4.2. aufgezählten Sonden für Northern-Blot wurden mit dem Isotop [γ -³²P]-ATP wie unter II. 5.10. bereits erwähnt radioaktiv markiert. Als Nukleinsäure wurde jeweils 1 µl einer 10 mM konzentrierten Sonde eingesetzt. Nach der Markierung wurde die PNK durch Zugabe von 30 µl EDTA (30 mM) inaktiviert. Anschließend erfolgte PNK eine Aufreinigung mittels Bio-Rad *Micro-spin 6 Chromatographie Column*. Die Sonden waren für Northern-Blot-Analysen bereit.

Für Northern-Blot-Analysen wurden zwischen 10 du 30 µg an Gesamt-RNA eingesetzt.

Die Proben wurden auf ein PAA-Gel aufgetragen (in RNA sample loading buffer gelöst). Zur Herstellung des PAA-Gels wurde das SequaGel UreaGel System (National Diagnostics, Atlanta, USA) benutzt und laut Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden auf 7 – 8 cm (300 V, ca. 1 h) getrennt und mit EtBr gefärbt. Anschließend konnte das Gel in der Geldokumentationsanlage kontrolliert werden.

Das Gel wurde auf drei mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ angefeuchteten und zurechtgeschnittenen Whatman Papier Stücken in die Northern-Blot-Kammer gelegt. Als Blot-Kammer wurde die Semi-Dry-Apparatur (Trans Blot SD Trans Blot, Bio-Rad, München) verwendet. Die positiv geladene Membran (Nylon Membranes positively charged, Roche, Karlsruhe) wird durch kurzes Schwenken in MeOH aktiviert, auf das Gel gelegt und mit drei angefeuchteten Whatman Papieren bedeckt. Die Übertragung der RNA auf die Membran erfolgte für 30 Minuten bei 20 V. Während des Blotting-Vorgangs wurde das EDC-Gemisch zum Crosslinking der RNA vorbereitet. Nach dem Blotting-Vorgang wurde die Membran zusammen mit dem EDC-Gemisch 1 Stunde bei 50 °C erhitzt. Die Membran wurde nach zweimaligem Waschen und anschließendem Trocknen mit 20 ml Hybridisierungslösung für 1 h bei 50 °C inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde 15 Minuten später zugegeben und über Nacht bei 50 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer I und einmal mit Waschpuffer II für jeweils 15 Minuten gewaschen und zur Belichtung eines Phosphoimager Screens (Fujifilm, Düsseldorf) in eine Belichtungshülle für mehrere Stunden aufbewahrt.

Nach der Belichtungszeit wurde der Screen am Phosphorimager Fuji LAS- 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) gescannt.

Um die geblottete Membran zusätzlich für andere Sonden verwenden zu können, wurde diese in 0,1 %iger SDS-Lösung kurz aufgekocht und für 30 Minuten geschüttelt. Die Sonde wurde somit entfernt und die Membran konnte für weitere Northern-Blot-Experimente eingesetzt werden.

17. Protein/Nukleinsäure-EMSA und Protein/Nukleinsäure-Verdau

17.1. Analyse der Nukleinsäure-Protein-Bindungsaktivität mit Hilfe von EMSA-Versuchen

Die Bindungsaktivität des Argonaute Proteins aus *P. furiosus* wurde durch *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) überprüft. Dieser Assay stellt eine Affinitätselektrophorese dar und dient dazu, mögliche Interaktionen zwischen Protein und Nukleinsäure im nativen Gel darzustellen. Bildet sich ein Protein-Nukleinsäure-Komplex tritt dadurch eine Laufweitenverschiebung ein und der Komplex wandert langsamer ins Gel als die ungebundene Nukleinsäure.

Gel-Shift Bindepuffer (5x)	
Tris pH 8,0	50 mM
KCl	250 mM
DTT	15 mM
EDTA	2,5 mM

Es wurde ein Reaktionsansatz von 20 µl angesetzt, welcher neben dem Gel-Shift Bindepuffer, dem Argonaute Protein (50-100 ng), radioaktiv markierter Nukleinsäure (~0,5 ng, Markierung siehe II. 5.10) auch noch nichtspezifische Kompetitor-DNA (~500 ng) enthielt. Hierbei handelte es sich um poly dI-dC oder Salmon Sperm DNA. Diese Kompetitor-DNA verhindert Signale auf dem nativen Gel, welche durch unspezifische Bindung zwischen Protein und markierter Nukleinsäure entstehen können. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gegebenenfalls für eine Minute auf 50° C erhitzt und anschließend auf einem nativen Gel analysiert (II. 9.3.2.). Nach dem Lauf wurde das Gel getrocknet und ein Phosphoimager Screen (Fujifilm, Düsseldorf) aufgelegt, welcher am Tag darauf ausgelesen werden konnte.

17.2. Untersuchung der Nukleinsäure-Protein-Schneideaktivität mittels EMSA-Methode

Ebenso wie unter II. 17.1. beschrieben, kann auch die Schneide- bzw. Nukleaseaktivität des Argonaute Proteins mit Hilfe eines EMSA untersucht werden. Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt neben dem Gel-Shift Bindepuffer (ohne EDTA), dem Argonaute Protein und der radioaktiv markierten Nukleinsäure zusätzlich noch 5mM MgCl₂. Der Reaktionsansatz wurde 15 Minuten bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Stopplösung (1 M Tris (ph 7,2), 8 M Harnstoff) gestoppt. Die Probe wurde auf einem nativen Gel analysiert. Nach der Trocknung des fertigen Gels und der anschließenden Auflegung des Screens konnte dieser am Phosphoimager ausgelesen werden.

18. Argonaute Knock-out Untersuchungen

18.1. Herstellung von pUC19-ΔPF0537::Tk-SimR zum Knock-out des Genabschnitts PF0537

Um zu analysieren, welche Auswirkung ein Knock-out des Argonaute Proteins in *Archaeen* nach sich zieht, musste der Stamm *P. furiosus* ΔPF057 erzeugt werden. Dazu sollte das Gen PF0537, welches für das Pf-Argonaute codiert, durch die Simvastatin-Resistenzkassette ersetzt und somit deletiert werden. Diese Resistenzkassette bestand aus *Tk* gdh Promotor, *Tk* HMG-CoA Reduktase und *Tk* gdh Terminator aus *T. kodakarensis*.



Abbildung 7 Resistenzkassette zur Deletion des Genabschnitts PF0537 und die zur Amplifikation verwendeten Primer SimR_Prom1_F sowie SimR_Term2_R. Sämtliche Bestandteile wurden aus *T. kodakarensis* amplifiziert. Die Resistenzkassette hatte eine Gesamtlänge von ca. 1,6 kbp.

Um eine nachfolgende Selektion der Transformanten zu ermöglichen, sollte das Gen PF0537 durch die Resistenzkassette ersetzt werden (Abb. 7). Durch den Einbau dieser Kassette in die gDNA von *P. furiosus* erreichte man eine Überexpression der HMG-CoA-Reduktase, welche wiederum zu einer Resistenz gegen das Antibiotika Simvastatin führt. Für diesen gezielten Austausch wurden flankierende Regionen des Gens PF0537 sowohl von *upstream* wie auch *downstream* aus der gDNA von *P. furiosus* amplifiziert und mit der Resistenzkassette fusioniert. Der Ablauf der Fusion mittels Fusion-PCR wurde unter II. 5.1.2. detailliert beschrieben.

Zur Amplifikation der flankierenden Bereiche aus der gDNA von *P. furiosus* wurden folgende Primer verwendet. Die *Extension*-Zeit wurde laut Herstellerangaben gewählt.

Sequenzen	Primer-Paar	Annealing-Temperatur
PF0537_up (~700 bp)	rightPF0536EcoRV	60 °C
	leftPF0536	
PF0537_do (~600 bp)	rightPF0538	60 °C
	leftPF0538EcoRV	

Zur Amplifikation der Resistenzkassette *Tk*-SimR wurden folgende Primer verwendet. Die Resistenzkassette bestand aus *Tk* gdh Promotor, *Tk* HMG-CoA Reduktase und *Tk* gdh Terminator. Als Template diente das Plasmid pMUR41. Das Plasmid wurde ohne vorherige Linearisierung in die PCR eingesetzt. Die *Extension*-Zeit wurde laut Herstellerangaben gewählt.

Sequenzen	Primer-Paar	Annealing-Temperatur
<i>Tk</i> SimR (~1600 bp)	SimR-Prom1-F	60 °C
	SimR-Term2-R	

Zur Aufreinigung wurden jeweils 25 µl der entsprechenden PCR-Ansätze über ein horizontales Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und anschließend einer Gelextraktion unterzogen. Dazu wurde das Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Nukleinsäurekonzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Zur Fusion der einzelnen DNA-Fragmente wurden jeweils äquimolare Mengen der entsprechenden Fragmente eingesetzt. Grundlage hierfür bietet das kürzere Fragment, wovon jeweils 10 ng eingesetzt wurden.

Fusioniertes Fragment	Primer-Paar	Annealing-Temperatur
PF0537_do (~600 bp)	leftPF0538EcoRV	59 °C
<i>Tk</i> -SimR (~1600 bp)	SimR-Term2-R	

Nach der ersten Fusions-PCR und erfolgter Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel erfolgte eine weitere Fusions-PCR. Dadurch wurde das erste Fusionsprodukt mit Fragment PF0537_up verbunden.

Fusioniertes Fragment	Primer-Paar	Annealing-Temperatur
Fusionsprodukt 1 (~2200 bp)	leftPF0538EcoRV	60 °C
PF0537_up (~700 bp)	rightPF0536EcoRV	

Durch die Fusion des Fusionsprodukt 1 mit PF0537_up entstand das Endprodukt mit einer Gesamtlänge von ~2900 bp. Dieses Produkt wurde über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und dessen Konzentration anschließend photometrisch ermittelt.

Zur identischen Vervielfältigung des Konstrukts erfolgte eine Klonierung in *E. coli*. Hierzu wurde der Plasmidvektor pUC19 zu Hilfe genommen. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *Sma*I hydrolysiert. Dieses Enzym verursacht blunt-ends. Da an den beiden Enden des fusionierten Gesamtfragments *EcoRV*-Schnittstellen eingebaut wurden, welche ebenfalls blunt ends erzeugen, war dies für die Ligation des Vektors mit dem Insert vorteilhaft. *Sma*I schneidet den Vektor an genau einer Stelle. Um eine Religation zu verhindern, musste der linearisierte Vektor nach der Hydrolyse an den Enden dephosphoryliert werden. Verwendet wurde dazu die *calf intestine alkaline phosphatase* (CIP). Die Dephosphorylierung erfolgte für 1 h bei 37 °C. Der geschnittene Vektor wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Das konstruierte Insert wurde mit *EcoRV* laut Herstellerangaben hydrolysiert und über präparative Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt.

Die beiden geschnittenen DNA-Fragmente wurden im Anschluss 2 h bei Raumtemperatur ligiert (II. 5.9.). Die Transformation erfolgte in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen. Um die Selektion der positiven Ligationsprodukte zu erleichtern, wurde eine Blau-Weiß-Selektion (II. 3.4.) angewandt. Nach der Inkubation der transformierten DH5α-Zellen auf LB_{Amp}-Platten (+IPTG/+X-Gal) über Nacht bei 37 °C konnten entsprechende weiße Kolonien gepickt werden. Die Verifizierung der Ligation und Plasmidaufnahme erfolgte über Kolonie PCR (II. 5.1.3.). Positiv getestete Klone wurden in 5 ml LB_{Amp}-Flussigmedium angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von diesen Kulturen erfolgte tags drauf eine Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). Die Konzentration des extrahierten Plasmids wurde photometrisch bestimmt und abschließend durch eine Sequenzanalyse verifiziert.

18.2. Transformation des Knock-out Konstruktes in *P. furiosus*

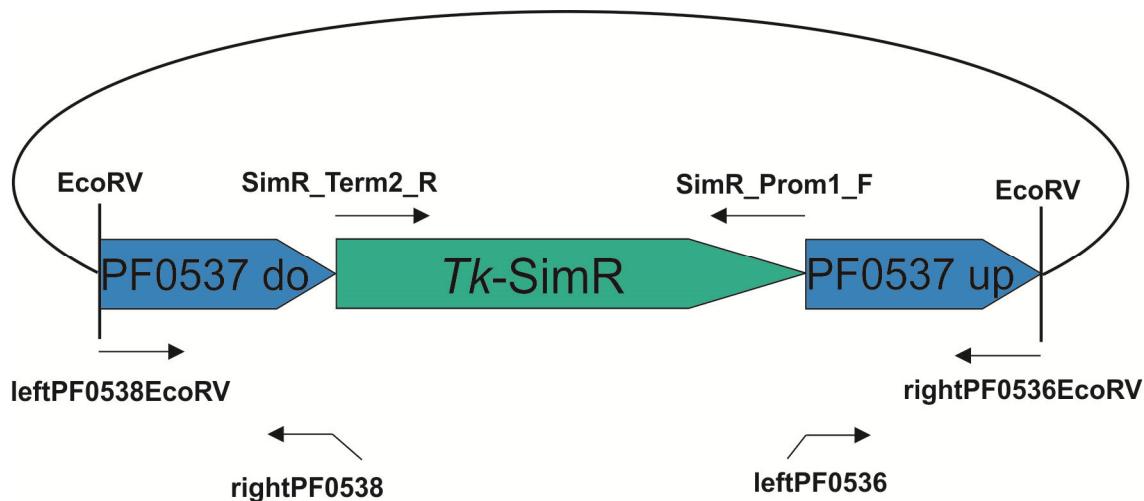


Abbildung 8 Plasmid pUC19- Δ PF0537::Tk-SimR. Gezeigt werden die zur Amplifikation benutzten Primer sowie die zur Fusion eingesetzten Fragmente. Die dazu benutzten Fusionsprimer sind durch einen Überhang gekennzeichnet.

Bevor die Transformation in *P. furiosus* stattfinden konnte, erfolgte zur Überprüfung eine Restriktionshydrolyse des Plasmids pUC19- Δ PF0537::Tk-SimR (Abb. 8) mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *Pvull*. Es wurden diese Restriktionsenzyme gewählt, da diese bei erfolgreicher Hydrolyse des Vektors ein eindeutiges Bandenmuster auf dem Agarosegel ergaben. Nach dieser Überprüfung wurde der Vektor mit *EcoRV* sowie *ApaI* geschnitten. *EcoRV* schnitt an den Enden des zu transformierenden DNA-Fragments wohingegen *ApaI* mehrere Schnittstellen im Vektor vorweisen konnte, wodurch der Vektor in viele kleine DNA-Abschnitte zerlegt wurde.

Im Anschluss wurden parallel mehrere Transformationsansätze mit dem geschnittenen Vektors angesetzt. Die Transformation erfolgte in $\frac{1}{2}$ SME-Vollmedium und wie unter II. 3.8. beschrieben.

III. Ergebnisse

1. LSm-Protein aus *P. furiosus* (PF1542)

1.1. Analytische Gelfiltration des LSm-Proteins durch die Superdex 75 10/300 GL – Säule

Das von mir (während der Diplomarbeit) in *E. coli* exprimierte LSm-Protein aus *P. furiosus* wurde zur Bestimmung der oligomeren Zusammensetzung über Superdex 75 10/300 GL-Säule chromatographisch analysiert. Hierzu wurden Proteine, deren Molekulargewicht bekannt war, auf die Superdex-Säule aufgetragen. Anhand der verschiedenen Elutionsprofile konnte eine Eichgerade erstellt werden, welche später zur möglichst genauen Bestimmung des Molekulargewichts des LSm-Proteinkomplexes genutzt wurde.

Wie in II. 8.3. beschrieben, wurden die Elutionsprofile der Proteine Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Carboanhydrase (23 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa) an der Superdex 75 10/300GL Säule erstellt.

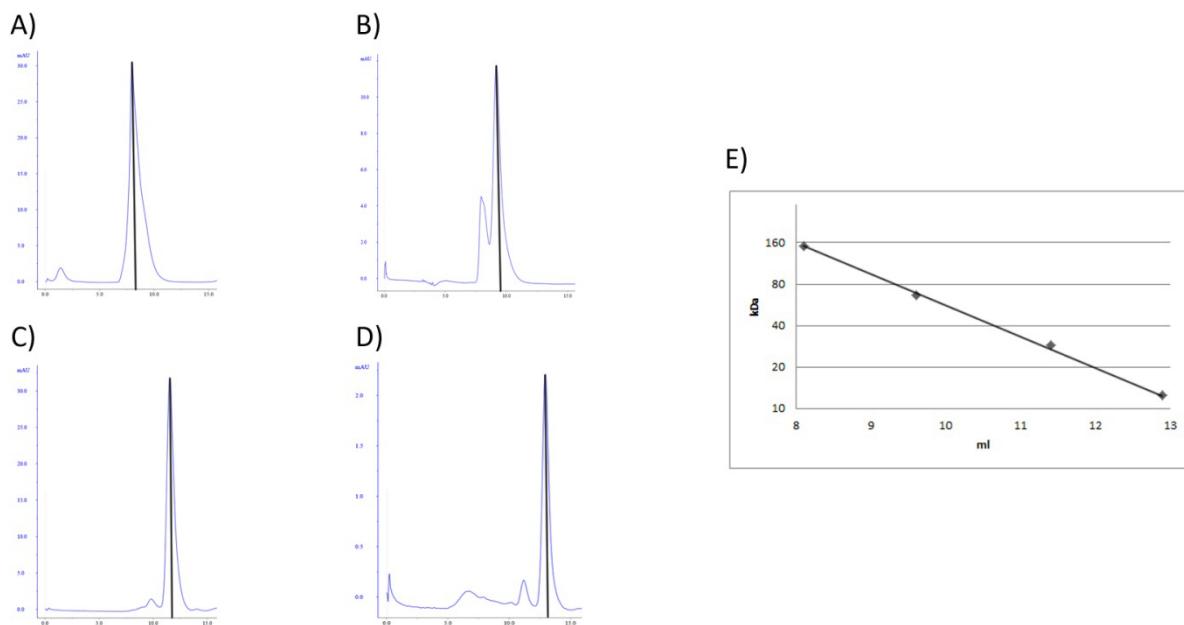


Abbildung 9 Elutionsprofil der verschiedenen Eichproteine sowie die daraus resultierende Eichgerade. Elutionsprofil der Proteine Alkoholdehydrogenase (A), BSA (B), Carboanhydrase (C) und Cytochrom C (D) auf der Superdex 75 10/300 GL Säule. Die y-Achse beschrieb jeweils den UV-Wert in mAU, die x-Achse zeigt die durchgelaufene ml-Menge. Die senkrechte, schwarze Strich symbolisierten das Elutionsvolumina zum jeweiligen Gipfelmaximum an. Die dadurch erhaltene Eichgerade (E) beschrieb in der x-Achse das Elutionsvolumina in ml, in der y-Achse das Molekulargewicht in kDa.

Die Gipfel der jeweiligen Elutionsprofile wurden in Abbildung 9 A-D dargestellt. Die Alkoholdehydrogenase eluierte am Schnellsten (8,1 ml), da dieses Protein mit 150 kDa das größte Peptid darstellte. Es folgte das 66 kDa schwere BSA (9,6 ml) und die Carboanhydrase mit 23 kDa (11,4 ml). Am Längsten benötigte das 12,4 kDa große Cytochrom C um die Säule zu durchqueren (12,9 ml).

Mit Hilfe der Elutionsvolumina und dem Molekulargewicht der Proteine, welches vorher logarithmiert wurde, konnte eine Eichgerade (Abb. 9 E) gebildet werden.

Um dem oligomeren Komplex des LSm-Proteins ein Molekulargewicht zuordnen zu können, musste auch dieses Protein an der Superdex 75 10/300 GL Säule analysiert werden.

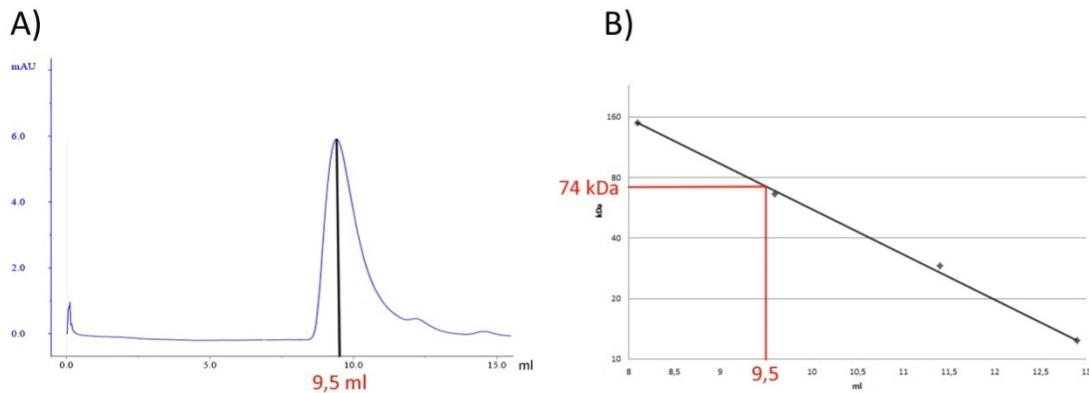


Abbildung 10 Auswertung der Ergebnisse der LSm-Protein Gelfiltration. A) UV-Elutionsprofil des LSm-Proteins an der Superdex 75 10/300 GL Säule. Der Gipfel zeigte bei einem Elutionsvolumen von 9,5 ml sein Maximum. X-Achse Elutionsvolumina in ml, y-Achse UV-Wert in mAU. B) Das erhaltene Elutionsvolumen entsprach auf der Eichgerade einem Molekulargewicht von 74 kDa. X-Achse Elutionsvolumina in ml, y-Achse Molekulargewicht in kDa (logarithmiert).

Das Elutionsprofil des LSm-Proteins aus *P. furiosus* (Abbildung 10 A) zeigte das Verhalten des LSm-Komplexes an der Gelfiltrationssäule. Der Komplex eluierte bzw. zeigte bei 9,5 ml seinen Gipfel. Des Weiteren waren keine zusätzlich relevanten Gipfel in dem UV-Elutionsprofil zu erkennen. Übertrug man dieses Ergebnis auf die vorher erstellte Eichgerade (Abbildung 9 E), so erhielt man für diesen Wert ein geschätztes Molekulargewicht von 74 kDa (Abbildung 10 B). Das LSm-Protein-Monomer verfügte nach der Aufreinigung über ein Molekulargewicht von etwa 10,7 kDa (Protein plus N-terminaler His-Tag). Dies würde bezogen auf das geschätzte Molekulargewicht bedeuten, dass das LSm-Protein einen heptameren Komplex aus sieben LSm-Monomeren bildet und somit als Homoheptamer auftrat.

2. Argonaute-Protein (PF0537)

2.1. Klonierung von PF0537 in pYS3 für Expression in *P. furiosus*

Neben dem LSm-Proteinkomplex war für diese Arbeit das Argonaute-Protein aus *P. furiosus* ein interessantes Forschungsobjekt. Für die Entschlüsselung möglicher Interaktionspartner des Argonaute-Proteins sowie für Interaktions- und Schneideversuche benötigte ich eine aufgereinigte Version des Proteins. Als Organismus für die Expression wurde *P. furiosus* gewählt, da der Genabschnitt seinen Ursprung dort hat und das exprimierte Protein somit über alle Modifikationen verfügt.

Zur rekombinanten Expression des Argonaute-Proteins (PF0537) in *P. furiosus* wurde der Vektor pYS3 (Waege *et al.*, 2010) benutzt. Dieser Vektor war 6740 bp lang und verfügte neben der Simvastatin-

Resistenzkassette über eine Ampicillin-Resistenz. Als Vektorinsert erstellte ich ein DNA-Konstrukt, welches aus Fr-1,6-Bisphosphatase-Promotor und PF0537-Genabschnitt mit Terminator bestand. Die Wahl dieses Promotors hatte den Vorteil einer starken Expression auf einem Medium mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle.

Die beiden Bestandteile des DNA-Konstrukts wurden mittels PCR (II. 5.1.1.) hergestellt. Die Primer wurden wie unter II. 6. beschrieben eingesetzt und das PCR-Produkt anschließend auf einem Agarosegel analysiert. In Abbildung 11 A war das PCR-Produkt *Pf*-Ago+Term zu erkennen (Spur 2). Dieses Produkt hat eine Länge von (~2500 bp) und war auch an dieser Position im Agarosegel zu finden. Neben diesem Teil des Inserts konnte der *fbp*-Promotor in Spur 3 ausfindig gemacht werden. Dieser DNA-Abschnitt hat nach erfolgreicher PCR eine Länge von ~250 bp. Die PCR hatte also in beiden Fällen funktioniert. Beide Banden wurden anschließend ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Anschließend wurde die Nukleinsäuremenge photometrisch bestimmt.

Die beiden PCR-Produkte, *Pf*-Ago+Term und *fbp*-Promotor, mussten nun mit Hilfe einer Fusions-PCR wie unter II. 6. beschrieben verbunden werden. Anschließend wurde das Produkt der Fusions-PCR auf einem Agarosegel analysiert. Nach der Fusions-PCR der beiden DNA-Moleküle konnte man auf dem Agarosegel das Fusionsprodukt auf einer Höhe von ~2750 bp finden (Abb. 11 B, Spur 2). Neben dem Fusionsprodukt war noch eine Bande bei ~250 bp zu erkennen. Hierbei handelte es sich um den *fbp*-Promotor, einem Nebenprodukt der PCR. Die obere Bande wurde ausgeschnitten, mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die Nukleinsäuremenge photometrisch bestimmt.

Das Fusionsprodukt wurde anschließend in den Vektor pYS3 kloniert. Hierzu wurden beide Teile mit dem Restriktionsenzym *Pst*I hydrolysiert. Der Vektor erhielt zudem eine Dephosphorylierung mittels *CIP* wodurch eine Religation verhindert werden sollte. Nach dem Restriktionsverdau wurden die geschnittenen DNA-Moleküle auf dem Agarosegel analysiert, ausgeschnitten, aufgereinigt und die DNA-Menge photometrische bestimmt. Die DNA-Fragmente wurden ligiert und in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Nach dem Ausplattieren der Ligationsansätze auf LB_{Amp}-Platten führte man zur Kontrolle mit den Klonen eine Kolonie-PCR durch (Abb. 11 C). Positiv getestete Klonen wurden in LB_{Amp}-Flüssigmedium überführt und nach Inkubation über Nacht erfolgte die Plasmidpräparation. In diesem Fall wurde Klon 1 ausgewählt, da dieser nach der Kolonie PCR ein passendes Signal (Abb. 11 C, Spur 2, Bande auf Höhe von ~2750 bp) auf dem Agarosegel aufwies. Die anschließende Sequenzanalyse des Vektors zeigte, dass das Insert im Vektor fehlerfrei war und die richtige Orientierung hatte.

Der Klon war somit für eine Expression des Argonaute-Proteins in *P. furiosus* bereit. Eine Sicherungskultur dieses Klons und der Plasmidpräparation ist unter dem Namen pMUR272 bei – 80°C hinterlegt.

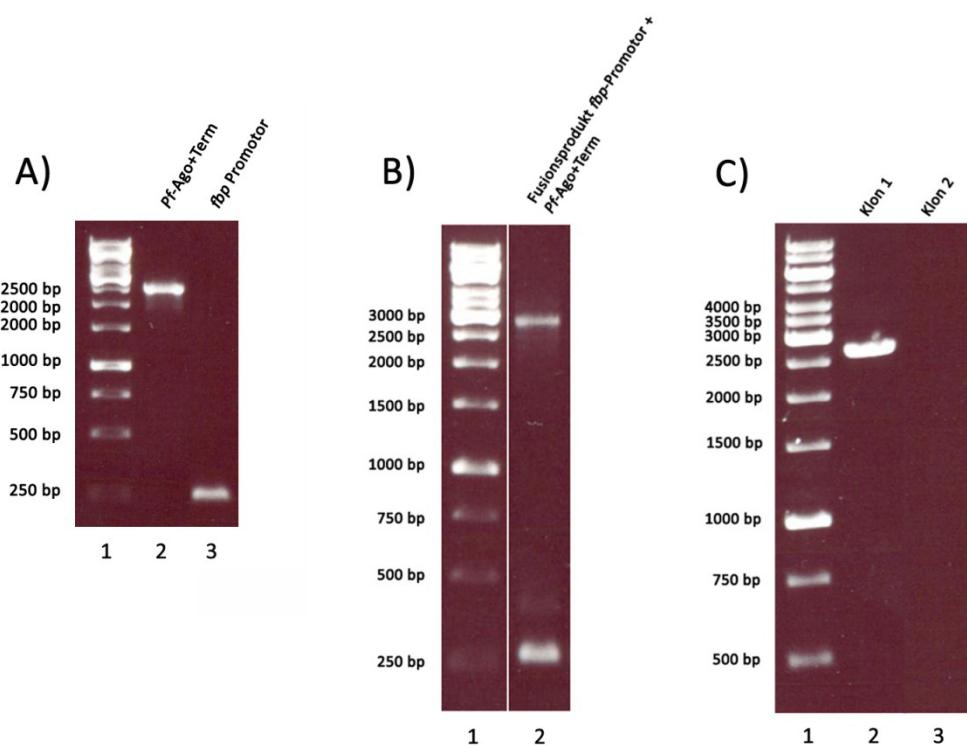


Abbildung 11 A) Herstellung der Komponenten für die Konstruktion des pYS3-Vektorinserts. In Spur 2 befand sich das *Pf-Ago+Term*-Produkt (~2500 bp), in Spur 3 der *fbp*-Promotorbereich (~250 bp). In Spur 1 war der 1 kb DNA Ladder ersichtlich. B) Das Produkt der Fusions-PCR aus den beiden zu fusionierenden DNA-Molekülen *Pf-Ago+Term* und *fbp*-Promotor. Die beiden zu verbindenden Bausteine ergaben zusammen ein Fusionsprodukt von ~2750 bp, welches in Spur 2 des Agarosegels zu sehen war. Bei dem Signal auf Höhe von 250 bp handelt es sich um Nebenprodukte (*fbp*-Promotor), welche bei der Fusions-PCR entstanden. Spur 1 Standard 1 kb DNA ladder. C) Agarosegel mit den Produkten der Kolonie-PCR. Klon 1 in Spur 2 zeigte ein passendes PCR-Produkt von (~2750 bp), wohingegen Spur 3 mit Klon 2 kein positives Ergebnis lieferte. Spur 1 Standard 1 kb DNA ladder.

2.2. Expression und Aufreinigung von *Pf*-Ago in *P. furiosus*

Der zur Expression des Argonaute-Proteins in *P. furiosus* konstruierte Vektor wurde in *P. furiosus* Zellen transformiert und das Protein dort exprimiert (II. 7.3.). Nach dem Zellaufschluss mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung sowie der Benutzung der FastPrep®-24 Zellmühle (II. 7.4.) wurde der

Zellextrakt einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie (II. 8.1.) unterzogen. Das Protein konnte durch den eingebauten His-Tag aufgereinigt werden.

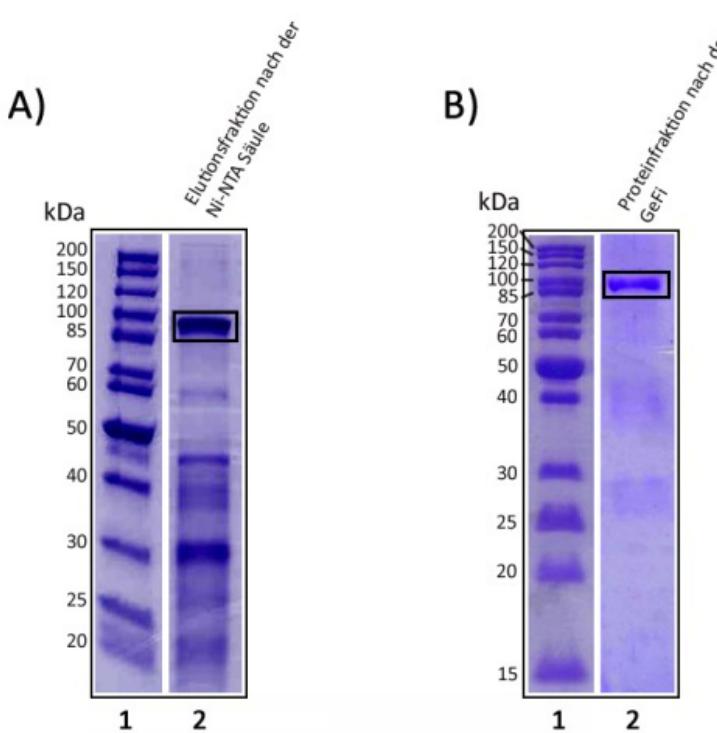


Abbildung 12 SDS-Gradientengel (8 – 20 %) zur Analyse der Elutionsfraktion nach der Ni-NTA Säule sowie nach der Gelfiltration. A) Gradientengel nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Säule. Spur 1 beinhaltete den PageRuler Unstained Protein Ladder (10 – 200 kDa) SM0661, Spur 2 die Elutionsfraktion nach der Ni-NTA Affinitäts-chromatographie. Das Argonaute-Protein wurde im schwarz markierten Bereich vermutet. B) Gradientengel zur Analyse der Proteinfraktion nach der Gelfiltration. Spur 1 zeigte den PageRuler Unstained Protein Ladder (10 – 200 kDa) SM0661, Spur 2 die Fraktion mit dem Argonaute-Protein (schwarze umrandeter Bereich) nach der Chromatographie an der HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Säule.

Nach der Aufreinigung des Proteins musste die Elutionsfraktion auf einem SDS-Gradientengel (8 – 20%) analysiert werden. Diese Fraktion zeigte mehrere Banden, wobei am Stärksten das Signal auf Höhe von 85 – 100 kDa herausstach (Abb. 12 A, Spur 2). Hierbei handelte es sich vermutlich um das Argonaute-Protein mit dem eingebauten N-terminalen His-Tag (schwarz umrandeter Bereich). Neben diesem Signal waren außerdem im Bereich von ~45 kDa sowie ~30 kDa klare Banden zu erkennen. Da die Elutionsfraktion neben dem Ago-Protein noch sehr viel weitere Proteine enthielt, wurde im Anschluss an die Ni-NTA-Affinitätschromatographie noch eine weitere Methode zur Aufreinigung des Proteins durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine Gelfiltrations-Chromatographie (II. 8.2.) mittels HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Säule. Nach dieser Auftrennung der Moleküle nach Größe musste zur Analyse der Proben eine SDS-Gelektrophorese durchgeführt werden.

In der Fraktion nach der Gelfiltration wurde eine deutliche Bande auf Höhe von 85 – 100 kDa gefunden (Abb. 12 B, Spur 2). Hierbei handelte es sich um das Argonaute-Protein aus *P. furiosus* (schwarz umrandeter Bereich). Wie schon in Abbildung 12 A ersichtlich, war auch in dieser Fraktion zwei schwache Signale auf Höhe von ~45 kDa sowie ~30 kDa zu sehen. Diese beiden Banden waren jedoch in Bezug auf die Bandenintensität deutlich schwächer als in der Fraktion nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die restlichen Signale, welche im vorherigen Reinigungsschritt noch auf

dem SDS-Gel zu sehen waren, konnten nun nicht mehr gefunden werden (Abb. 12 B, Spur 2). Dies zeigte, dass die Gelfiltrations-Chromatographie für die Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Argonaute-Proteins aus *P. furiosus* einen wichtigen Schritt darstellte. Das Protein lag nun in einer Form vor, welche weiterführende Experimente wie Dichtegradientenzentrifugation sowie Interaktionsexperimente mit Nukleinsäuren im nativen Gel erlaubte.

2.3. Interaktionspartner von PF0537

2.3.1. Saccharose-Dichtegradient zur Entschlüsselung möglicher Interaktionspartner

Nach der Aufreinigung des Argonaute-Proteins aus *Pyrococcus furiosus* konnte man auf den SDS-Gelen neben dem Signal für das Ago-Protein noch weitere Banden erkennen. Um herauszufinden, ob es sich bei diesen zusätzlichen Proteinen um Interaktionspartner des Argonaute-Proteins handelte, wurde ein Saccharose-Dichtegradient (II. 8.4.) durchgeführt. Als Probe diente das Argonaute-Protein nach der Aufreinigung über die Superdex 200 16/60 Säule.

Das Röhrchen mit der zentrifugierten Probe wurde nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aus der UZ genommen und in den Kühlraum gebracht. Dort wurden vorsichtig jeweils 500 µl Fraktionen abgenommen und diese anschließend geelektrophoretisch auf einem SDS-PAGE

analysiert. Um die einzelnen Banden besser darstellen zu können, wurde nach der Coomassie-Färbung eine Silberfärbung durchgeführt.

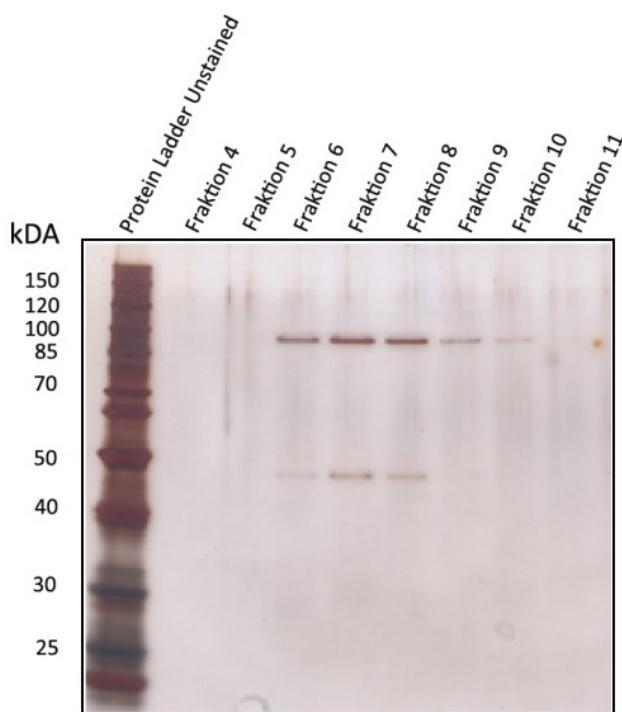


Abbildung 13 SDS-Page mit den Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten. Die obere Bande entsprach dem Argonaute-Protein, die kleinere Bande auf Höhe von ca. 45 kDa entspricht einem möglichen Interaktionspartner. Standard Protein Ladder Unstained (SM0661).

Wie in Abbildung 13 zu sehen, befand sich das Argonaute-Protein in den Fraktionen 6 bis 10, obere Bande. Neben diesem Signal war außerdem noch in den Fraktionen 6, 7 und 8 ein Signal auf Höhe von ca. 45 kDa zu erkennen. Es deutete vieles darauf hin, dass es sich bei diesem Protein um einen Interaktionspartner des Argonaute-Proteins handelte. Die Intensität der Proteinsignale sprach ebenfalls für einen Proteinkomplex. Die Stärke des Signals bzw. die Proteinkonzentration des Argonaute-Proteins war in den Fraktionen 6, 7 und 8 am höchsten. Gleichermaßen galt für das Signal auf Höhe von etwa 45 kDa. Dies war nur in den genannten Fraktionen zu erkennen.

Die Bande auf Höhe von ca. 45 kDa wurde einer massenspektroskopischen Untersuchung unterzogen. Damit konnte ein möglicher Interaktionspartner des Ago-Proteins aus *P. furiosus* entschlüsselt werden.

2.3.2. Massenspektroskopische Identifizierung möglicher Interaktionspartner

Um herauszufinden, welches Protein sich neben Ago in den Proteinfraktionen nach dem Saccharose-Dichtegradienten befand, wurde eine MALDI-TOF MS/MS Analyse durchgeführt. Die einzelnen Schritte zur Vorbereitung der Probe wurden, wie unter II. 15. im Material und Methodenteil beschrieben, realisiert. Die anschließende massenspektroskopische Identifizierung des Peptids im Labor von Prof. Deutzmann ergab, dass es sich bei dem Interaktionspartner um PF1848 handelte. Dieser Genbereich kodiert in *Pyrococcus furiosus* für die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase. Um herauszufinden, welche Aufgabe dieser Interaktionspartner des Ago-Proteins übernimmt, mussten weiterführende Experimente durchgeführt werden. Dazu waren Antikörper gegen das Argonaute-Protein notwendig. Diese wurden mit Hilfe des aufgereinigten Argonaute-Proteins generiert. Um deren Effektivität zu untersuchen, musste der Antikörper in einem Western-Blot-Experiment überprüft werden.

2.4. Test der aufgereinigten Ago-Antikörper mittels Western-Blot

Da der gereinigte Argonaute-Antikörper in Immunpräzipitations-Experimenten eingesetzt werden sollte, wurde dieser durch Western-Blot-Analysen (II. 10.3.) auf mögliche Crossreaktionen mit anderen Proteinen überprüft (Abbildung 14).

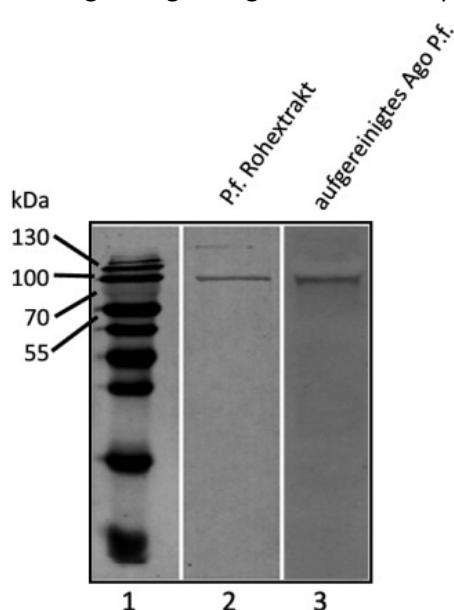


Abbildung 14 Crossreaktionsexperimente mit dem aufgereinigten Argonaute Antikörper im *P.f.* Rohextrakt (Spur 2) und in einer Fraktion des aufgereinigten Argonaute-Proteins aus *P.furiosus* (Spur 3). Standard Protein Ladder Stained (SM0671) in Spur 1.

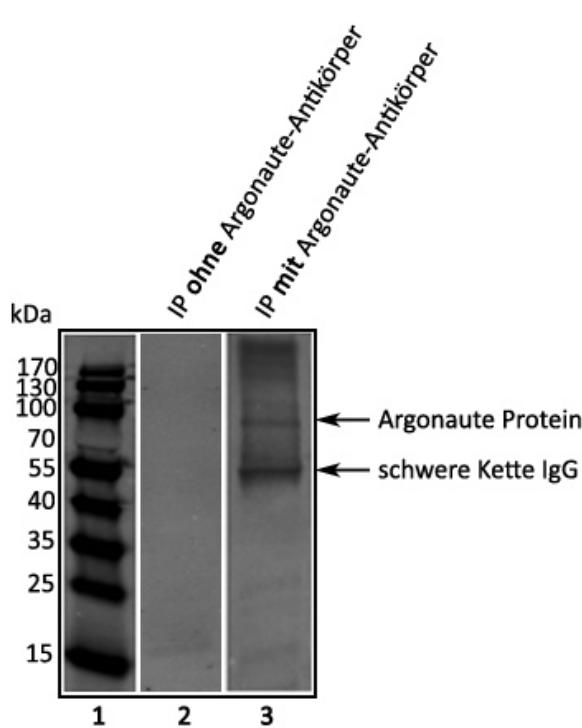
Der Argonaute-spezifische Antikörper zeigte in der Spur mit dem Rohextrakt aus *P. furiosus* ein klares Signal (Abb. 14, Spur 2). Ebenso wurde in der Spur mit dem aufgereinigten Protein aus *P. furiosus* ein einzelnes, klares Signal erhalten (Abb. 14, Spur 3). Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen waren in beiden Spuren nicht erkennbar. Die Intensität des Signals in der Spur des Rohextraktes ist im Vergleich zum Signal des aufgereinigten Proteins leicht schwächer. Bei genauerem Hinsehen jedoch erkannte man, dass in der Spur des aufgereinigten Proteins eine sogenannte „ghost band“ vorlag. Dieses Phänomen tritt ein, wenn die Konzentration des Antikörpers oder/und die Konzentration des

eingesetzten Proteins zu hoch angesetzt werden. Da es sich bei dieser Spur um das aufgereinigte Protein aus *P. furiosus* handelt, lag der Verdacht einer zu hohen Proteinkonzentration nahe.

Die Western-Blot-Experimente haben gezeigt, dass der durch Aufreinigung der IgG-Fraktionen erhaltene Argonaute-Antikörper für Immunpräzipitations-Experimente sehr gut geeignet war. Er zeigte keine Kreuzreaktionen zu anderen Proteinen und führte im Rohextrakt zu einem einzigen spezifischen Signal.

2.5. Überprüfung der Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analysen

Nachdem die Überprüfung der Argonaute-Antikörper positiv verlief, konnten weitere Experimente durchgeführt werden. So wurde der Erfolg und die Spezifität der Immunpräzipitation auf Proteinebene überprüft. Das durch die IP erhaltene Präzipitat setzte ich nach mehreren Waschschritten in Western-Blot-Analysen ein (II. 10.3.). Es wurden zwei verschiedene Versuchsansätze auf das SDS-Gel aufgetragen. Einer der beiden Versuchsansätze war wie in II. 11. beschrieben mit an Dynabeads gekoppelten Argonaute-Antikörpern durchgeführt worden (Abb. 15, Spur 3). Das Argonaute-Protein konnte dadurch aus dem Zellextrakt „gefischt“ werden. Der zweite Versuchsansatz wurde ebenso wie in II. 11. beschrieben durchgeführt, jedoch verzichtete man hier auf den Einsatz des Argonaute-Antikörpers (Abbildung 15, Spur 2). Dadurch sollte herausgefunden werden, ob Bestandteile des Zellextraktes unspezifisch an die Protein-G-Dynabeads banden.



Für die Immunpräzipitationsversuche wurden bei dem durchgeführten Western-Blot folgende Ergebnisse erhalten.

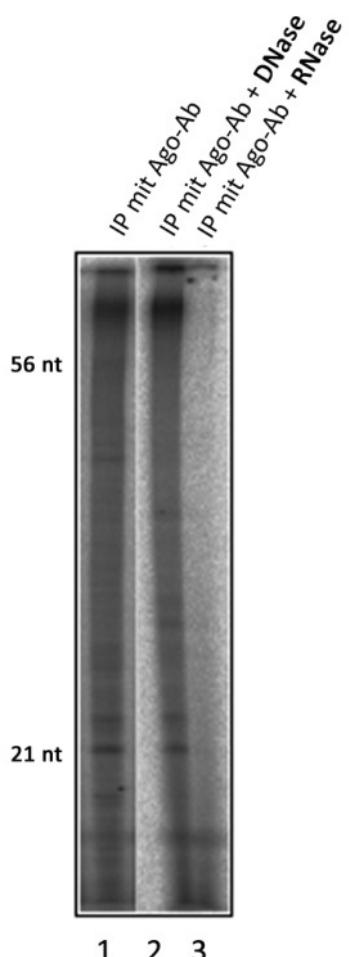
Abbildung 15 Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitation mit dem Argonaute-Antikörper. Spur 2 zeigte die präzipitierten Proteine ohne den Einsatz des Argonaute-Proteins bei der Präzipitation. Bei Spur 3 wurde der Argonaute-Antikörper bei der Immunpräzipitation vorschriftsgemäß eingesetzt. Die Verdünnung des Argonaute spezifischen IgG im Western-Blot betrug 1:5000. Der sekundäre Antikörper wurde in einer 1:10000-Verdünnung eingesetzt. Als Standard diente in Spur 1 der Prestained Protein Ladder.

In Abbildung 15 war in Spur 3 deutlich die schwere Kette des Antikörpers zu erkennen (~50 kDa), welcher sich nach der Elution von den Protein G Dynabeads gelöst hatte. Dieses Signal fehlte in Spur 2, da in diesem Versuchsansatz bei der IP kein Antikörper eingesetzt wurde. Außerdem war in Spur 3 auf Höhe von etwa 25 kDa ein leichtes Signal zu erkennen, während diese in der mittleren Spur komplett fehlte. Dabei könnte es sich um die leichte Kette des Antikörpers handeln, welche ein

Molekulargewicht von etwa 25 kDa vorzuweisen hat. Spur 3 zeigt auf Höhe von ca. 100 kDa ein starkes Signal, bei welchem es sich um das Argonaute-Protein handelte. Außerdem waren höher molekulare Signale in dieser Spur erkennbar, welche schwer oder gar nicht in das Gel gelaufen waren. Diese Signale könnten Proteinkomplexe darstellen, welche das Argonaute-Protein beinhalteten. Dies war wahrscheinlich auf einen Fehler beim Vorbereiten der Proben für den Auftrag auf das SDS-Gel zurückzuführen. Die Probe hätte eventuell vor dem Auftrag länger bei 95 °C aufgekocht werden müssen. Ein Zerfall der Komplexe wäre dadurch wahrscheinlicher geworden. In Spur 2 fehlten diese hochmolekularen Bereiche sowie das Signal für das Argonaute Protein. Dies zeigt einerseits, dass die Immunpräzipitation mit dem Argonaute-Antikörper erfolgreich war und dass die Protein G Dynabeads keine unspezifischen Interaktionen mit Bestandteilen des Rohextrakts eingehen.

2.6. Analyse der mit dem Ago-Protein interagierenden Nukleinsäuren

Um herauszufinden, welche Art von Nukleinsäure, DNA oder RNA, mit dem Argonaute-Protein aus *Pyrococcus furiosus* interagierte, wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dieses Wissen war notwendig, um für die weiteren Klonierungsschritte und Sequenzierungen der Nukleinsäuren die richtige Herangehensweise wählen zu können. Die Co-IP wurde, wie im Material- und Methodenteil unter 11. beschrieben, durchgeführt. Die Nukleinsäuren konnten nach einem Proteinase-Verdau (um Antikörper und Antigen zu degenerieren) und einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung in H₂O_{Millipore} gelöst werden.



Sie wurden anschließend radioaktiv markiert (II. 5.10.) und mittels *Micro-spin 6 Chromatographie Column* (Bio-Rad, Hercules, USA) von überschüssiger Radioaktivität und Proteinen getrennt. Die markierten Nukleinsäuren wurden mit DNase I bzw. RNase H behandelt und auf ein 20 %iges, denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach 300 V für 2 h wurde das Gel aus der Apparatur genommen und in der Geltrocknungsanlage (Bio-Rad Geltrockner Model383, Bio-Rad, Hercules, USA) unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel konnte anschließend auf einen Phosphoimager Screen (Fujifilm, Düsseldorf) aufgelegt werden. Das Auslesen dieses Screens erfolgte am nächsten Tag durch den Phosphoimager Fuji LAS-3000 (Fujifilm, Düsseldorf).

Abbildung 16 Die mit dem Argonaute-Protein immunpräzipitierte Nukleinsäuren radioaktiv markiert und analysiert auf einem denaturierenden Poly-acrylamid-Gel (20%). Die Nukleinsäuren wurden unbehandelt (Spur 1) mit DNaseI (Spur 2) bzw. RNase A (Spur 3) behandelt.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen war, wurden durch die Co-IP und die darauffolgenden molekularbiologischen Methoden Nukleinsäuren erhalten, welche mit dem Argonaute-Protein aus *Pyrococcus furiosus* interagierten. Die mittels $[\gamma-^{32}\text{P}]$ -ATP markierten Nukleinsäuren wurden auf einem 20 %igen Polyacrylamid-Gel (Sequagel UreaGel System, National Diagnostics, Atlanta, USA) sichtbar gemacht. Die erkennbaren Banden und Signale in Spur 1, bei welcher die Nukleinsäuren ohne Nuklease-Behandlung zu sehen waren, unterschieden sich nur sehr gering von den Signalen in Spur 2. Diese Spur zeigte die Nukleinsäuren nach Behandlung mit DNase I. Spur 3 hingegen dokumentierte die markierten Nukleinsäuren nach Inkubation mit RNase A. Hier war zu erkennen, dass die Signale in dieser Spur klar schwächer waren als in der unbehandelten Spur 1. Diese Beobachtungen zeigten, dass es sich bei den mit dem Argonaute-Protein präzipitierten Nukleinsäuren um RNA handelte. Eine Präzipitation von DNA konnte nicht festgestellt werden.

2.7. sRNA-Klonierung der präzipitierten Nukleinsäuren

2.7.1. Ligation der Adapter und Herstellung der entsprechenden cDNA

Um herauszufinden, um welche Art RNA es sich bei der präzipitierten Ribonukleinsäure handelt, musste diese sequenziert werden. Dies erforderte die Klonierung der RNA und eine damit verbundene Umwandlung in DNA, welche für die Sequenzierung notwendig war.

An die durch Co-IP-Experimente gewonnene sRNA wurde ein 3'-Adapter ligiert (II. 13.). Nachdem mit Hilfe einer trunkierte RNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) dies durchgeführt wurde, musste an das 5'-Ende ein 5'-Adapter angehängt werden. Der somit entstandene RNA-Einzelstrang erfuhr mittels SuperScriptIII Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Darmstadt) eine Umschreibung in cDNA,

welche wiederum durch die Pilot-PCR vervielfältigt wurde. Nachdem die Pilot-PCR erfolgreich verlaufen war, konnte die Scale-up-PCR mit 20 Zyklen durchgeführt werden. Das PCR-Produkt wurde auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel (SequaGel, National Diagnostics, Atlanta, USA) aufgetragen.

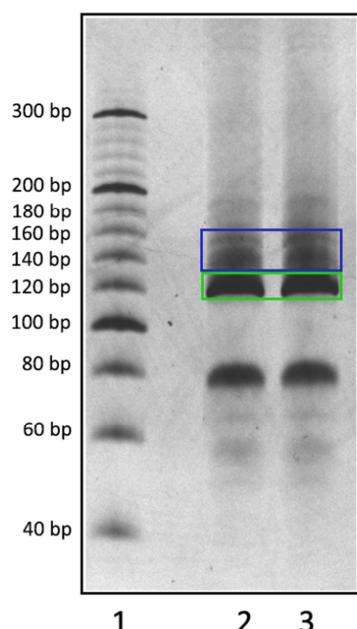


Abbildung 17 Klonierte sRNA nach der Scale-up PCR analysiert auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Die Probe wurde auf zwei Spuren gesplittet (Spur 2 + 3). Die Bande im grünen Kasten (~120 bp) entsprach dem Ligationsprodukt der Adaptoren ohne sRNA. Die Signale im blauen Bereich entsprachen der klonierten sRNA. Sie wurden ausgeschnitten und aufgereinigt. Spur 1: GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder.

Nach der Scale up PCR war auf dem Gel eine starke Bande zu erkennen (Abb. 17, Spur 2 + 3, grüner Bereich). Hierbei handelte es sich um ein Klonierungsprodukt mit einer Länge von ~120 bp, welches bei jeder Klonierung entstand. Dieses Produkt entsprach der Ligation des 3'- und 5'-Adapters ohne Insert. Unter diesem Signal waren im Bereich von ca. 80 bp weitere Banden abgebildet. Sie repräsentierten die PCR-Primer sowie Nebenprodukte der PCR. Die Banden größer als 120 bp,

abgebildet im blauen Bereich der Abbildung 17, entsprachen dem gesuchten Klonierungsprodukt. Die dort vorgefundene DNA war länger als 120 bp, was dem Ligationsprodukt plus sRNA entsprach. Besonders stark zu erkennen waren die Banden auf Höhe von ~140 bp bzw. ~150 bp. Abzüglich der Adaptoren und der DNA-Teilstücke, welche bei der Klonierung verwendet wurden, deutet dies auf eine ursprüngliche sRNA-Länge von ca. 20-30 nt hin. Die klonierten Nukleinsäuren im blauen Bereich (~135 bp - ~160 bp) wurden ausgeschnitten und wie in II. 13.2.6. beschrieben aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop ergab eine Konzentration von 57,3 ng/µl. Die Probe wurde anschließend an das KFB Regensburg (Biopark) weitergegeben, um die DNA dort via Illumina Sequenzer zu sequenzieren.

2.7.2. Sequenzierung der klonierten sRNA

Das KFB führte vor der Sequenzierung eine Qualitätsuntersuchung der eingereichten Proben durch. Hierzu wurde ein Agilent Bioanalyzer 2100 benutzt.

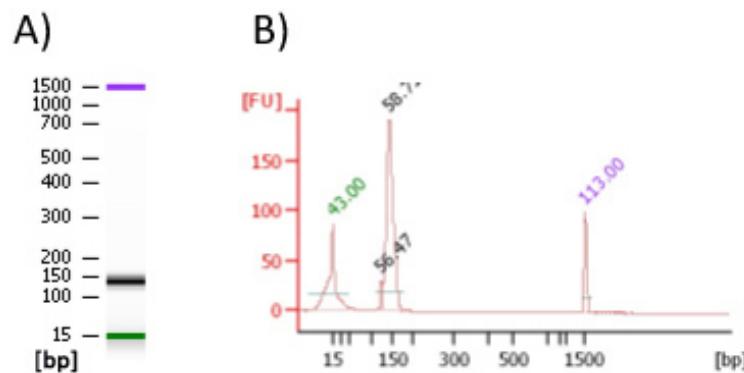


Abbildung 18 Qualitätsuntersuchung der klonierten Proben durch das KFB mittels Bioanalyzer. A) Auf trennung der eingereichten Nukleinsäuren nach Größe. Türkise Bande bildete das Signal für den upper Marker, grüne Bande für den lower Marker des Standards. B) Größenprofil der klonierten Nukleinsäuren.

Abbildung 18 zeigte die Ergebnisse der Qualitätsuntersuchung. Obwohl auf dem Gel nach der Scale-up-PCR zwei Banden zu sehen waren, erkannte man bei der Auftrennung der Proben auf dem Bioanalyzer-DNA-Chip nur eine starke, jedoch etwas breiter aufgefächerte Bande bei ~140 bp (Abbildung 18 A). Das Profil dieser Auftrennung zeigte, dass die Nukleinsäuren ein deutliches Signal ergaben mit einem relativ breiten „Sockel“ (Abbildung 18 B). Dieser „Sockel“ erstreckte sich von 135-160 bp, was wiederrum in etwa dem ausgeschnittenen Gelbereich nach der Scale up PCR entsprach. Die Qualitätsuntersuchung bestätigte somit das Ergebnis der Scale up PCR. Die klonierten DNA-Stücke konnten sequenziert werden. Als Länge der Sequenzierung wurden 50 nt gewählt.

2.8. Auswertung der Sequenzierergebnisse

Die mit dem Argonaute-Protein präzipitierten Nukleinsäuren wurden kloniert und mit Hilfe eines Illumina Sequenzers sequenziert. Durch die Sequenzierung wurden 1191441 Sequenzen erhalten, welche anschließend mit Hilfe des online verfügbaren Galaxy-Server (<https://usegalaxy.org>) ausgewertet werden konnten. Als Parameter wurde eine minimale Länge von 15 nt ausgewählt. Außerdem galt aufgrund der ausgewählten Adaptoren und Primer die Sequenz „TGGAATTC“ als

Erkennungssequenz für DNA-Moleküle, welche erfolgreich kloniert wurden. Durch die ausgewählten Parameter erhielt man folgende Werte:

Tabelle 1 Verteilung der durch die Sequenzierung erhaltenen Sequenzen. Die *reads* erfuhrn eine Selektion nach Länge. Zudem wurden Sequenzen, welche nur aus ligierten Adaptoren bestanden, eliminiert.

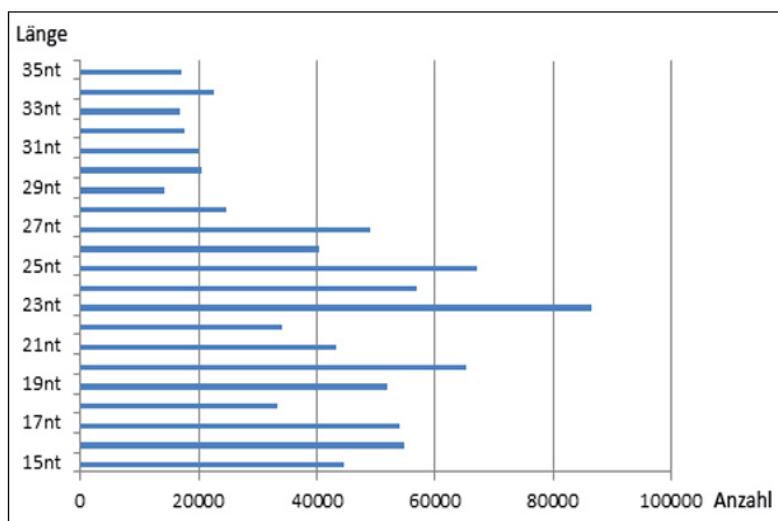
	<i>reads</i>
Anzahl der Sequenzen nach der Sequenzierung	1191441
Anzahl der Sequenzen, welche die gewählten Anforderungen (Länge \geq 15 nt) erfüllen	960376
zu kurze Sequenzen (Länge $<$ 15 nt)	180471
Sequenzen, welche nur aus dem Ligationsprodukt der Adapter bestanden (<i>adapter-only</i> -Sequenzen)	50594

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, wurden insgesamt 231065 Sequenzen aussortiert. 180471 von ihnen waren unter der geforderten Länge von 15 nt. Bei den restlichen 50594 handelte es sich um Sequenzen, welche aus dem Ligationsprodukt der eingesetzten Adaptoren bestanden. Diese wurden vermutlich beim Ausschneiden aus dem Gel nach der scale-up PCR „mitgeschleppt“. Da die Bande des gewünschten Klonierungsproduktes sehr nahe an dem Ligationsprodukt der Adapter ohne RNA lag, war dies nicht zu vermeiden. 960376 Sequenzen verfügten über die passende Länge von mindestens 15 nt und bestanden nicht aus Adaptoren. Mit ihnen konnte weitergearbeitet werden.

2.8.1. Aufschlüsselung der Sequenzen nach Länge und Mapping gegen das *P. furiosus*-Genom

Die erhaltenen, korrekten Sequenzen wurden nach ihrer Länge aufgeschlüsselt und analysiert. Diese Aufschlüsselung zeigte, dass ein großer Teil der Sequenzen eine Länge von 23 nt besaß (Abb. 19 A). Diese Länge lag mit einer Anzahl von knapp über 80000 klar vor den anderen Sequenzlängen. Außerdem verfügten die 20 nt sowie 25 nt Moleküle über eine hohe Trefferzahl. Insgesamt gesehen konnte man feststellen, dass sich der Großteil der erhaltenen Sequenzen über eine Länge von 15 nt bis 27 nt erstreckt, was in etwa auch der Länge einer durchschnittlichen, kurzen, nicht-kodierenden RNA entsprach. Des Weiteren wurden die Sequenzen gegen das Genom von *P. furiosus* gemappt. Somit konnte festgestellt werden, welchen genomischen Ursprung die erhaltenen Sequenzen hatten bzw. zu welchem Genabschnitt sie passten (Abb. 19 B). Über $\frac{1}{3}$ der Sequenzen fielen in den Genbereich der für die ribosomalen RNA kodierenden DNA. 10,4% der Sequenzen passten zu sRNA(snoRNA)-Bereichen, 9,1% zu CRISPR-Abschnitten, 8,2% waren in *open reading frames* zu finden und lediglich 3% entfielen auf tRNA-Abschnitte und *intergenic regions*.

A)



B)

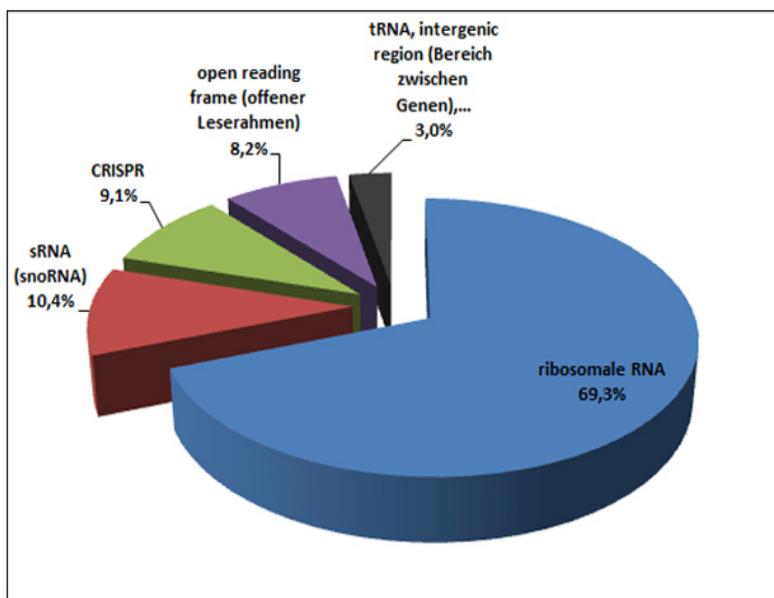


Abbildung 19 Analyse der korrekten Sequenzen, welche nach der Sequenzierung und mehreren Auswahlsschritten erhalten wurden. A) Aufschlüsselung der Sequenzen nach ihrer Länge. Gezeigt wurden die Nukleinsäuren, welche zwischen 15 nt und 35 nt lagen. Die x-Achse zeigte die Anzahl der Nukleinsäure passend zu einer entsprechenden Länge, die y-Achse symbolisierte die Länge. B) Verteilung der Sequenzen nach dem Bereich ihres jeweiligen Auftretens bzw. ihres Ursprungs. Die Sequenzen wurden hierfür gegen das Genom von *P. furiosus* gemappt. Blauer Bereich = Ursprung in der ribosomale RNA, ziegelrot = sRNA (snoRNA), grün = CRISPR, violett = open reading frame, schwarz = tRNA, intergenic region, etc.

Durch das Mapping gegen das Genom von *P. furiosus* konnten Bereiche mit einer besonders hohen Zahl von Treffern gefunden werden. Diese hohen Trefferzahlen äußerten sich in Gipfeln. Einer dieser Abschnitte befand sich im Bereich 1288205-1288225 des *P. furiosus* Genoms (Abb. 20 A). Neben diesem Gipfel befanden sich zwei bereits annotierte Genabschnitte. Der Bereich 1288110-1288166 codierte für die snoRNA PF_s027. Diese snoRNA wurde mit Hilfe der Rfam Datenbank gefunden. Durch die Rfam Datenbank werden Familien von RNA-Sequenzen in Form von multiplen Sequenzalignments beschrieben. Die Datensammlung dient dazu, in komplett sequenzierten Genomen bisher nicht erkannte Mitglieder bekannter RNA-Familien zu identifizieren. Downstream des ncRNA-Gipfels befand sich das Protein PF1373 (1288269-1289126), ein bereits bekannter Kationentransporter im Genom von *P. furiosus*. Der deutlich erkennbare Gipfel in Abbildung 20 A erstreckte sich von 1288205-1288225 und erhielt die dazu passende Sequenz bzw. RNA erhielt die

Bezeichnung snoRNA PF_s027A. Diese, bei der Sequenzierung häufig aufgetretene RNA, hatte eine Länge von 21 nt.

Wie in Abbildung 20 B ersichtlich, gab es im Bereich 136930 – 141735 des Genoms von *P. furiosus* nach der Sequenzierung ebenfalls mehrere Treffer. Auffällig hierbei waren die klaren und deutlich erhabenen Gipfel im Bereich der 16S rRNA (136930 – 138426). Im Vergleich hierzu waren für den 23S rRNA Abschnitt (138687 – 141735) nur kleine, schwächere Signale ersichtlich. Im Genombereich, welcher für die tRNA-Ala kodierte (138486 – 138563), waren keine Gipfel zu finden.

Im Folgenden wurde ein besonderes Augenmerk auf den 16S rRNA Bereich gelegt (Abbildung 20 C). Dieser Abschnitt zeigte über nahezu die gesamte Länge kleinere und größere Gipfel. Besonders auffällig waren jedoch die mit den Ziffern 1 bis 6 nummerierten Abschnitte. Diese wiesen nach der Sequenzierung eine sehr hohe Trefferquote auf, welche sich in besonders großen Gipfeln widerspiegeln. Die zu den sechs Gipfeln passenden RNA-Sequenzen wurden passenderweise mit sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6 bezeichnet. Während die Anzahl der Treffer und somit das Gipfelmaximum bei den Gipfel 1 bis 5 jeweils nahezu ähnlich war, hatte der Abschnitt 6 im Vergleich dazu eine etwas höhere Trefferanzahl. Dies wurde durch den roten Bereich in seinem Maximum angedeutet (Abb. 20 C). Die Länge der erhaltenen Sequenzen der Gipfel variierte von 26 nt (Gipfel 1) bis hin zu 19 nt (Gipfel 4 und 6) (Tabelle 2, sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6). Die sechs Segmente mit hoher Trefferzahl sind über den kompletten 16S rRNA Bereich verteilt, wobei sich die breiteren Gipfel 1 und 2 (sRNA 16S_1 und sRNA 16S_2) im upstream Bereich befanden, die schmaleren hingegen (5 und 6 bzw. sRNA 16S_5 und sRNA 16S_6) im downstream Bereich des Genoms. Gipfel 3 und 4 (sRNA 16S_3 und sRNA 16S_4) lagen nahezu zentral und sehr eng beieinander.

Die neben snoRNA Pf027A und sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6 (Tabelle 2) gefundenen Gipfelbereiche im Genom von *P. furiosus* waren verhältnismäßig klein und konnten daher für weitere Untersuchungen vernachlässigt werden.

A)



B)



C)

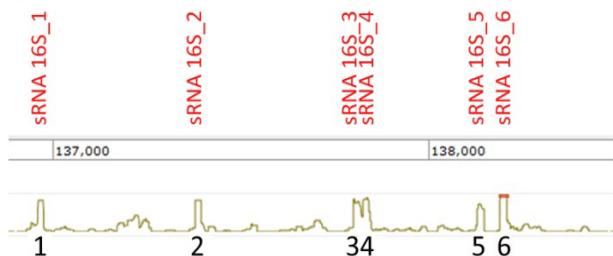


Abbildung 20 Ausgewählte Genabschnitte aus *P. furiosus*, welche nach dem Mapping der durch die Sequenzierung erhaltenen Sequenzen besonders interessant waren. A) Ergebnisse der Sequenzierung im Bereich 1288000 – 1289100 des Genoms von *P. furiosus*. Dargestellt ist der Bereich der snoRNA PF_s027 (1288110 – 1288166), der snoRNA PF_s027A (1288205 – 1288225, rot eingefärbt) sowie der kodierende Genabschnitt für das Protein PF1373, einem Kationentransporter (1288269 – 1289126). B) Ergebnisse der Sequenzierung im Bereich 136930 - 141735 des Genoms von *P. furiosus*. Abgebildet ist der Bereich der 16S rRNA (136930 – 138426), der tRNA-Ala (138486 – 138563) sowie der 23S rRNA (138687 – 141735). C) Genbereich, welcher für die 16S rRNA in *P. furiosus* kodiert (136930 – 138426). Die besonders deutlich erkennbaren Gipfel wurden mit den Ziffern 1 – 6 durchnummert, die dazu passenden Sequenzen erhielten die Bezeichnung sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6.

Tabelle 2 Übersicht über die nach dem Mapping der Sequenzierergebnisse gegen das Genom von *P. furiosus* erhaltenen Gipfel.

Bezeichnung	Länge	Stelle im Genom	erhaltene RNA (5' → 3')	kodierende DNA (5' → 3')
snoRNA PF_s027A	21 nt	1288205-1288225	augaugagggagugacggacu	agtccgtcactccctcatcat
sRNA 16S_1	26 nt	136958-136983	gcuauggggguccgacuaagccaugc	gcatggcttagtcggaccggcatagc
sRNA 16S_2	23 nt	137380-137402	aaggcugggcaaggccgguggc	gccaccggccttgccagccctt
sRNA 16S_3	23 nt	137801-137823	aaaggaauuggcgggggagcacu	agtgtcccccgccaattcctt
sRNA 16S_4	19 nt	137830-137848	aagggguggagcgugcggu	accgcacgctccacccctt
sRNA 16S_5	20 nt	138129-138148	aaugggcgggacaaugggac	gtcccattgtccggccatt
sRNA 16S_6	19 nt	138190-138208	aguucggaucgcgggcugc	gcagcccgatccgaact

2.8.2. Multiples Sequenzalignment (MSA) der Treffer im Bereich der 16S rRNA

Die sechs besonders häufig im Bereich der 16S rRNA aufgetretenen Sequenzen sRNA 16S_1- sRNA 16S_6 (Tabelle 3) wurden mit Hilfe eines multiplen Sequenzalignments genauer untersucht. Dadurch sollte festgestellt werden, ob zwischen den einzelnen Sequenzen Ähnlichkeiten bestanden. Diese Similaritäten könnten Aufschluss geben über ein bevorzugtes Sequenzmuster bei der Bindung der kurzen RNA an das Argonaute-Protein.

Tabelle 3 Übersicht über die sechs Gipfel im 16S rRNA-Bereich, welche durch MSA weiter untersucht wurden

Gipfel	Bezeichnung	Länge	RNA-Sequenz
1	sRNA 16S_1	26 nt	gcuauggggguccgacuaagccaugc
2	sRNA 16S_2	23 nt	aaggcugggcaaggccgguggc
3	sRNA 16S_3	23 nt	aaaggaauuggcgggggagcacu
4	sRNA 16S_4	19 nt	aagggguggagcgugcggu
5	sRNA 16S_5	20 nt	aaugggcgggacaaugggac
6	sRNA 16S_6	19 nt	aguucggaucgcgggcugc

Diese sechs Sequenzen wurden online auf <http://simgene.com/ClustalW> miteinander verglichen. Dabei stellte man die Sequenzen mit ähnlicher Länge gegenüber und suchte nach Gemeinsamkeiten in der Nukleotidabfolge.

Das multiple Sequenz Alignment der Sequenzen sRNA 16S_1, sRNA 16S_2 und sRNA 16S_3 (Abbildung 21 A), welche alle über eine Länge von ≥ 23 nt verfügten, zeigte an fünf Stellen eine exakte Übereinstimmung. Bei vier der fünf Übereinstimmungen handelte es sich um die Nukleinbase Guanin (G). Neben dieser Identität wurde auch für das Nukleotid Cytosin (C) ein passender Abschnitt gefunden, wohingegen keine Übereinstimmungen für die Nukleotide Adenin (A) und Uracil (U) zu erkennen waren. Auch für diese Sequenzen ≤ 20 nt gab es, wie in Abbildung 21 B ersichtlich, Übereinstimmungen. An sechs Stellen gab es nach dem Alignment eine Similarität wobei es sich bei fünf dieser deckungsgleichen Nukleinbasen um Guanin (G) handelte. Es folgte Adenin (A) mit einer identischen Base, Cytosin (C) und Uracil (U) hatten keine identischen Bereiche.

Dieses Alignment verlief gut, jedoch war die Anzahl der Konformitäten in den Sequenzen nicht sehr hoch. Das MSA wurde verfeinert, indem man Sequenzen mit exakt gleicher Länge gegenüberstellte. Ein Vergleich der Genbereiche sRNA 16S_4 und sRNA 16S_6, welche beide über eine Länge von 19 nt verfügten, verlief positiv (Abb. 21 C). Beide Sequenzen zeigten in 9 der 19 vorhandenen Nukleotiden exakte Übereinstimmung. Erneut gab es für das Nukleotid Guanin (G) außergewöhnlich viele identische Bereiche. Jeweils eine Konformität entstand bei den anderen Nukleotiden Adenin (A), Cytosin (C) und Uracil (U). Neben dem MSA für die beiden 19 nt langen Sequenzen wurden auch die zwei 16S rRNA-Bereiche mit einer Länge von 23 nt, sRNA 16S_2 und sRNA 16S_3, verglichen (Abb. 21 D). Der Vergleich dieser Sequenzen erzeugte an 11 Stellen eine exakte Übereinstimmung. Der Großteil der Konformität wurde erneut in den Bereichen der Nukleinsäure Guanin (G) erreicht. Es folgten Adenin (A) mit zwei sowie Uracil (U) und Cytosin (C) mit jeweils einer Übereinstimmung.

Bei dem Vergleich der 19 nt sowie 23 nt-Sequenzen untereinander viel eine besonders hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Außerdem wurden sehr häufig für das Nukleotid Guanin Übereinstimmungen gefunden. Für die Nukleotide Adenin, Cytosin und Uracil wurden wenige identische Abschnitte ermittelt. Auffällig war zudem die Tatsache, dass die erste Base am 5'-Ende der RNA in fünf von sechs Fällen einem Adenin entsprach. Möglicherweise spielt sie bei der Interaktion des Argonaute-Proteins mit der kurzen RNA eine entscheidende Rolle.

A)

3	----AAA GG AAUUG GG C ^{GGG} GG GAGCACU-	23
1	GCUAUGG GG GUCC GAC UAAG G CCAUGC--	26
2	----AA GG GCUGG GG C ^{GA} AAG G CCGGUGGC	23

* * * * *

B)

6	---A GUUC GG ^A UCGC GG ^G CUGC	19
5	AAU GG C GG ^A CAAU GG ^G GAC--	20
4	-AAG GG GU GG ^A CG GG GU--	19

* * * * * *

C)

3	A AA GG AAU U GG ^C GG ^G GG G-A G CACU	23
2	- AA GG GC UG GG ^C AA GG ^G CC GG UGGC	23

* * * * * * * * * * *

D)

6	--A GUUC GG ^A U GG ^C GG ^G GG ^U GC	19
4	AAG GG GU GG ^A G GG ^C U GG ^G GG ^U --	19

* * * * * * * * *

Abbildung 21 Multiples Sequenzalignment der sechs Gipfel im Bereich der 16S rRNA. A) MSA der Sequenzen 1, 2 und 3. Identische Bereiche wurden rot (Guanin) und grün (Cytosin) unterlegt und umrahmt. Die Zahlen am rechten Rand beschrieben die jeweilige Länge der Sequenzen in nt. B) Multiples Sequenzalignment der Sequenzen 4, 5 und 6. Identische Bereiche waren rot (Guanin) und blau (Adenin) dargestellt. Die Sequenzen waren 19 bzw. 20 nt lang. C) Sequenzalignment der 23 nt Sequenzen 2 und 3. Identische Bereiche wurden blau (Adenin), rot (Guanin), violett (Uracil) und grün (Cytosin) gekennzeichnet. D) MSA der 19 nt langen Sequenzen 4 und 6. Identische Bereiche waren rot (Guanin), blau (Adenin), grün (Cytosin) und violett (Uracil) unterlegt und umrahmt.

2.9. Northern-Blot zur Validierung der Sequenzierergebnisse

Um die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigen und verifizieren zu können, mussten diese mittels eines Northern-Blots überprüft werden (II. 16.). Die zu überprüfende RNA-Probe wurde durch Co-IP-Experimente (II. 11.), Proteinase K-Verdau (II. 5.6.), Phenol/Chloroform Isolation und anschließender EtOH-Fällung (II. 5.3.) erhalten. Neben dieser Probe wurde als Kontrolle auch die gesamt RNA aus *P. furiosus* mit aufgetragen.

Es wurden bei den Northern-Blot-Experimenten verschiedene DNA-Sonden eingesetzt (Abb. 22 E). Den Anfang machte die Sonde gegen die snoRNA PF027A (Abb. 22 A). Dieser RNA-Abschnitt wurde ausgewählt, die er bei der Sequenzierung sehr häufig auftrat. In Spur 1 der Abbildung 22 A, in welcher die gesamt RNA aufgetragen wurde, waren deutliche Signale bei der Sonde für die snoRNA PF027A zu erkennen. So war auf Höhe von 21 nt ein starkes Signal zu sehen. Hierbei handelte es sich vermutlich um die fertig prozessierte snoRNA PF027. Über dieser starken Bande sind weitere Signale zu erkennen, welcher der noch nicht vollständig prozessierten snoRNA zugeordnet werden könnten. In Spur 3 war die nach Co-IP erhaltene RNA Probe aufgetragen worden. Auch dort war auf Höhe von 21 nt ein Signal zu erkennen. Dies durfte der prozessierten snoRNA PF027A entsprechen. Vorstufen der ncRNA waren in dieser Probe nicht zu erkennen. Die dünne Bande im oberen Bereich der IP entsprach der Tasche des Gels. Teile der ncRNA waren möglicherweise nicht ins Gel eingelaufen oder in der Tasche präzipitiert. Zudem wurde eine Probe nach Immunpräzipitation ohne Ago-Antikörper analysiert (Abb. 22 A, Spur 2). Sie sollte zeigen, ob RNA-Moleküle unspezifische an die Matrix der Dynabeads binden und somit das Ergebnis verfälschen. Es waren jedoch keine Signale zu erkennen. Eine unspezifische Bindung der analysierten snoRNA PF027A konnte somit ausgeschlossen werden.

Neben dieser snoRNA waren aufgrund der Ergebnisse der Sequenzierung die Bereiche der 16S rRNA von besonderem Interesse. Im Sequenzabschnitt der 16S rRNA aus *P. furiosus* wurden für sechs RNA-Bereiche hohe Trefferzahlen gefunden (Tabelle 3), wobei sRNA 16S_6 einen besonders großen Gipfel vorwies. Die Sonde für diesen bei der Sequenzierung stark betroffenen 16S rRNA-Bereich zeigte beim Northern-Blot einige deutliche Banden in der Spur für die gesamt RNA (Abb. 22 B, Spur 1). Bei diesen Signalen handelte es sich wahrscheinlich um die fertig prozessierte 16S rRNA. Es waren vor allem im oberen Bereich des Gels starke Banden zu erkennen. Hierbei handelte es sich um lange 16S rRNA-Abschnitte. Die nach Co-IP mit Ago-Antikörper erhaltene RNA Probe wurde ebenso mit dieser Sonde überprüft. Sie zeigte mehrere Banden (Abb. 22 B, Spur 2). Besonders auffällig war das Signal auf Höhe von ~21 nt. Wie in Spur 1 waren auch in dieser Spur Banden im höheren Molekularbereich zu sehen, jedoch war die Intensität der Signale im Vergleich zur gesamt RNA schwächer. Auch fehlten hier die Banden im ganz oberen Bereich. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen gab es in Spur 2 der Abbildung 22 B noch Banden unterhalb bzw. kleiner als 21 nt. Hierbei handelte es sich wohl um Abbauprodukte der 16S rRNA. Die Spur 3 der Abbildung 22 B diente als Negativkontrolle, da dort die Immunpräzipitation ohne Antikörper durchgeführt wurde. Sie sollte zeigen, ob 16S rRNA mit den Dynabeads interagierte und somit bei der IP präzipitierte. Dies war nicht der Fall. Auch die Überprüfung der anderen fünf Gipfelbereiche der 16S rRNA, welche nach der Sequenzierung besonders hohe Trefferzahlen aufwiesen, brachten ein ähnliches Ergebnis wie in Abbildung 22 B ersichtlich (Daten nicht gezeigt).

Um herauszufinden, ob durch die Co-IP ganze Ribosomenkomplexe erhalten werden oder ob es sich bei der präzipitierten RNA um reine 16S rRNA handelte, wurden weitere Northern-Blot-Experimente

mit Sonden gegen 23S rRNA und 5S rRNA durchgeführt. In Abbildung 22 C erkannte man Signale, welche für eine 23S rRNA Sonde bei der gesamten RNA entstanden (Spur 1). Es war ein deutliches Signal im oberen Bereich der Membran erkennbar. Hierbei handelte es sich um die Tasche des Gels. Da die 23S rRNA mit einer Länge von ~2900 nt sehr lang war, konnte sie nicht bzw. nur schwer ins Gel wandern. Der Großteil der 23S rRNA befand sich also vor dem Blotten auf die Membran noch in der Tasche des Gels. Neben diesem starken Signal war im Gel keine definierte Bande ersichtlich. Es lag jedoch ein sog. „Schmier“ vor, welcher beim Abbau der RNA entstand. Außerdem wurde die RNA überprüft, welche durch die Co-IP mit Ago-Antikörpern erhalten wurde (Abb. 22 C, Spur 2). Für die 23S rRNA gab es für diese Sonde kein Signal, was darauf hindeutete, dass keine 23S rRNA durch Co-IP präzipitierte.

Die Northern-Blot-Experimente mussten neben den DNA-Sonden für 16S und 23S rRNA auch noch mit einer Sonde gegen den 5S rRNA-Bereich durchgeführt werden. Hier zeigte sich in der Spur mit der gesamten RNA aus *P. furiosus* ein klares Signal auf Höhe von ~110 nt (Abb. 22 D, Spur 1). Die 5S rRNA wanderte im Vergleich zur deutlich größeren 23S rRNA in Abbildung 22 C ins Gel und konnte daher mit der entsprechenden Sonde nachgewiesen werden (Abb. 22 D, Spur 1). Spur 2 enthielt erneut die durch Co-IP erhaltene RNA. Dort waren, wie schon für die DNA-Sonde gegen die 23 S rRNA, keine Signale zu erkennen.

Die Abbildungen 22 C und 22 D zeigten somit, dass durch die Co-IP weder 23S rRNA noch 5S rRNA präzipitieren. Nur die 16S rRNA konnte mit den entsprechenden Sonden klar nachgewiesen werden und somit wurden die Ergebnisse der Sequenzierung durch Northern-Blot-Experimente bestätigt. Das dazugehörige Bandenmuster zeigte zudem, dass im Vergleich zur gesamt RNA ein Abbau der 16S rRNA stattgefunden hatte. Neben diesen Ergebnissen in Bezug auf die 16S rRNA-Sonden konnten auch beim Einsatz der DNA-Sonde gegen snoRNA PF027A positive Resultate beobachtet werden. Die Erkenntnisse der Sequenzierung wurden somit auch im Falle von snoRNA PF027A durch Northern-Blot-Experimente verifiziert.

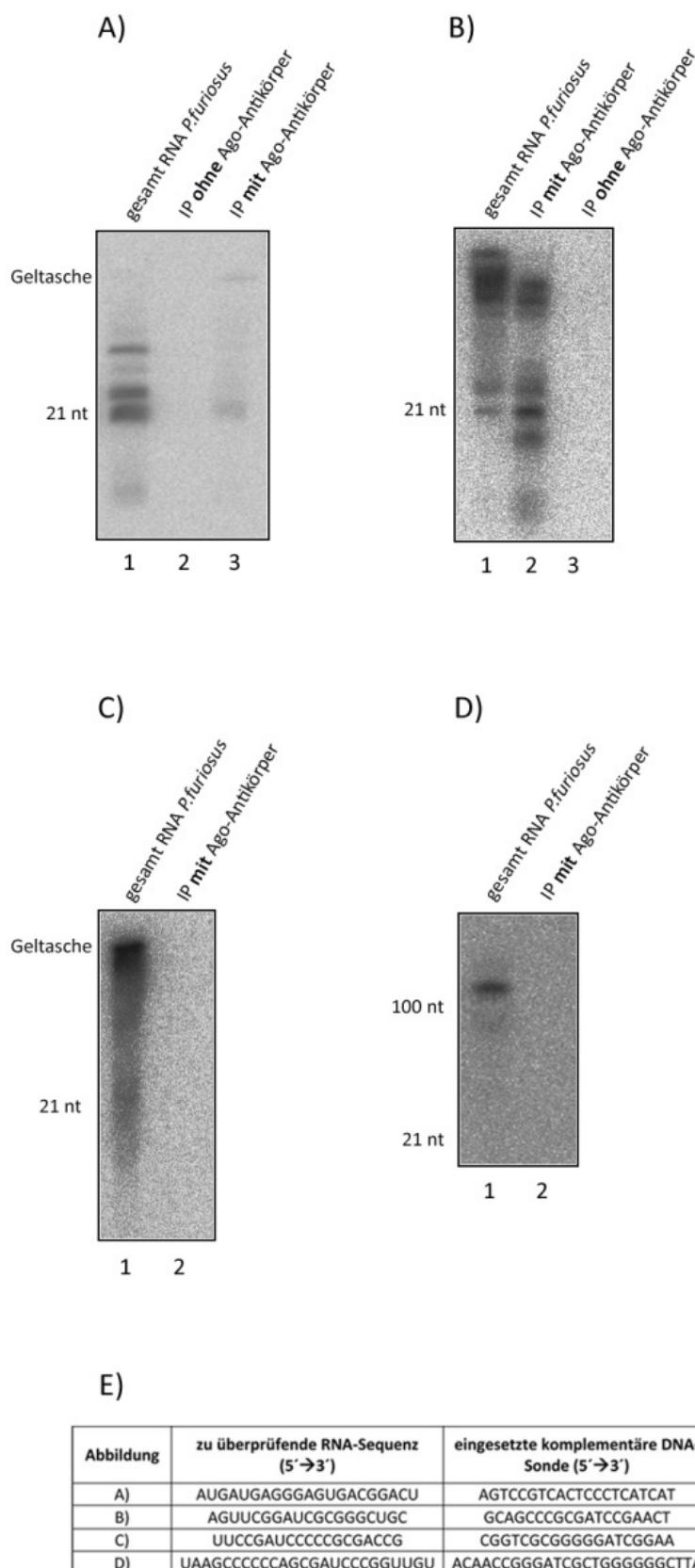
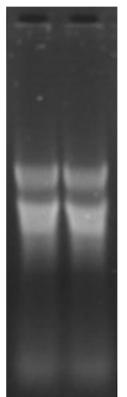


Abbildung 22 Northern-Blots mit der Sonden gegen snoRNA PF_s027A (A), sRNA 16S_6 (B), einen Abschnitt der 23S rRNA (C) sowie einen Bereich der 5S rRNA (D); jeweils 20%iges PAA-Gel. A) DNA-Sonde gegen snoRNA PF_s027A. In Spur 1 wurden 10 µg gesamt RNA aus *P. furiosus* aufgetragen. Spur 2 beinhaltete die durch Co-IP Experimente mit Argonaute-Antikörper erhaltenen RNA, Spur 3 zeigte das Ergebnis der Co-IP ohne Argonaute-Antikörper. B) DNA-Sonde gegen sRNA 16S_6. In Spur 1 wurden erneut 10 µg gesamt RNA aus *P. furiosus* aufgetragen. Spur 2 zeigte die durch Immunpräzipitation mit Ago-Antikörpern erhaltene RNA. Spur 3 beinhaltete die RNA, welche bei einer Co-IP ohne Ago-Antikörper erhalten wurde. C) DNA-Sonde gegen einen Bereich der 23S rRNA. Spur 1 zeigte 10 µg gesamt RNA aus *P. furiosus*. In Spur zwei war die erhaltene RNA nach einer IP mit Ago-Antikörper dargestellt. D) DNA-Sonde gegen einen 5S rRNA-Abschnitt. In Spur 1 wurden 10 µg gesamt RNA aus *P. furiosus* aufgetragen, Spur 2 enthielt die durch IP-Versuche mit Ago-Antikörpern gewonnene RNA. E) Übersicht über die in den Northern-Blots A-D überprüften RNAs sowie die dazu benutzten DNA-Sonden.

2.10. Interaktionsanalysen des Argonaute-Proteins mit verschiedenen Nukleinsäuren sowie anschließende Spaltexperimente

Nachdem die Ergebnisse der Sequenzierung mittels Northern-Blot validiert wurden, stellte sich die Frage, welche Aufgabe das Argonaute-Protein im Zusammenspiel mit der 16S rRNA aus *P. furiosus* übernimmt. Um dies herauszufinden mussten die Bindungseigenschaften des Proteins mit unterschiedlichen Nukleinsäuren geklärt werden. Hierzu wurden verschiedene RNA-Stränge sowie DNA-Moleküle verwendet. Zur Gewinnung der Ribonukleinsäuren für Interaktionsexperimente wurde

wie in II. 3.10. beschrieben die RNA aus *P. furiosus* extrahiert, auf ein mit Formaldehyd fixiertes Agarosegel aufgetragen (Abb. 23) und entsprechende Banden ausgeschnitten. Nach der Aufreinigung der Nukleinsäuren aus den Gelblöcken wurden diese radioaktiv markiert (II. 5.10.).



5S rRNA, tRNA, sRNA,... Abbildung 23 Formaldehyd fixiertes Agarosegel (1%ig) mit der aus *P. furiosus* extrahierten RNA.

So wurde die 16S rRNA gewonnen und anschließend auf einem 6%igen, nativem Gel aufgetragen und analysiert. Außerdem wurde in einem weiteren Ansatz das Laufverhalten der 16S rRNA in Anwesenheit des Argonaute-Proteins aus *P. furiosus* untersucht. Nach dem Gellauf wurde das Gel getrocknet und zur Belichtung eines Phosphoimager-Screens (Fujifilm, Düsseldorf) in eine Belichtungshülle für mehrere Stunden aufbewahrt. Dieser Screen konnte am nächsten Tag mit Hilfe eines Phosphoimagers ausgelesen werden.

Die mit [γ -³²P]-ATP radioaktiv markierte 16S rRNA zeigte im nativen Gel keine definierte Bande (Abb. 24 A, Spur 1). Zu sehen war lediglich ein sogenannter „Schmier“ in der unteren Hälfte des Gels. Fügte man zu diesem aus Bindepuffer und 16S rRNA bestehendem Ansatz das Argonaute-Protein aus *P. furiosus* bei, erhielt man ein Bandenmuster wie in Abb. 24 A, Spur 2, ersichtlich. Im oberen Bereich des Gels konnte man eine starke Bande erkennen. Hierbei könnte es sich um das Argonaute-Protein mit gebundener 16S rRNA handeln (Abb. 24 A, Spur 2, Pfeil). Neben diesem deutlichen Signal waren weitere schwache Signale über die gesamte Spur sichtbar (Abb. 24 A, Spur 2, gepunktete Pfeile). Es könnte sich hierbei erneut um Ago- 16S rRNA-Komplexe handeln. In Spur 2 konnte, ebenso wie in der Lane für die 16S rRNA, ein Protein-„Schmier“ am unteren Ende des Gels beobachtet werden. Jedoch war dessen Intensität deutlich schwächer.

Dieses Experiment wurde wiederholt, jedoch mit veränderter Zusammensetzung des Puffers (II. 17.2.). Der Bindepuffer, welcher in Abb. 24 A verwendet wurde, enthielt 2,5 mM EDTA. Dieser Bestandteil wurde weggelassen und der Puffer wahlweise mit oder ohne 10mM MgCl₂ eingesetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 50° C wurde Stopplösung zugegeben und die Proben auf einem Gel analysiert. Abbildung 24 B zeigte die 16S rRNA mit dem Argonaute-Protein auf einem 6%igen, nativem Gel. Als Puffer wurde in Spur 1 der Bindepuffer ohne MgCl₂ eingesetzt. Hier konnte man schon wie in der vorherigen Abbildung eine starke Bande im oberen Bereich des Gels erkennen. Außerdem waren auch hier erneut die schwächeren Signale zu sehen, welche sich über das gesamte

Gel hinweg erstreckten. In Spur 2 hingegen wurde dem Bindepuffer 10 mM MgCl₂ zugesetzt. Hier konnte, ebenso wie in Spur 1, eine Bande im oberen Gelbereich festgestellt werden. Dieses Signal war jedoch deutlich schwächer als in der Spur ohne MgCl₂. Außerdem waren im unteren Bereich des Gels keine klaren Banden zu erkennen.

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass in dem Versuchsansatz mit MgCl₂ ein 16S rRNA-Abbau stattgefunden haben könnte. Das Bandenmuster deutete darauf hin. Außerdem war bekannt, dass die Argonaute-Nukleaseaktivität in anderen Organismen von der Anwesenheit der Mg²⁺-Molekülen abhängt. Um niedermolekulare Komplexe, erkennbar als „Schmier“ in Spur 2 der Abbildung 24 B, genauer analysieren zu können, wurde ein 12 %iges PAA-Gel gewählt. Durch dieses höher konzentrierte Gel konnte der vorher ersichtliche „Schmier“ besser sichtbar gemacht werden (Abb. 24 C). In den drei Spuren war jeweils die radioaktiv markierte 16S rRNA mit dem Argonaute-Protein in Gegenwart von Bindepuffer und MgCl₂ zu sehen. Die Proben wurden bei 50° C inkubiert. Die Inkubationszeit variierte von einer Minute (Spur 1), über 5 Minuten (Spur 2) bis hin zu 10 Minuten (Spur 3). In Spur 1, welche die kürzeste Inkubationszeit aufwies, wurden vor allem im oberen Bereich des Gels deutliche Banden sichtbar. Dabei könnte es sich um Komplexe handeln, welche sich zwischen Ago-Protein und 16S rRNA gebildet hatten. In Spur 2 waren diese Banden im oberen Gelabschnitt ebenso zu erkennen, jedoch in einer deutlich schwächeren Intensität. Die deutlichsten und stärksten Signale waren hier im mittleren Bereich des Gels zu erkennen. Die Probe mit der längsten Inkubationszeit von 10 Minuten wurde in Spur 3 dargestellt. Hier waren die Signale im oberen Bereich des Gels komplett verschwunden. Die stärksten Protein-RNA-Komplexe fand man im unteren Bereich des Gels.

Um herauszufinden, ob es sich bei den gefundenen Ergebnissen tatsächlich um einen spezifischen RNA-Abbau durch das Argonaute-Protein handelte, oder ob die Probe möglicherweise mit Ribonukleasen kontaminiert war, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen. Hierzu wurde mit Hilfe der T7 RNA Polymerase eine ~1,4 Kilobasen (kb) lange ssRNA hergestellt. Sie entsprach in etwa der Länge der 16S rRNA. Mit dieser synthetisch hergestellten Ribonukleinsäure konnte die Spezifität des Ago-Proteins in Bezug auf Bindung und Abbau untersucht werden. Der Interaktionsversuch der 1,4 kb langen ssRNA in Spur 1 der Abbildung 24 D zeigte, dass das Ago-Protein aus *P. furiosus* in der Lage war, einen Komplex mit der Ribonukleinsäure zu bilden. So konnte man in Spur 1 im oberen Bereich, wie schon in Abbildung 24 A, eine klare Bande erkennen. Die klar definierten Signale im mittleren und unteren Bereich fehlten jedoch in Abbildung 24 D. In Spur 2 und 3 waren die Proben nach Zugabe von MgCl₂ dargestellt, wobei Spur 2 eine Minute, Spur 3 10 Minuten bei 50° C inkubiert wurden. Eine Abnahme der Signalintensität im oberen Gelbereich konnte in beiden Proben im Vergleich zu Spur 1 jedoch nicht verzeichnet werden. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Spur 2 und Spur 3, trotz deutlich längerer Inkubationszeit. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass die Probe keine Verunreinigung in Form einer RNase enthielt. Der Abbau der 16S rRNA in Abbildung 24 B war somit nicht auf eine unspezifische Ribonuklease zurückzuführen sondern fand spezifisch statt.

Wie in Abbildung 24 C bereits gezeigt, wurde auch für die ~1,4 kb lange ssRNA der „Schmier“ zur Kontrolle auf einem 12%igen Nativgel untersucht. Das 12%ige Gel (Abb. 24 E) ermöglichte es, die in Abbildung 24 D erhaltenen Signale deutlicher darzustellen. Ein möglicher RNA-Abbau könnte auf diesem höher verdichteten Gel klarer veranschaulicht werden. Spur 1, welche die ssRNA (1,4 kb), das Argonaute-Protein sowie den Bindepuffer mit MgCl₂ zeigte, offenbarte vor allem im oberen Bereich des Gels starke Signale, wobei klare Banden nur schwer zu erkennen waren. Im unteren Gelbereich

waren kaum deutliche Banden zu erkennen. Spur 1 zeigte das Ergebnis nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei einer Temperatur von 50° C. In Spur zwei wurde dieselbe Probe aufgetragen, jedoch stieg die Inkubationszeit hier auf 20 Minuten bei 50° C. Trotz dieser Veränderung konnte man im Vergleich beider Proben keine klaren Unterschiede erkennen. Auch in Spur 2 waren vor allem im oberen Bereich starke Signale zu erkennen, während im unteren Gelbereich kaum Signale wahrzunehmen waren. Im Gegensatz zum beobachteten 16S rRNA-Abbau (Abbildung 24 C) lagen keine Anzeichen vor, dass die ssRNA vom Argonaute-Protein abgebaut wurde. Auch zeigten diese Ergebnisse, dass keine Ribonukleasen in der Probe enthalten waren, denn dies hätte einen deutlichen Abbau der radioaktiv markierten RNA zur Folge gehabt.

Neben der ~1400 Nukleotide langen RNA wurde auch eine gleichlange DNA den Interaktions- und Schneideexperimenten unterzogen. Die DNA wurde durch den Verdau eines Vektors erhalten. Der verdaute Vektor wurde anschließend auf einem Agarosegel analysiert und die passende Bande ausgeschnitten. Nach der Aufreinigung der ~1,4 kbp langen DNA aus dem Gelblock konnte diese radioaktiv markiert und den Interaktions- und Schneideexperimenten zugeführt werden. Zwischen der radioaktiv markierten DNA und dem Ago-Protein aus *Pyrococcus furiosus* fand keine Interaktion statt (Abb. 24 F). Spur 1 zeigte die Nukleinsäure ohne das Argonaute-Protein. Die DNA wanderte ins Gel und zeigte im oberen Bereich des Gels eine klare Bande. Spur zwei enthielt neben dem DNA-Molekül zusätzlich das Argonaute-Protein. Es war in dieser Spur kein Shift zu erkennen, so dass sich die Bande auf ähnlicher Höhe wie in Spur 1 befand. Die DNA hatte somit nicht mit dem Ago-Protein interagiert. In den Spuren 3 und 4 wurde MgCl₂ beigefügt, um eine mögliche Argonaute-Aktivität zu erhöhen bzw. zu gewährleisten. Beide Proben wurden bei 50° C inkubiert. Die Inkubationszeit betrug für die Probe in Spur 3 eine Minute, Spur 4 wurde für 10 Minuten inkubiert. In beiden Spuren war keine Veränderung im Vergleich zu den Ergebnissen der Spuren 1 und 2 zu erkennen. Auch hier gab es eine klare, definierte Bande im oberen Bereich des Gels. Die längere Inkubationszeit in Spur 4 hatte keinen Einfluss auf dieses Ergebnis.

Die Bindeversuche des Argonaute-Proteins aus *P. furiosus* mit verschiedenen Nukleinsäuren zeigten, dass das Ago-Protein sowohl 16S rRNA, als auch eine gleich lange ssRNA zu binden in der Lage war. Ein ähnlich langes DNA-Molekül konnte jedoch nicht mit dem Ago-Protein interagieren. Durch die Zugabe von MgCl₂ wurde zudem die Nukleaseaktivität des Proteins aktiviert und ein Abbau der radioaktiv markierten 16S rRNA fand statt. Dieser Abbau war im Falle der ssRNA sowie der DNA nicht zu erkennen.

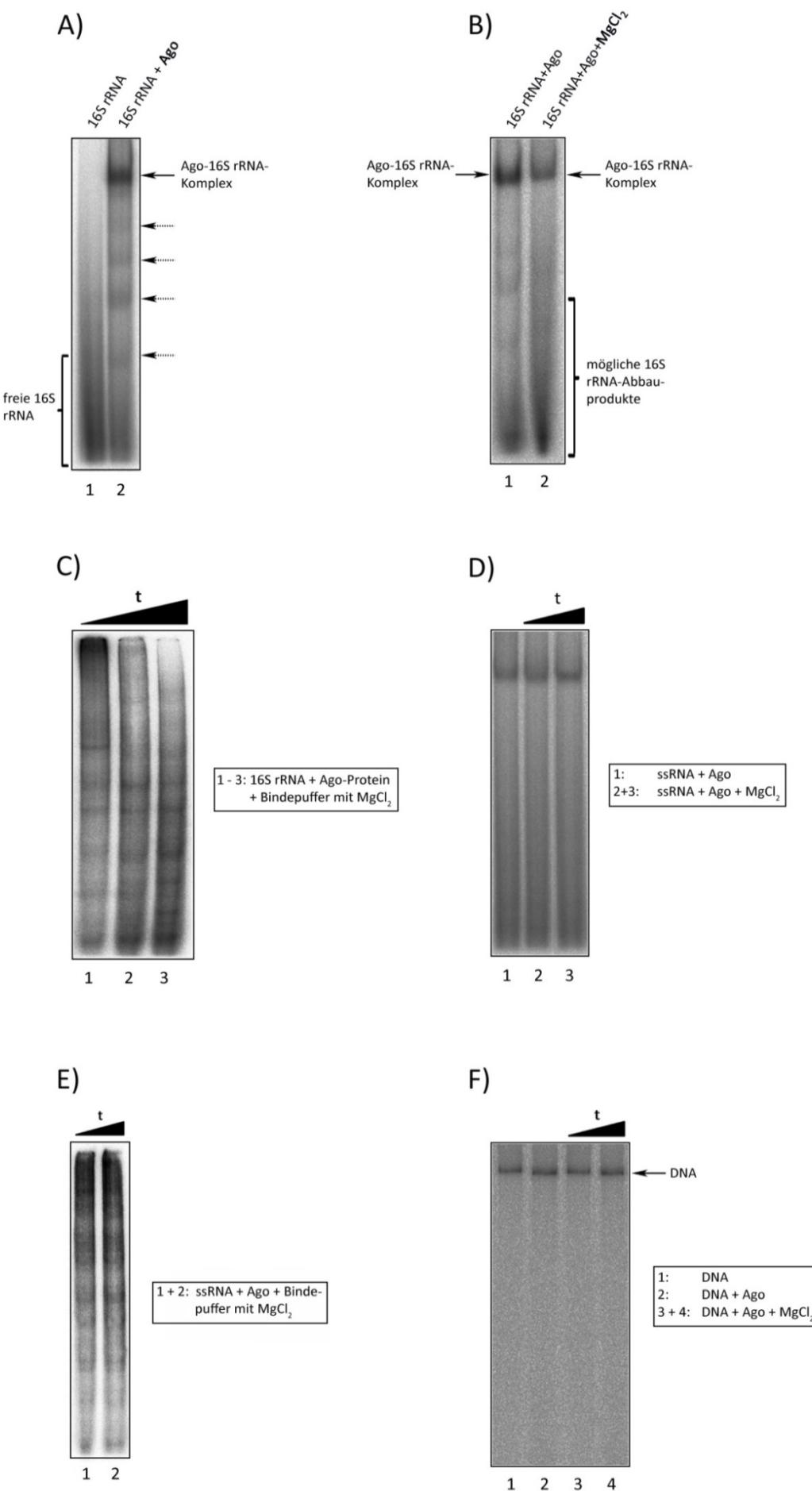


Abbildung 24 Interaktionsanalysen des Argonaute-Proteins mit verschiedenen Nukleinsäuren sowie Spaltexperimente. Spannung 250 V, 1 h A) Radioaktiv markierte 16S rRNA ohne (Spur 1) und mit Argonaute-Protein (Spur 2) analysiert auf einem 6%igen PAA-Gel. In Spur 1 war die freie, ungebundene 16S rRNA erkennbar. Spur 2 mit Ago-16S rRNA-Komplex (durchgezogener Pfeil) sowie möglichen Ago-16S rRNA-Intermediaten (gepunktete Pfeile). B) Radioaktiv markierte 16S rRNA mit Argonaute-Protein analysiert auf einem 6%igen, nativen PAA-Gel; Puffer ohne (Spur 1) bzw. mit (Spur 2) 10 mM MgCl₂. Ago-16S rRNA-Komplexe in den beiden Spuren im oberen Bereich des Gels erkennbar. Mögliche Abbauprodukte im unteren Gelbereich der Spur 2 zu finden. C) Radioaktiv markierte 16S rRNA mit Argonaute-Protein, Bindepuffer und MgCl₂. Analysiert auf einem 12%igen, nativen Gel. Inkubationszeit der Proben bei 50° C variierte von einer Minute (Spur 1) bis zu 10 Minuten (Spur 3). D) Radioaktiv markierte, 1,4 kb lange ssRNA mit Argonaute-Protein analysiert auf einem 6%igen nativen Gel. Spur 1 enthielt den Bindepuffer ohne MgCl₂, die Spuren 2 und 3 waren mit MgCl₂ versetzt. Inkubationszeit bei 50° C variiert von einer Minute (Spur 2) bis zu 10 Minuten (Spur 3). E) Radioaktiv markierte ssRNA (~1,4 kb) mit Argonaute-Protein, Bindepuffer und MgCl₂. Analysiert auf einem 12%igen, nativen Gel. Inkubationszeit der Proben bei 50° C variierte von einer Minute (Spur 1) bis zu 20 Minuten (Spur 2). F) Radioaktiv markierte DNA (~1,4 kbp), Argonaute-Protein, Bindepuffer ohne und mit MgCl₂. Analysiert auf einem 6%igen, nativen Gel. Inkubationszeit der Proben bei 50° C variierte von einer Minute (Spur 3) bis zu 10 Minuten (Spur 4). Freie DNA wurde mit Pfeil gekennzeichnet.

2.11. Suche nach möglichen *guide* RNAs für die abgebaute *target* RNA (16S rRNA) in den Sequenzierungsergebnissen

Da die 16S rRNA in den Schneideversuchen als *target* RNA fungierte, war die Frage der *guide* RNA unbeantwortet. Ein Blick auf die Sequenzierungsergebnisse bzw. die mit dem Ago-Protein präzipitierten kurzen RNAs sollte dieses Rätsel lösen. Dabei wurden die sechs Sequenzen innerhalb der 16S rRNA, welche bei der Sequenzierung besonders hohe Trefferzahlen generierten (Tabelle 3) einer genaueren Analyse unterzogen. Durch die Ergebnisse auf dem Forschungsgebiet der miRNA und deren *seed sequence* konnten die sechs Gipfelsequenzen innerhalb der 16S rRNA auf ihre *guide*-Fähigkeit überprüft werden. Die Nukleotide 2 – 8 am 5'-Ende dieser Sequenzen waren in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Sie repräsentierten die *seed sequence* und spielten bei der Interaktion mit der *target* RNA (in diesem Falle der 16S rRNA) eine entscheidende Rolle.

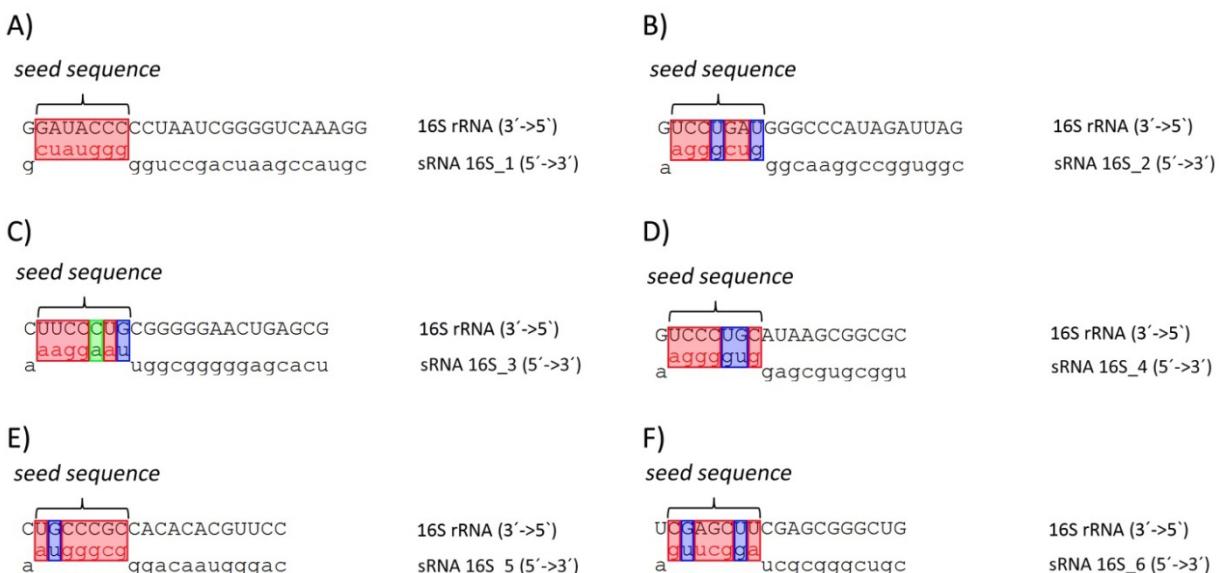


Abbildung 25 Übereinstimmende Bereiche der *seed sequence* der sechs 16S rRNA-Sequenzierungsgipfel sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6 (A-F) mit der 16S rRNA aus *P. furiosus*. Die Sequenzen wurden in 5'->3'-Richtung, die passende 16S rRNA in 3'->5'-Richtung dargestellt. Rote Bereiche zeigten im Bereich der *seed sequence* perfekte Komplementarität, blaue GU-wobble und grüne keine Übereinstimmung.

Die sechs Sequenzen, welche nach der Sequenzierung im Bereich der 16S rRNA eindeutige Gipfel ergaben, zeigten beim Vergleich ihrer *seed sequence* mit der Sequenz der 16S rRNA klare Treffer (Abb. 25 A-F). Dabei offenbarte die Sequenz sRNA 16S_1 eine perfekte Komplementarität zwischen *seed sequence* (Nukleotide 2 – 8 am 5'-Ende) und einem Abschnitt innerhalb der 16S rRNA (Abb. 25 A). Die restlichen fünf Sequenzen ergaben ebenso passende Bereiche inmitten der 16S rRNA, jedoch waren dort vereinzelt *GU-wobble* (Abb. 25 B–F, blaue Bereiche) oder aber keine Übereinstimmungen vorzufinden (Abb. 25 C, grüner Bereich). Trotzdem zeigten diese Analysen, dass zwischen der *seed sequence* der bei der Sequenzierung gefundenen sechs sRNAs (sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6) und der 16S rRNA aus *P. furiosus* deutliche Übereinstimmungen bestanden. Diese Ergebnisse schlugen eine Brücke zwischen den Sequenzierungsergebnissen und den Resultaten der Spaltexperimente mit 16S rRNA.

2.12. Bindungsstellen der *seed sequence* an der 16S rRNA

Um weitere Erkenntnisse in Bezug auf die *seed sequence* und ihre Interaktion mit der 16S rRNA zu gewinnen, wurden die Bindestellen der *guide RNA* an die 16S rRNA analysiert. Die in Abbildung 25 gefundenen Sequenzabschnitte innerhalb der 16S rRNA (Tabelle 4) wurden anschließend auf ihre Position innerhalb der Sekundärstruktur untersucht.

Die ca. 1400 Nukleotide lange 16S ribosomale RNA zeigte eine ausgeprägte Sekundärstruktur (Abb. 26). Neben langen Doppelsträngen durch Watson-Crick-Basenpaarungen waren auch verschiedene Schleifen, sog. *loops*, zu erkennen. Die sechs Interaktionsstellen der *seed sequence* (Tabelle 4) an der 16S rRNA wurden vergrößert dargestellt. Alle sechs Bindungsstellen zeigten eine Gemeinsamkeit. Sie lagen nicht im Bereich langer Doppelstrangabschnitte, sondern hauptsächlich in Gebieten mit *loops* (Abb. 28, rote Abschnitte). Diese *loops* zeichnen sich durch ihre leichte Zugänglichkeit für Interaktionen mit anderen Proteinen, Nukleinsäuren etc. aus. Eine Interaktion mit dem Ago-Protein wäre an diesen Stellen somit sehr wahrscheinlich.

Tabelle 4 Zuordnung der *seed sequence* der einzelnen Sequenzen sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6 zu den jeweils passenden Abschnitten im 16S rRNA Bereich.

Sequenz	Bereich innerhalb der 16S rRNA, an welchem die <i>seed sequence</i> bindet
sRNA 16S_1	137000 – 137006
sRNA 16S_2	137685 – 137691
sRNA 16S_3	136997 – 137003
sRNA 16S_4	138269 – 138275
sRNA 16S_5	138291 – 138297
sRNA 16S_6	137727 – 137733

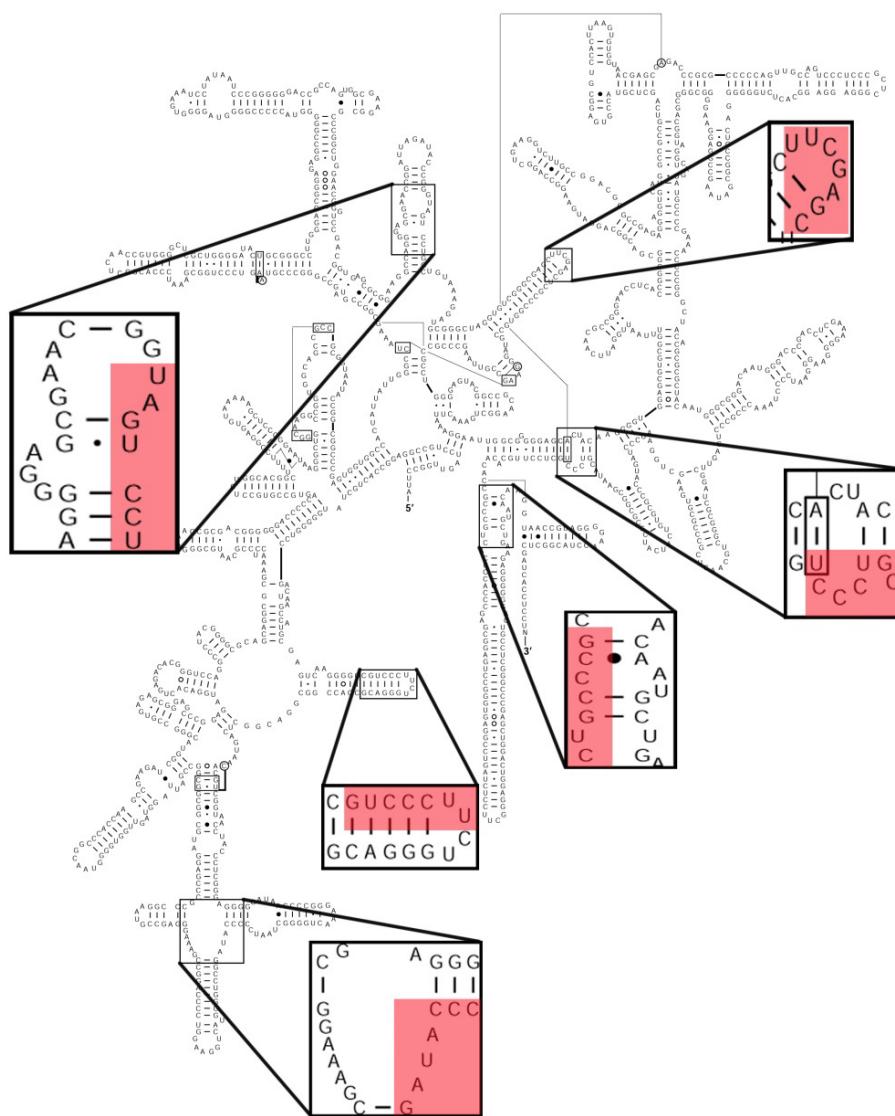


Abbildung 26 Sekundärstruktur der 16S rRNA. Rot unterlegte Sequenzabschnitte in den vergrößerten Bereichen entsprachen den möglichen Interaktionsstellen der *seed sequences* mit der 16S rRNA. (www.rna.icmb.utexas.edu, leicht abgeändert).

2.13. Konstruktion der *P. furiosus* Argonaute-Deletionsmutante Δ PF0537::Tk-SimR

Durch Experimente des Ago-Proteins mit 16S rRNA konnte die Nukleaseaktivität des Proteins nachgewiesen werden (Abb. 24). Diese Tatsache lässt auf eine essentielle Funktion des Proteins schließen. Um diesen Ansatz zu untermauern wurde das Argonaute-Protein in *P. furiosus* ausgeknockt und die Auswirkungen dieser Maßnahme auf den Organismus analysiert. Für die Erzeugung des Stammes *P. furiosus* Δ PF0537 wurde das Ziel-Gen PF0537, welches für das Argonaute-Protein kodiert, durch den Simvastatin Selektionsmarker (TK0149) ersetzt (Abb. 27). Die durch diesen Austausch erlangte Resistenz gegen das Antibiotikum Simvastatin erlaubt eine anschließende Selektion.

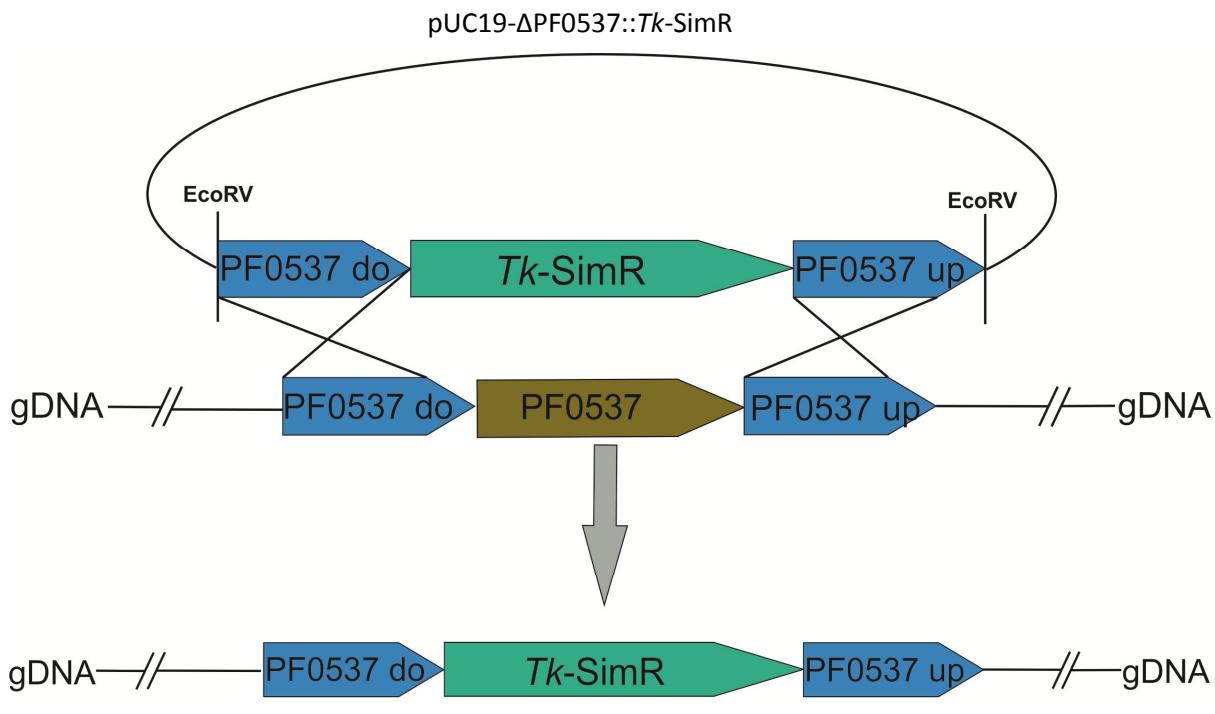


Abbildung 27 Schematische Darstellung der erfolgten Rekombination in den gDNA-Abschnitt am Genlocus PF0537. Gezeigt wurde der gDNA-Bereich des *P. furiosus* Wildtypstamms, sowie der Argonaute-Deletionsstamm nach erfolgreicher Rekombination

2.13.1. Herstellung der ΔPF0537::Tk-SimR - Kassette

Um die homologe Rekombination des DNA-Konstrukt mit der gDNA in *P. furiosus* zu ermöglichen, musste die Simvastatin-Resistenzkassette *Tk*-SimR mit flankierenden Regionen des *Pf*-Argonaute-Proteins (PF0537) fusioniert werden (Abb. 27). Die verwendeten Regionen waren ca. 600 (PF0537 do) bzw. ca. 700 bp (PF0537 up) lang.

Die drei zu fusionierenden Fragmente wurden wie unter II. 18.1. beschrieben mittels PCR hergestellt. In Abbildung 28 A war zu erkennen, dass sowohl das DNA-Fragment PF0537_do (~600 bp, Spur 2) als auch das Konstrukt PF0537_up (~700 bp, Spur 3) mittels PCR hergestellt werden konnten. Beide DNA-Sequenzen hatten die erwartete Länge. Selbiges galt für die *Tk* SimR-Kassette, welche mit ~1600 bp im Agarosegel ein zufriedenstellendes Ergebnis lieferte (Abb. 28 B, Spur 2). Die Banden wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Durch Fusions-PCR konnten die einzelnen Fragmente zusammengefügt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert werden. Den Anfang machte die Fusion der Resistenzkassette *Tk* SimR mit PF0537_do zum Fusionsprodukt 1 mit einer Länge von ~2200 bp (Abb. 28 C, Spur 2). Die obere, dicke Bande entsprach hierbei dem Fusionsprodukt 1, während die anderen Signale auf Nebenprodukte der PCR zurückzuführen waren.

Anschließend erfolgte die Fusion des Fusionsprodukt 1 mit PF0537_up zur ΔPF0537::Tk-SimR – Kassette. In Abbildung 28 D war in Spur 2 auf Höhe von ~2900 bp dieses Produkt zu erkennen. Auch in diesem Ansatz waren erneut Nebenprodukte zu sehen, welche jedoch keinen Einfluss auf die weitere Vorgehensweise hatten. Die ΔPF0537::Tk-SimR – Kassette war somit komplett und konnte zur Vervielfältigung in einen Vektor kloniert werden. Vorher musste sie jedoch aus dem Gel

ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt werden. Anschließend erfolgte eine photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.

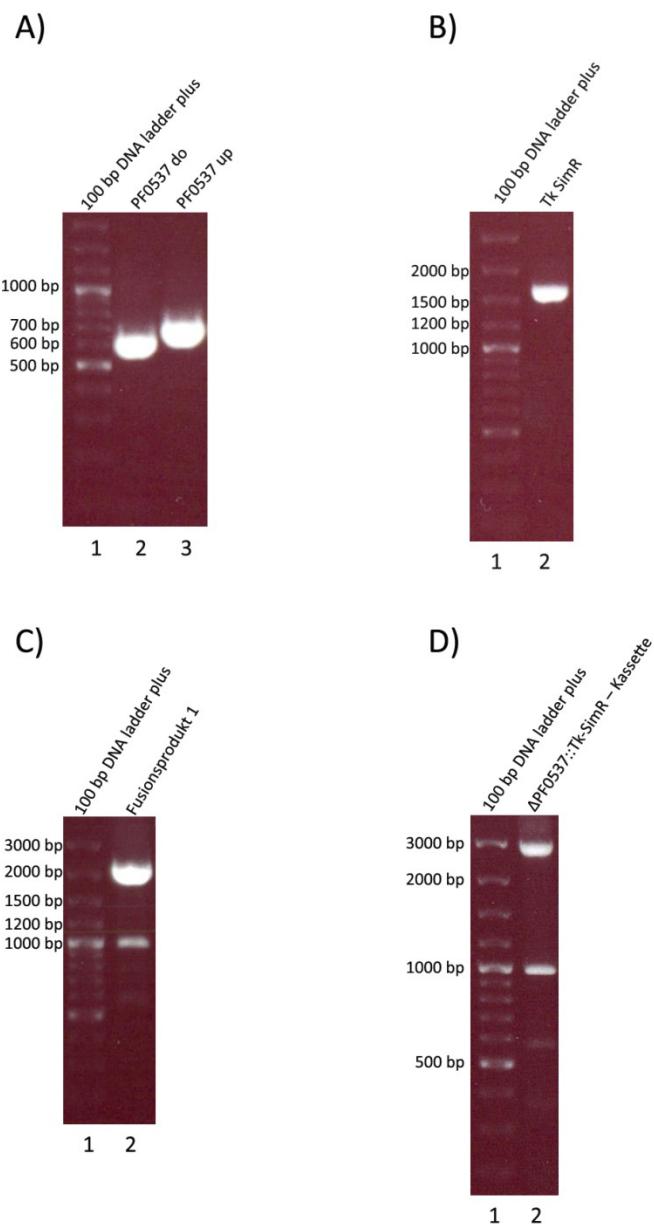


Abbildung 28 Agarosegel-Elektrophorese der DNA-Fragmente, welche durch PCR bzw. Fusions-PCR hergestellt wurden; 1%iges Agarosegel, 100 bp DNA ladder jeweils ins Spur 1. A) PF0537_do (~600 bp, Spur 2) und PF0537_up (~700 bp, Spur 3) nach PCR. B) Fragment TK_SimR nach PCR (~1600 bp, Spur 2). C) Fusionsprodukt 1 (~2200 bp, Spur 2) nach Fusions-PCR der Fragmente Tk_SimR mit PF0537_do. D) ΔPF0537::Tk-SimR – Kassette nach Fusion von Fusionsprodukt 1 mit PF0537_up (~2900 bp, Spur 2).

2.13.2. Herstellung von pUC19- Δ PF0537::Tk-SimR

Für eine erfolgreiche Transformation war die Menge an Δ PF0537::Tk-SimR – Kassette jedoch noch zu wenig. Daher musste das klonierte DNA-Stück vervielfältigt werden. Als Vektor für die identische Vervielfältigung der Δ PF0537::Tk-SimR – Kassette diente pUC19. Nach der Hydrolyse des Vektors und der konstruierten Kassette sowie deren Ligation (II. 18.1.) konnte das gesamte Konstrukt in DH5 α -Zellen transformiert werden. Nach der Transformation und Blau-Weiß-Selektion wurden 5 weiße Kolonien durch Kolonie-PCR auf Aufnahme des Plasmids pUC19- Δ PF0537::Tk-SimR überprüft (Abb. 29 A). Klon 3 (Spur 4) und Klon 4 (Spur 5) zeigten das erwartete PCR-Signal auf Höhe von ~2900 bp, wohingegen Klon 1, 2 und 5 kein positives Ergebnis lieferten.

Nach der Kolonie-PCR wurden die Kolonien der positiven Klone 3 und 4 in 5 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium angeimpft. Nach 15 h Inkubation bei 37 °C erfolgte eine Plasmidpräparation. Das Plasmid pUC19- Δ PF0537::Tk-SimR wurde anschließend einer Restriktionshydrolyse unterzogen. Dadurch konnte festgestellt werden, ob die Fusions-PCR sowie die Ligation und Transformation gut funktioniert hatten. Als Restriktionsenzym wurde *Sall* und *Pvull* gewählt. *Sall* schnitt das konstruierte Plasmid an einer Stelle, wodurch dies linearisierte (~5600 bp). *Pvull* hingegen schnitt das Plasmid doppelt und ergab dadurch bei positiv verlaufener Ligation zwei unterschiedlich große DNA-Fragmente (~3200 bp und ~2400 bp).

Der Restriktionsverdau verlief positiv (Abb. 29 B). Beide Klone lieferten sowohl den passenden, linearisierten Vektor (Spur 2 bzw. 4) als auch die zu erwarteten Teilstücke nach Hydrolyse mit *Pvull* (Spur 3 bzw. 5). Zur weiteren Überprüfung wurden die Sequenzen der beiden isolierten Plasmide analysiert. Diese Überprüfung bestätigte den korrekten Einbau des Inserts. Eine Sicherungskultur dieses Klons und der Plasmidpräparation ist unter dem Namen pMUR315 – 80°C hinterlegt.

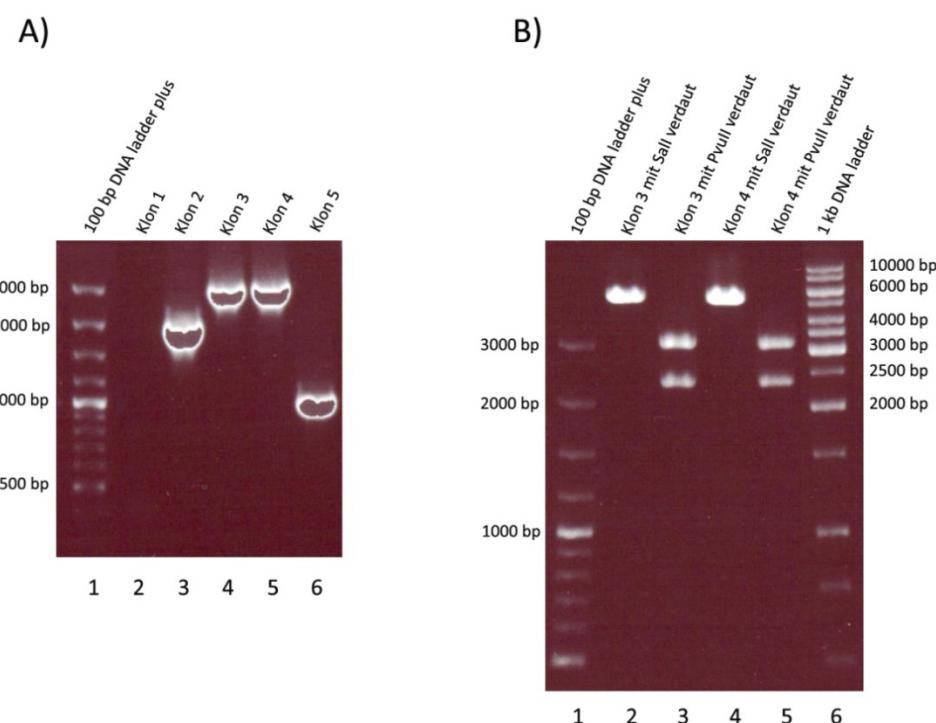


Abbildung 29 Agarosegele mit den Produkten der Kolonie PCR sowie eines Restriktionsverdaus. A) Die Klone 3 (Spur 4) und 4 (Spur 5) zeigten ein passendes PCR-Produkt (~2900 bp), wohingegen die Klone 1 (Spur 2), 2 (Spur 3) und 5 (Spur 6) kein positives Ergebnis aufwiesen. Standard 100 bp ladder plus in Spur 1 B). Restriktionsverdau der Klone 3 (Spur 2 + 3) und 4 (Spur 4 + 5) mit den Enzymen *Sall* bzw. *Pvull*. Als Standards wurden 100bp DNA ladder plus (Spur 1) sowie 1 kb DNA ladder benutzt (Spur 6).

2.13.3. Transformation und Selektion in *P. furiosus*

Vor der Transformation in *Pyrococcus furiosus* wurde das Plasmid pUC19-ΔPF0537::Tk-SimR der Klone 3 und 4 einer Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* unterzogen. Dadurch erhielt man das lineare DNA-Konstrukt, welches für die homologe Rekombination essentiell war. Um sicher zu gehen, dass die Hydrolyse vollständig war, wurde ein Teil des Restriktionsansatzes auf einem horizontalen Agarosegel analysiert. Da eine Spaltung mit *EcoRV* alleine zwei ähnlich große DNA-Fragmente (DNA-Konstrukt und Rest vom Vektor) lieferte, wurde zusätzlich noch mit *ApaLI* hydrolysiert. *ApaLI* schneidet den Vektor an drei Stellen, wodurch kleine DNA-Fragmente mit ~1250 bp, ~750 bp, ~500 bp sowie ~250 bp entstanden. Das DNA-Konstrukt war somit leicht von den Resten des Vektors zu unterscheiden. Wie in Abbildung 30 A zu erkennen, hatte die Hydrolyse bei Klon 3 sowie Klon 4 funktioniert. Neben der starken Bande auf Höhe von ~2,9 kbp (DNA-Konstrukt) wurden weitere Banden gefunden, welche dem hydrolysierten pUC19 Vektor entsprachen (Spur 2 + 3).

Die Transformation wurde wie unter II. 3.8. beschrieben, durchgeführt. Als Positivkontrolle diente der Vektor pMUR93. Dieser wurde von Robert Reichelt zur Verfügung gestellt. Die Negativkontrolle stellten *P. furiosus* Wildtypzellen dar, welche bei der Transformation im Trafoansatz keine DNA und somit auch keine Simvastatin-Resistenzkassette erhielten. Nach 48 h Inkubation in den Serumfläschchen waren nur in der Positivkontrolle mit dem Vektor pMUR93 Zellen zu finden. Die Zelldichte betrug 1×10^8 Zellen/ml. In den Serumfläschchen mit den Trafoansätzen Klon 3 und Klon 4 zum Knock-out des Argonaute-Proteins waren unter dem Mikroskop keine Zellen zu erkennen. Selbiges galt für die Negativkontrolle mit den *P. furiosus* Wildtypzellen.

Es wurde jeweils 2 ml Flüssigkultur abgenommen, abzentrifugiert und in 100 µl ½ SME Medium (mit Stärke, Pepton und Hefeextrakt) aufgenommen. Die Ansätze Klon 3, Klon 4 sowie die Negativkontrolle wurden unverdünnt auf Gelrite-Platten ausplattiert, welche vorher eine Behandlung mit Simvastatin erfuhrten. Die Positivkontrolle musste aufgrund der starken Zelldichte 1:10000 verdünnt und anschließend ausplattiert werden. Nach 48 h Inkubation bei 85 °C im Anaerobentopf (Eigenbau der Werkstatt) konnten nur auf den Platten mit dem pMUR93-Vektor Kolonien gefunden werden (~100 Stück). Auf den anderen Gelrite-Platten waren keine Kolonien gewachsen.

Um zu überprüfen, ob die Knock-out-Mutation der Positivkontrolle funktioniert hatte, wurden zwei Kolonien von den Gelrite-Platten in 25 ml Flüssigkultur (+Simvastatin) angeimpft und über Nacht bei 85 °C inkubiert. Die DNA wurde mittels Schnelltest (II. 3.9.3.) isoliert und eine anschließende PCR mit den Primern TFENups-93F sowie TFENDownR durchgeführt (erhalten von Robert Reichelt).

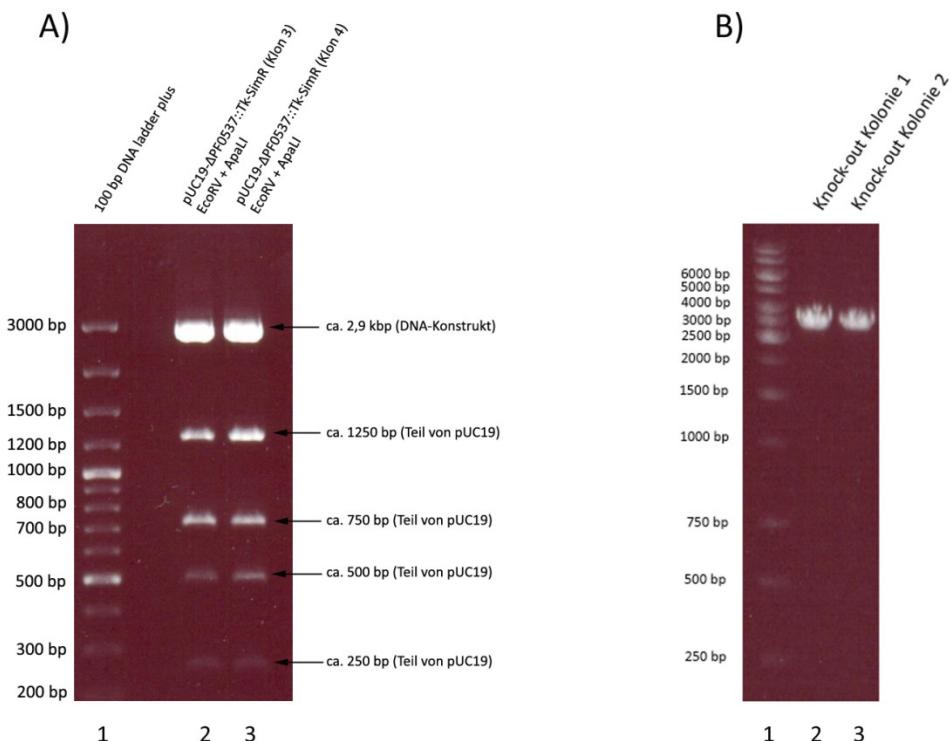


Abbildung 30 Restriktionshydrolyse des Vektors pUC19-ΔPF0537::Tk-SimR sowie Überprüfung des PCR-Produktes nach der Trafo. A) Restriktionshydrolyse des Vektors pUC19-ΔPF0537::Tk-SimR mit den Restriktionsenzymen EcoRV und ApaI. Vektor aus Klon 3 (Spur 2) sowie aus Klon 4 (Spur 3) wurden hydrolysiert. Standard 100 bp DNA ladder plus in Spur 1. B) Agarosegel des PCR-Produktes nach der Isolierung der DNA aus den Knock-out Kolonien 1 (Spur 2) und 2 (Spur 3). Signal auf Höhe von ~3500 bp erwartet. In Spur 1 befand sich der 1 kb DNA Ladder Standard.

Das Ergebnis der PCR wurde auf einem Agarosegel analysiert (Abb. 30 B). In den Spuren der beiden von den Gelrite Platten isolierten Kolonien war auf Höhe von ~3500 bp ein Signal zu erkennen (Spur 2 und 3). Hierbei handelte es sich um das PCR-Produkt, welches nach erfolgreicher Transformation und homologer Rekombination des Inserts aus pMUR93 in den *P. furiosus*-Zellen nachzuweisen war. Das Ergebnis zeigte also, dass der Knock-out der Positivkontrolle funktioniert hatte und die Simvastatin-Resistenzkassette erfolgreich in das Genom integriert wurde.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses musste erneut eine Transformation durchgeführt werden. Hierzu wurden leichte Veränderungen im Versuchsablauf vorgenommen. Der Transformationsansatz, welcher bisher in 25 ml Flüssigkultur im Serumfläschchen inkubiert wurde, kam nach dem Hitzeschock und dem zehnminütigen Inkubationsschritt bei 4 °C unverdünnt auf die mit Simvastatin vorbehandelten Gelrite-Platten. Die Inkubation im Flüssigmedium wurde übersprungen. Erneut wurden nur auf der Platte mit dem Insert des pMUR93-Vektors Kolonien (~50 Stück) gefunden. Dieses Ergebnis zeigte, dass das Versuchsprotokoll keine Fehler aufwies. Die Gelrite-Platten mit dem Argonaute-Knock-out-Ansatz konnten jedoch keine Kolonien vorweisen. Es bestätigte sich das Ergebnis der ersten Transformation. Der Knock-out des Ago-Proteins in *P. furiosus* war letal für den Organismus. Diese Erkenntnis unterstrich die wichtige Funktion des archaeellen Argonaute-Proteins.

IV. Diskussion

Kleine, nicht kodierende RNAs sind in allen drei Domänen des Lebens zu finden (Eddy, 2001; Mattick, 2001; Huttenhofer *et al.*, 2002), jedoch ist im Reich der *Archaea* über diese besondere Art von RNA noch relativ wenig bekannt. Die ersten Versuche, small RNAs in Archaeen zu entdecken, fanden durch computergestützte Vorhersagen statt. Dazu wurde das Genom von *M. jannaschii* sowie *P. furiosus* bioinformatisch untersucht (Klein *et al.*, 2002; Schattner 2002). In den folgenden Jahren wurden durch computergestützte Untersuchungen zusätzlich zu diesen beiden Organismen auch in anderen Archaeen sRNAs gefunden (Schattner, 2002; Babski *et al.*, 2011). Neben diesen bioinformatischen Ansätzen konnten zusätzlich dazu mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen und dem Anlegen von cDNA-Librarys (inkl. deren Sequenzierung) viele neue small RNAs entdeckt werden (Zago *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2010; Heyer *et al.*, 2012). Aufgrund der Ergebnisse von Knock-out-Untersuchungen für einige gefundene sRNAs wird vermutet, dass diese für die Regulation des Stoffwechsels in Archaeen verantwortlich sein könnten (Straub *et al.*, 2009; Jäger *et al.*, 2012). Außerdem wurden in ~90 % aller Archaeen Abschnitte im Genom gefunden, welche für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, kurz CRISPR, kodieren (Jansen *et al.*, 2002; Grissa *et al.*, 2007). In der Domäne der *bacteria* sind diese kurzen RNAs für die Resistenz gegen das Eindringen von fremdem Erbgut durch Viren oder Plasmide verantwortlich. Die Aufgabe in Archaeen ist jedoch unbekannt.

1. Charakterisierung des oligomeren LSm-Proteinkomplexes

Zu Beginn dieser Arbeit war über die oligomere Struktur des LSm-Proteins in Archaeen wenig bekannt. Lediglich Kristallstrukturuntersuchungen des Proteins aus *Pyrobaculum aerophilum* lagen vor und gaben Hinweise darauf, dass sich das archaeelle LSm-Protein zu heptameren Komplexen zusammenfügt (Achsel *et al.*, 2001; Mura *et al.*, 2001; Törö *et al.*, 2001). Ein weiterer Vertreter aus der Domäne der Archaeen, *Archaeoglobus fulgidus*, ist in der Lage einen hexameren (Törö *et al.*, 2002) oder heptameren (Achsel *et al.*, 2001) Komplex zu formen. Zudem wurde gezeigt, dass das LSm3-Protein der *Crenarchaeota* in Lage ist, Komplexe aus 14 monomeren Proteinen zu bilden (Mura *et al.*, 2003 b). Um die Zusammensetzung des oligomeren Komplexes in Archaeen weiter zu entschlüsseln, wurden Untersuchungen am LSm-Protein aus *P. furiosus* durchgeführt. Dazu wurde das Protein, welches bereits während der Diplomarbeit in einen Expressionsvektor kloniert wurde, in *E. coli*-Zellen transformiert und exprimiert. Das Protein erfuhr aufgrund des künstlich eingefügten His-Tags eine Aufreinigung mittels Ni-NTA-Säule sowie eine anschließende chromatographische Auftrennung an der HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Säule. Die Superdex Säulen können neben der Aufreinigung von Proteinproben auch zu analytischen Gelfiltrationen eingesetzt werden. Diese ergab für den oligomeren Komplex ein Molekulargewicht von 74 kDa, was sieben LSm-Proteinmonomeren (10,7 kDa) entsprach. Das LSm-Protein aus *P. furiosus* bildet somit einen homoheptameren Proteinkomplex. Bestätigt werden konnte dies durch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse. Im halophilen Archaeum *Haloferax volcanii* wurde durch spezielle massenspektrometrische Methoden (LILBID = *Laser-induced Liquid Bead Ion Desorption-MS*) ebenfalls ein heptamerer Komplex nachgewiesen (Fischer *et al.*, 2010). In *Haloferax volcanii* liegt ebenso wie in *Pyrococcus furiosus* nur ein LSm-Protein vor. Archaeen mit einem Vertreter der LSm-Proteinfamilie zeigten somit

hauptsächlich Komplexe aus 7 Monomeren. Einige wenige können auch Komplexe aus 14 monomeren Proteinen bilden (Mura *et al.*, 2003 a). Dies konnte im Fall von *P. furiosus* jedoch nicht nachgewiesen werden. Hier lag das LSm-Protein nur als Homoheptamer vor.

2. Klonierung und Expression des Argonaute-Proteins in *P. furiosus*

Neben dem LSm-Protein konnte man in *P. furiosus* noch weitere interessante Proteine finden, welche zur Interaktion mit Nukleinsäuren in der Lage waren. Eines dieser Proteine war das Argonaute-Protein, dessen Funktion in Archaeen noch nicht geklärt werden konnte. Den ersten Schritt zur Entschlüsselung seiner Funktion stellte die Aufreinigung des Proteins dar. Aufgrund des kürzlich publizierten genetischen Systems für *P. furiosus* (Waege *et al.*, 2010) konnte mit Hilfe des Shuttlevektors pYS3 das Ago-Protein in *P. furiosus* exprimiert werden. Der ~2500 bp lange, für das Ago-Protein kodierende Genabschnitt (mit Terminator) wurde zur Erhöhung der Proteinausbeute mit einem starken Promotor versehen. Dazu wählte ich den Fruktose-1,6-Bisphosphatase-Promotor, welcher durch die Zugabe von Pyruvat im Medium sehr stark abgelesen wurde. Die beiden Sequenzabschnitte wurden mittels Fusion-PCR zusammengefügt, in den Vektor pYS3 kloniert und in *E. coli*-Zellen transformiert um die Menge an Vektor zu erhöhen. Positive Klone wurden einer Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit unterzogen und die erhaltenen Vektoren mittels Sequenzanalyse überprüft. Da diese Analyse die passenden Ergebnisse lieferte, konnte der Vektor in *P. furiosus*-Zellen transformiert und in einem 100 Liter Fermenter mit Pyruvat gezüchtet werden. Die erhaltenen Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und nach einer Aufreinigung mittels Ni-NTA-Säule auf einem SDS-Gel überprüft. Die Fraktion enthielt mehrere Bänder, wobei eine Bande auf Höhe von ~95 kDa aufgrund ihrer Intensität deutlich herausstach. Dies passte zu der für Argonaute-Proteine vorhergesagten Größe von ~100 kDa (Cerutti *et al.*, 2000). Da neben diesem Signal noch weitere Bänder zu erkennen waren, wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt durchgeführt. Dazu gehörte eine Gelfiltration durch eine HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Säule sowie die anschließende Kontrolle auf einem SDS-Gel. Dabei zeigte die aufgereinigte Fraktion nach der Auftrennung der Moleküle nach Größe erneut ein sehr starkes Signal im Bereich von etwa 100 kDa. Es handelte sich wohl hierbei wohl um das Ago-Protein. Zudem waren auf Höhe von ~45 kDa sowie ~30 kDa noch leichte Proteinsignale zu erkennen. Verglich man die Intensität dieser beiden Signale mit denen nach der Ni-NTA-Säule, so erkannte man, dass die weitere Aufreinigung des Ago-Proteins durch die Gelfiltration sehr gut funktioniert hatte. Das Protein lag somit in einer Form vor, welche weiterführende Experimente erlaubten. Eines dieser Experimente war die Entschlüsselung von Proteinen, welche mit dem Argonaute-Protein aus *P. furiosus* interagierten.

3. Entschlüsselung möglicher Interaktionspartner durch Saccharose-Dichtegradienten

Das in *P. furiosus* exprimierte und über Ni-NTA sowie Gelfiltration aufgereinigte Ago-Protein wurde auf mögliche Interaktionspartner untersucht. Im Hinblick auf Interaktionen mit Argonaute wurde die GW182-Proteinfamilie bisher am besten analysiert. Sie ist in Verbindung mit Ago bei der posttranskriptionellen Genexpressionsregulation von zentraler Bedeutung und besitzt am N-Terminus mehrere Glycin-Tryptophan-(GW/WG-)Sequenzwiederholungen, den sogenannten Ago-*hook* (engl. für Ago-Haken). Dieser ermöglicht ihnen die Interaktion mit der PIWI-Domäne des Argonaute-Proteins (Till *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2009 b). Die Suche nach möglichen archaeellen Interaktionspartnern des Ago Proteins erfolgte über einen Saccharose-Dichtegradienten. Das zuvor in *P. furiosus* exprimierte aufgereinigte Ago-Protein wurde durch einen linearen 15-55% Saccharosegradienten analysiert. Nach der Ultrazentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen gesammelt und auf einem SDS-Gel analysiert, welches zusätzlich noch eine Silberfärbung erfuhr. Man konnte in den Fraktionen 6 – 10 erneut die bereits bekannte Bande auf Höhe von ~95 kDa erkennen, welche das Argonaute-Protein repräsentierte (III. Abb. 13). Außerdem war in den Fraktionen 6 – 9 ein Signal bei etwa 45kDa ersichtlich. Auffällig war zudem, dass das Intensitätsmaximum beider Banden jeweils in den Fraktionen 7 und 8 lag und die Stärke der Banden in früheren bzw. späteren Fraktionen abnahm. Dies sprach eindeutig für eine Interaktion beider Proteine. Die in den Saccharose-Dichtegradienten eingesetzte Probe zeigte neben dem starken Signal des Ago-Proteins auf Höhe von ~45 kDa sowie ~30 kDa noch leichte Proteinsignale (III. Abb. 12). Nach dem Dichtegradienten war das Signal bei ~30 kDa verschwunden und spielte als Interaktionspartner daher wohl keine Rolle. Die Proteinbande bei ~45 kDa wurde daraufhin ausgeschnitten und einer massenspektroskopischen Untersuchung unterzogen. Diese ergab, dass es sich bei dem Protein um PF1848, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA Reduktase) aus *P. furiosus* handelte. Eine Analyse der Aminosäuresequenz der HMG-CoA-Reduktase zeigte, dass kein Ago-*hook* bzw. keine GW/WG-Sequenzen im N-terminalen Bereich des Proteins vorlagen. Es gibt somit im Falle des archaeellen Ago-Proteins keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen Ago-*hook* und der PIWI-Domäne. Außerdem konnten im Genom von *P. furiosus* keine für die GW182-Proteinfamilie kodierenden Bereiche gefunden werden. Die Interaktion könnte somit über andere Domänen stattfinden. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die HMG-CoA-Reduktase Einfluss auf miRNAs und somit auf die Aktivität des RISC hat (Gibbings *et al.*, 2009; Brodersen *et al.*, 2012; Shi und Ruvkun, 2012). Die HMG-CoA Reduktase spielt als regulatorisches Enzym in der Isoprenoid-Biosynthese eine entscheidende Rolle. Knockt man dieses Enzym in *Arabidopsis thaliana* aus, ist die Interaktion von Argonaute-Protein und Membran gestört bzw. findet nicht mehr statt (Brodersen *et al.*, 2009). Außerdem wurde in *Caenorhabditis elegans* gezeigt, dass die Produkte der Isoprenoid-Biosynthese für die Aktivität der miRNAs und somit der Argonaute-Proteine entscheidend sind (Shi und Ruvkun, 2012). Eine direkte Interaktion der HMG-CoA Reduktase mit dem Ago-Protein wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt. Möglicherweise spielt die HMG-CoA Reduktase bei der Erkennung der *target* RNA und *guide* RNA eine entscheidende Rolle. Da in *P. furiosus* kein Vertreter der GW182-Proteinfamilie gefunden werden konnte, wäre der HMG-CoA-Reduktase auch eine wichtige Funktion nach der Interaktion des Ago-Proteins mit *guide* und *target* RNA zuzutrauen. So übernimmt die GW182-Proteinfamilie in Eukaryoten nach dem Kontakt mit dem Ago-Protein die weiteren Folgeschritte, welche für das Gen-Silencing notwendig sind. Außerdem ist GW182 für das Entlassen der *target* RNA nach dem Gen-Silencing zuständig (Fabian *et al.*, 2009; Zekri *et al.*, 2009). Eventuell könnte die prokaryotische HMG-CoA-Reduktase diese

Aufgaben übernehmen und bei einem Abbau der ribosomalen RNA eine wichtige Rolle spielen oder aber für die Freigabe der rRNA verantwortlich sein.

4. Test der aufgereinigten der IgG-Fraktionen (Ago) durch Western-Blot-Experimente

Für weiterführende Experimente war ein aufgereinigter und funktionsfähiger Antikörper nötig. Nur so konnte die am Ago-Protein gebundene Nukleinsäure gewonnen und analysiert werden. Wichtig war in diesem Zusammenhang die Interaktion mit dem Antigen. Um diese Interaktion prüfen zu können, wurde der Antikörper im Western-Blot getestet. Untersucht wurde die Spezifität der IgG-Fraktion sowohl am *P. furiosus* Rohextrakt als auch am bereits aufgereinigten Ago-Protein aus *P. furiosus*. Man konnte in beiden Proben eine klare Bande auf Höhe von etwa 100 kDa erkennen (III. Abb. 14). Hierbei handelte es sich um das Argonaute-Protein, welches auch schon in den anderen Gelen auf dieser Höhe zu finden war (III. Abb. 12). In der Fraktion des aufgereinigten Argonaute-Proteins war über der dünnen Bande ein deutliches, weißes Signal zu sehen. Hierbei handelte es sich um eine sogenannte „ghost band“. Diese Banden entstehen bei zu viel eingesetzten primären oder sekundären Antikörpern. Außerdem kann eine zu hohe Konzentration des Antigens auf der Membran ebenfalls zu diesem Phänomen führen. Da es nur in der Spur mit dem aufgereinigten und somit konzentrierten Protein eintrat, lieferte Letzteres die Erklärung für die „ghost band“. Neben dieser Bande waren in beiden Proben keine weiteren Signale zu erkennen. Dies verdeutlicht die Spezifität und Funktionsfähigkeit des Antikörpers, welcher für weiterführende Experimente geeignet war.

5. Überprüfung der Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analysen

Um den Erfolg und die Spezifität der Immunpräzipitation auf Proteinebene zu überprüfen, wurden nach der Präzipitation und mehreren Waschschritten die erhaltenen Präzipitate in Western-Blot-Analysen eingesetzt. Mit dieser Versuchsreihe sollte nachgewiesen werden, ob mit den aufgereinigten Antikörpern das Argonaute-Protein erfolgreich präzipitiert werden konnte. Wie in III. Abb. 15 ersichtlich gelang dies. Zusätzlich waren noch hochmolekulare Signale erkennbar, bei welchen es sich um Komplexe handelte, die das Ago-Protein beinhalteten. Durch längere Aufkochzeiten vor dem Auftrag aufs Gel hätte dies wohl verhindert werden können. In den letzten Jahren wurde via Dichtegradientenzentrifugation drei Ago-Komplexe aus Totallysat menschlicher Zellen erhalten (Höck *et al.*, 2007). Diese variierten in ihrer Größe zwischen 300 und mehr als 900 kDa, wobei zwei der drei Komplexe mit ribosomalen Proteinen sedimentierten. Auch wenn ein Vergleich zwischen Archaeen und humanen Zellen schwer fällt, so könnte es sich auch bei den hochmolekularen Komplexen in III. Abb. 15 um ribosomale Proteine handeln, welche aufgrund ihrer Interaktion mit RNA und Argonaute nicht ins Gel gewandert waren.

Im Zusammenhang mit dem Antikörper stellte sich zudem die Frage, welche Nukleinsäure mit dem Argonaute-Protein co-immunpräzipitiert. Diese Frage konnte für das prokaryotische Protein noch nicht eindeutig geklärt werden. Daher war die Identifikation der an das Ago-Protein gebundenen Nukleinsäure der nächste Schritt.

6. Identifizierung der an Ago gebundenen Nukleinsäuren

Um die Funktion des Argonaute-Proteins in Archaeen zu entschlüsseln war es wichtig herauszufinden, mit welcher Art Nukleinsäure Ago interagierte. Hierzu wurden Co-Immunpräzipitationen mit dem Ago-Antikörper durchgeführt. Durch die Behandlung der präzipitierten und radioaktiv markierten Nukleinsäuren mit DNasen und RNAsen konnte festgestellt werden, dass es sich um RNA handelte (III. Abb. 16). Es wurde lange vermutet, dass das prokaryotische Ago-Protein aufgrund der Struktur seiner PIWI Domäne DNA als *guide* Nukleinsäure bevorzugt (Jinek und Doudna, 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Domäne in der Lage war, die RNA in einem DNA-RNA-Hybrid zu spalten (Jinek und Doudna, 2009). Für prokaryotische Ago-Proteine wurde jedoch kürzlich herausgefunden, dass sie sowohl DNA als auch RNA als *guide* Nukleinsäure benutzen können (Olovnikov *et al.*, 2013). Auch wurde gezeigt, dass das prokaryotische Argonaute-Protein kurze DNA-Moleküle zur Abwehr von Fremd-DNA binden kann (Swarts *et al.*, 2014). Meine Ergebnisse für das archaeelle Ago deuteten darauf hin, dass als primärer Interaktionspartner RNA bevorzugt wird. RNA als *guide* sowie *target* RNA würde eine funktionelle Ähnlichkeit zu dem RNA-induced silencing complex bedeuten, welcher eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression spielt. Jedoch fehlen im Vergleich zu dieser Form der RNA-Interferenz in *P. furiosus* die dazu benötigten Proteine wie Dicer, GW182 und PABP. Eine *target* RNA in Form von mRNA scheint daher unwahrscheinlich. Möglicherweise bilden andere RNA-Arten den Interaktionspartner der *guide* RNA. Um die *guide* RNA zu identifizieren und weitere Hinweise auf die Natur der *target* RNA zu finden wurden die präzipitierten Nukleinsäuren einer *High-Throughput* Sequenzierung unterzogen.

7. Klonierung der präzipitierten Ribonukleinsäure und qualitative Analyse durch das KFB

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse und der damit verbundenen Tatsache, dass es sich bei der präzipitierten Nukleinsäure um RNA handelte, wurde diese für eine Sequenzierung vorbereitet. Nur so konnte man die Herkunft RNA feststellen. Für die Sequenzierung wurden die präzipitierten Nukleinsäuren mit speziellen 3'- und 5'- Adaptoren versehen, mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch eine Scale-up PCR vervielfältigt. Die erhaltenen DNA-Moleküle wurden auf einem 6%igen PAA Gel analysiert (III. Abb. 17). Das auffälligste Signal lieferte eine Bande auf Höhe von ~120 kDa. Hierbei handelte es sich um das Ligationsprodukt der Adaptoren ohne RNA. Die restlichen Signale unterhalb dieser Molekülgröße wurden bei jeder Klonierung vorgefunden und repräsentierten die PCR-Primer sowie Nebenprodukte der PCR. Die Banden größer als 120 bp entsprachen dem gesuchten Klonierungsprodukt. Die dort gezeigte DNA war länger als 120 bp und entsprach den Adaptoren plus sRNA. Deutlich erkennbar waren die beiden Signal auf Höhe von ~140 bp bzw. ~150 bp. Sie repräsentierten klonierten sRNAs mit einer Länge zwischen ca. 20 und 30 nt und entsprachen in ihrer Länge den siRNAs und miRNAs, welche mit Argonaute-Proteinen interagierten (Carthew und Sontheimer, 2009). Der Gelbereich zwischen 130 bp und 160 bp wurde ausgeschnitten und aufgereinigt.

Die für die *High-Throughput* Sequenzierung (HTS) vorgesehenen PCR-Produkte wurde an das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik im Biopark Regensburg weitergegeben. Dort fand vor der Sequenzierung eine Qualitätsuntersuchung statt. Diese wurde mit Hilfe eines Agilent Bioanalyzers durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass der Großteil der DNA-Stränge über eine Länge von ca. 140 nt verfügte. Die restlichen Desoxyribonukleinsäuren bildeten zu diesem Gipfel einen relativ breiten „Sockel“ welcher sich zwischen 135 bis 160 bp erstreckte. Diese Ergebnisse passten zu den aus dem Gel ausgeschnittenen Banden. Die Probe konnte nach dieser positiv verlaufenen Qualitätsuntersuchung zusammen mit anderen Proben einer *High-Throughput* Sequenzierung unterzogen werden.

8. Auswertung der Sequenzierergebnisse

Nach der HTS mussten die erhaltenen Sequenzen aufbereitet werden. Hierzu benutzte man den online verfügbaren Galaxy-Server (<https://usegalaxy.org>). Die Adaptersequenzen wurden abgeschnitten und es fand eine Sortierung nach Länge statt. Sequenzen mit einer Länge kleiner als 15 nt wurden entfernt. Von anfänglichen 1191441 Sequenzen erhielt man nach Festlegung der Auswahlkriterien 960376 Sequenzen, 180471 waren zu kurz (kleiner als 15 nt), 50594 enthielten lediglich die Adapter ohne Inserts (*adapter only*-Sequenzen). Die Anzahl der erhaltenen Sequenzen erschien auf den ersten Blick wenig, war jedoch auf Probleme während des Sequenzervorgangs zurückzuführen. Während dem Zeitpunkt der Sequenzierung hatte das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik Probleme bei der Einstellung und Bedienung des Illumina Sequenzers. Die Anzahl von knapp einer Million Sequenzen sollte trotzdem für weitergehende Analysen ausreichen. Die 50594 Sequenzen, welche die ligierten Adapter ohne RNA Insert enthielten, gelten als Verunreinigungen, die nach dem Ausschneiden der DNA aus dem *Scale up* PCR-Gel „mitgeschleppt“ wurden.

Eine Aufschlüsselung der Sequenzen zeigte, dass der Großteil der Sequenzen über eine Länge zwischen 15 und 25 nt verfügte, wobei die Anzahl der 23 nt-Moleküle am Größten war (III. Abb. 19 A). Diese Werte passen zu den Längen von miRNAs und siRNAs, welche als Interaktionspartner von Ago-Proteinen in Frage kommen (Carthew und Sontheimer, 2009). Außerdem wurde für das bakterielle Argonaute-Protein aus *Rhodobacter sphaeroides* gezeigt, dass es Nukleinsäuren mit einer Länge von 15 – 19 nt bzw. 21 – 25 nt binden kann (Olovnikov *et al.*, 2013). Die Ergebnisse der *Scale up* PCR sowie der Sequenzierung bestätigen diese Erkenntnisse.

Die knapp eine Million Sequenzen wurden gegen das Genom von *P. furiosus* gemappt. Dadurch konnte man feststellen, welche Bereiche durch die Sequenzen abgedeckt wurden. Der Großteil der Treffer wurde im Genbereich der ribosomalen RNA gefunden (69,3 %). Außerdem wurden im Abschnitt der sRNAs/snoRNAs-ähnliche (10,4 %), der CRISPR RNAs (9,1 %), in *open reading frames* (ORF) (8,2 %) sowie tRNAs und *intergenic regions* (3,0 %) Treffer gefunden (III. Abb. 19 B). Vor längerer Zeit konnten bereits sRNA-Stücke mit einer Länge von weniger als 50 nt aus dem gesamten RNA-Pool von *P. furiosus* ausgeschnitten und analysiert werden. Dabei fand man ribosomale RNA (42,2 %), CRISPR RNAs (17,3 %), RNA aus ORFs (23,9 %), sRNAs/snoRNAs-ähnliche (12,4 %) sowie tRNAs, Transposons, Hhc RNAs und *intergenic regions* (4,2 %) (Klein *et al.*, 2002; Hale *et al.*, 2008). Verglich man die Ergebnisse mit den aktuellen Daten der Sequenzierung, konnte man erkennen, dass an das Argonaute-Protein eine eindeutig höhere Anzahl an ribosomaler RNA gebunden hatte. Ebenso waren in beiden Experimenten CRISPR-RNAs gefunden worden, jedoch waren diese in den

Sequenzierungsdaten für das Ago-Protein in geringerer Anzahl vorhanden. Der prozentuale Anteil an sRNAs und snoRNA-ähnlichen Sequenzen lag in etwa gleich hoch, doch gab es bei den RNAs aus *open reading frames* Unterschiede. Die Menge lag bei den Daten für das Ago-Protein unter den veröffentlichten Werten.

Durch das Mapping der Sequenzen gegen das Genom von *P. furiosus* konnten Bereiche mit besonders hoher Trefferanzahl gefunden werden. Eine dieser Regionen war im Genombereich 1288205-1288225 zu finden und wurde snoRNA PF_s027A genannt. In der Umgebung war *downstream* PF1373 zu finden, ein Genomabschnitt, welcher für einen Kationentransporter kodiert. *Upstream* befand sich PF_s027, ein mittels bioinformatischen Vorhersagen gefundener snoRNA-Bereich (III. Abb. 20 A). Neben diesem Gipfel gab es noch weitere Bereiche mit hoher Trefferzahl. 69,3 % der Sequenzen entfielen auf den für ribosomale RNA zuständigen Abschnitt. Besonders das Gebiet der 16S rRNA zeigte 6 sehr große Gipfel (sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6), wohingegen bei 23S rRNA sowie 5S rRNA wenige Treffer zu verzeichnen waren (III. Abb. 20 B). Die Sequenzen von diesen sechs Gipfeln ließen sich nach ihrer Länge in zwei Gipfel mit 23 nt, zwei Gipfel mit 19 nt sowie jeweils einen Gipfel mit 26 bzw. 20 nt unterteilen (III Tabelle 3). Verglich man die drei Nukleotidabfolgen der „langen“ Sequenzen (26 nt + 23 nt) miteinander, so konnte man Übereinstimmungen finden (III. Abb. 21). Gleiches galt für die Vergleiche der „kurzen“ Sequenzen (20 nt + 19 nt). Noch deutlichere Übereinstimmungen in der Sequenzabfolge erhielt man bei dem Vergleich der beiden 23 nt bzw. 19 nt Sequenzen untereinander. RNA-Sequenzierungsstudien des humanen Gewebes haben gezeigt, dass miRNAs überwiegend Uracil (U) oder Adenin (A) als erste 5'-Base aufwiesen (Hu *et al.*, 2009). Dies traf für fünf der sechs Sequenzen aus dem kodierenden Bereich der 16S rRNA, sowie snoRNA PF_s027A jeweils zu. All diese Sequenzen hatten ein Adenin am 5'-Ende. Außerdem konnte man erkennen, dass sehr oft Übereinstimmungen bei den Basen Guanin (G) und Cytosin(C) bestand. Besonders hyperthermophile Organismen und deren non-coding RNAs besitzen einen hohen GC-Gehalt, was wiederum zusätzlich für diese Ergebnisse sprach (Heyer *et al.*, 2012). Grundsätzlich erfolgt die Identifizierung der kleinen RNAs durch Ago unabhängig von der RNA-Sequenz (Wang *et al.*, 2008 b). Trotzdem war die Übereinstimmung der jeweiligen Sequenzen untereinander sehr groß. Ob diese Übereinstimmungen für die Interaktion der sRNA mit dem Argonaute-Protein oder später für die Erkennung der *target* RNA wichtig waren, konnte nicht geklärt werden.

9. Northern-Blot zur Validierung der Sequenzierergebnisse

Die bei der Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse waren noch nicht aussagekräftig genug und mussten daher durch Northern-Blot-Experimente bestätigt werden. Dazu wurden DNA-Moleküle als Sonden verwendet, welche perfekt zu den erhaltenen RNA-Sequenzen der Sequenzierung passten. Durch Co-IP-Experimente erhielt man die mit dem Ago-Protein interagierten RNAs, welche nach einem Gellauf auf eine Membran übertragen wurden. Die komplementären DNA-Sonden wurden radioaktiv markiert, damit sie später auf einem Phosphoimager Screen sichtbar waren. SnoRNA PF_s027A, eine 21 nt lange non-coding RNA, erfuhr eine erste Überprüfung. Als Positivkontrolle wurde die gesamte RNA aus *P. furiosus* aufgetragen. Der Phosphoimager Screen zeigte nach dem Northern-Blot mehrere Signale in der Spur der gesamt RNA (III. Abb. 22 A). Hierbei handelte es sich um die non-coding RNA sowie ihre verschiedenen Prozessierungsstufen. Keine positiven Signale gab es für die IP-Probe ohne Antikörper, was jedoch nicht verwunderte, da es sich hierbei um die Negativkontrolle handelte. Dies zeigte zudem, dass keine gesuchte RNA mit den für die IP benutzten

Dynabeads interagierte. Die IP mit Antikörper wies jedoch Signale auf. So konnte erneut, wie bereits bei der Sequenzierung, die 21 nt lange snoRNA PF_s027A nachgewiesen werden. Welche Funktion das Ago-Protein in Verbindung mit der snoRNA PF_s027A ausführt bleibt jedoch ungewiss. Eine Regulation der Genexpression scheint unwahrscheinlich da wichtige Komponenten des RISC in *P. furiosus* fehlen. Möglicherweise spielt snoRNA PF_s027A, wie viele andere bekannte snoRNAs, bei der Prozessierung und Modifikation ribosomaler RNA eine wichtige Rolle.

Die Sequenzierung lieferte für den Genbereich der 16S rRNA ebenso interessante Bereiche, welche via Northern Blot überprüft werden mussten. Zu den sechs erhaltenen Gipfeln im Bereich der 16S rRNA (sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6) wurden sechs passende DNA-Sonden eingesetzt. So zeigte die Sonde für Gipfel sRNA 16S_6, der größte Gipfel nach dem Mapping, in der Spur mit der gesamten RNA mehrere Banden (III. Abb. 22 B). Hierbei handelte es sich um die fertig prozessierte 16S rRNA. In der Spur der mit dem Argonaute-Protein präzipitierten Ribonukleinsäuren gab es ebenso Signale zu beobachten. Die 16S rRNA Sonde zeigte dort ein positives Ergebnis, jedoch befanden sich die Signale dort im Vergleich zur Probe der gesamt RNA weiter unten im Gel. Möglicherweise hatte in dieser Spur bereits ein Abbau der 16S rRNA stattgefunden. Das gleiche Ergebnis war auch bei den anderen 5 Sonden für die 16S rRNA Gipfel ersichtlich (Daten nicht gezeigt). Northern-Blot-Experimente mit Sonden für 23S (III. Abb. 22 C) bzw. 5S rRNA (III. Abb. 22 D) zeigten kein positives Ergebnis. Durch die Co-IP-Experimente wurde keine 23S sowie 5S rRNA gewonnen. Es wurde kürzlich in Eukaryoten gezeigt, dass die Proteine des RISC Einfluss auf die Prozessierung der prä-ribosomalen RNA hatten (Liang und Crooke, 2011). So führte ein Knock-out der Enzyme zu Verzögerungen oder gar Beendigungen der Prozessierungereignisse der ribosomalen RNA. Außerdem wurde gezeigt, dass Co-IP-Experimente mit den RISC Proteinen eukaryotische 5,8S rRNA präzipitieren lassen. Die Ergebnisse des Northern-Blots zeigten in Falle des archaeellen Argonaute-Proteins, dass 16S rRNA copräzipitiert, nicht jedoch wie in Eukaryoten gezeigt, 5S rRNA. Außerdem deutete das Bandenmuster in den Blots darauf hin, dass es sich bei der präzipitierten 16S rRNA um fertig prozessierte RNA handelte. Es konnte, wie im Falle der Eukaryoten, gezeigt werden, dass das Ago-Protein in Bezug auf die ribosomale RNA eine Aufgabe erfüllte.

Wie das Argonaute-Protein bei Zugabe von verschiedenen Nukleinsäuren reagiert, sollten anschließende Interaktionsversuche zeigen.

10. Interaktionsanalysen des Argonaute-Proteins mit verschiedenen Nukleinsäuren sowie anschließende Spaltexperimente

Um ein mögliches Bindungsverhalten des Argonaute-Proteins an verschiedene Nukleinsäuren zu testen, wurden die zu untersuchenden DNA- und RNA-Moleküle radioaktiv markiert. Die Interaktionsversuche fanden mit Hilfe eines 6%igen, nativen Gels statt. Aufgrund der Ergebnisse der Northern-Blot-Experimente wurde die 16S ribosomale RNA aus *P. furiosus* für Interaktionsuntersuchungen gewählt. Diese war im unteren Bereich des nativen Gels als „Schmier“ zu erkennen (III. Abb. 24 A). Nach Zugabe des Ago-Proteins aus *P. furiosus* bildete sich eine klare, starke Bande. Weiterhin waren mehrere schwächere Signale zu erkennen. Kontrollversuche, welche mit Ago und dem Isotop [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP durchgeführt wurden, zeigten keine Bandenmuster und verliefen negativ (Daten nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt, wurden Interaktionen zwischen ribosomaler RNA und Proteinen aus dem RISC bereits für die 5,8S rRNA durch Co-Immunpräzipitationsuntersuchungen

nachgewiesen (Liang und Crooke, 2011). Eine direkte Bindung des Argonaute-Proteins an die 16S rRNA wurde bisher noch nicht dokumentiert. Im Anschluss wurden diese Bindungsversuche leicht modifiziert, indem man dem Bindepuffer Magnesium-Ionen zuführte. So zeigten die Proben mit Mg^{2+} -Ionen im Vergleich zu den Proben ohne Magnesium ein abweichendes Bandenmuster (III. Abb. 24 B). Die starke Bande im oberen Bereich des Gels, welche vermutlich dem Ago-Protein mit gebundener 16S rRNA entsprach, wurde bei Zugabe von Magnesium deutlich schwächer. Außerdem entstand im unteren Bereich des Gels ein starkes Signal, welches durch den Abbau der 16S rRNA entstanden sein könnte. Es war bereits bekannt, dass es sich bei Ago-Proteinen um magnesiumabhängige Endonukleasen handelte (Schwarz *et al.*, 2004). Die Zugabe der Mg^{2+} -Ionen könnte sich somit positiv auf die Nukleaseaktivität des Ago-Proteins auswirken und dadurch den Abbau der 16S rRNA fördern. Es wurde zudem vor kurzem gezeigt, dass das Argonaute-Protein funktionelle, strukturelle und biochemische Ähnlichkeit zu Ribotoxinen aufwies (Pichinuk und Wreschner, 2010). Ribotoxine können 23S ribosomale RNA spalten. Die Annahme, dass das Argonaute-Protein ribosomale RNA spalten kann, sollte durch ein weiteres Experiment erhärtet werden. Dazu wurde die Inkubationszeit variiert und die Probe auf ein dichteres, natives Gel aufgetragen. Somit konnten auch kleinere Komplexe und Moleküle gut aufgetrennt und dargestellt werden. Die Probe mit der geringsten Inkubationszeit zeigte viele Signale im oberen Bereich des Gels bzw. große Molekülkomplexe (III. Abb. 24 C). Dehnte man diese Inkubationszeit aus, so verschwanden diese Banden und reicherten sich im unteren Bereich des Polyacrylamid-Gels an. Ob dies an der Nukleaseaktivität des Argonaute-Proteins lag und ob dieser Abbau speziell an die 16S rRNA gekoppelt war, sollten weiterführende Experimente zeigen. Hierzu wurde eine der 16S rRNA in ihrer Länge entsprechende ssRNA hergestellt. Interaktionsuntersuchungen zeigten, dass diese einzelsträngige RNA ebenso wie die 16S rRNA vom Argonaute-Protein gebunden wurde (III. Abb. 24 D). Eine Nukleaseaktivität konnte jedoch trotz Zugabe von Mg^{2+} -Ionen nicht beobachtet werden (III. Abb. 24 E), was darauf schließen lässt, dass die Bindung eher unspezifisch stattfindet. Auch konnte der Verdacht der Verunreinigung durch eine RNase entkräftet werden, da keine Abbauprodukte der ssRNA detektiert wurden. Neben den Ribonukleinsäuren wurden die Interaktions- und Schneideexperiment auch mit Desoxyribonukleinsäuren durchgeführt. Die DNA war doppelsträngig und entsprach in ihrer Länge in etwa der 16S rRNA bzw. ssRNA. Interaktionsanalysen mit radioaktiv markierter DNA verliefen negativ (III. Abb. 24 F). Ebenso wurden trotz Zugabe von Magnesium-Ionen keine Abbauprodukte gefunden. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Argonaute-Protein aus *P. furiosus* in der Lage war, 16S rRNA zu binden. Außerdem wies das Enzym nach Zugabe von Mg^{2+} -Ionen Nukleaseaktivität auf. Diese Tatsache geht einher mit der strukturellen Ähnlichkeit des Argonaute-Proteins zu Ribotoxinen. Eine vergleichbare ssRNA zeigte in Gegenwart von Ago und Mg^{2+} -Ionen keine Abbauprodukte. Experimente mit doppelsträngiger DNA verliefen ebenso negativ. Dies zeigte die hohe Spezifität des Proteins für die 16S rRNA als Interaktionspartner und *target* RNA. Aktuelle Forschungsergebnisse, welche zeigten, dass das bakterielle Ago-Protein zum Abbau von DNA in der Lage sei, konnten somit nicht bestätigt werden (Swarts *et al.*, 2014). Die Desoxyribonukleinsäuren wurden vom Argonaute-Protein aus *P. furiosus* weder gebunden, noch gespalten. Zusätzlich erwähnt werden muss die Tatsache, dass durch Northern Blot-Experimente neben den Bereichen innerhalb der 16S rRNA auch eine snoRNA (snoRNA PFs027A) nachgewiesen werden konnte. SnoRNAs sind in Verbindung mit dem Ago-Protein häufig bei der Prozessierung und Modifikation ribosomaler RNA wichtig. Möglicherweise besteht hier eine weitere Verbindung zwischen ribosomaler RNA und Argonaute-Protein. Ago könnte somit nicht nur beim Abbau der 16S rRNA eine entscheidende Rolle spielen, sondern auch die Prozessierung und Modifikation der rRNA vorantreiben.

11. Suche nach möglichen *guide* RNAs für die abgebauten *target* RNA (16S rRNA) in den Sequenzierungsergebnissen

Es blieb jedoch im Falle eines 16S rRNA-Abbaus durch das Ago-Protein weiterhin die Frage nach der *guide* RNA. Für die Interaktion der *guide* RNA mit der *target* RNA war vor allem die *seed sequence*, also die Nukleotide 2-8 am 5'-Ende der RNA, wichtig (Doench und Sharp, 2004; Brennecke *et al.*, 2005, Bartel, 2009). Daher wurde diese spezielle Nukleotidabfolge bei den Sequenzen sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6, welche bei den Gipfeln im 16S rRNA-Abschnitt besonders hervorstachen und beim Northern-Blot ein positives Ergebnis lieferten, untersucht. So fand ich innerhalb der 16S rRNA Bereiche, welche sehr gut zu den *seed sequences* passten (III. Abb. 25). Die Sequenzen sRNA 16S_2 – sRNA 16S_6 zeigten sehr große Übereinstimmungen, wohingegen Sequenz sRNA 16S_1 sogar perfekte Komplementarität aufwies. Bei den Unterschieden im Falle der Sequenzen sRNA 16S_2 – sRNA 16S_6 handelte es sich hauptsächlich um GU-*wobble*. Diese sind aus thermodynamischer Sicht ähnlich stabil wie Watson-Crick-Basenpaare (Varani und McClain, 2000). Neueste Erkenntnisse haben gezeigt, dass GU-*wobble* und fehlerhafte Basenpaarungen innerhalb der Interaktion zwischen *seed sequence* und *target* RNA durchaus üblich sind (Helwak *et al.*, 2013). Die kurzen RNA-Abschnitte, welche nach der Sequenzierung erhalten wurden und der 16S rRNA zugewiesen werden konnten, könnten damit als *guide* RNA wirken. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Interaktion- und Schneideuntersuchungen ergibt sich folgendes Bild: Das Ago-Protein bindet kurze RNA-Abschnitte, welche ihren Ursprung in der 16S rRNA haben. Dieser Komplex ist anschließend in der Lage, die 16S rRNA selbst als *target* RNA zu binden. Hilfreich hierbei ist die *seed sequence* der sechs Gipfelsequenzen, welche aufgrund großer Sequenzähnlichkeit zur 16S rRNA als *guide* RNAs dient. Das Argonaute-Protein ist im Anschluss in der Lage, als Nuklease zu fungieren. Somit würde das Ago-Protein die 16S rRNA abbauen und aus den Abbauprodukten neue *guide* RNAs generieren.

Da die einzelsträngige 16S rRNA über eine ausgeprägte Sekundärstruktur verfügt, war der Blick auf die möglichen Bindestellen der *guide* RNA von weiterem Interesse.

12. Bindungsstellen der *seed sequence* an der 16S rRNA

Liegen Nukleinsäuremoleküle als Einzelstrang vor, können sie Sekundärstrukturen bilden. Diese Strukturen werden durch Interaktionen zwischen komplementären Nukleotidpaaren festgelegt, welche nah oder aber weit voneinander entfernt liegen. Dadurch wird die Nukleinsäure gefaltet und bildet lange Doppelstränge oder *loops* aus. Die so entstandene Sekundärstruktur ist ausschlaggebend für die Funktion der Nukleinsäure. Die 16S ribosomale RNA spielt durch ihre Sekundärstruktur unter anderem bei der Bindung der ribosomalen Untereinheit aber auch bei der Interaktion mit der mRNA eine wichtige Rolle. Die sechs gefundenen Bindungsstellen der *guide* RNA an der 16S rRNA (III. Tabelle 4) wurden mit Hilfe der Sekundärstruktur der rRNA weiter untersucht (III. Abb. 26). Es fiel auf, dass die mögliche Bindestelle der *guide* RNA jeweils in einem Bereich mit einem *loop* lag. In Abschnitten mit reinen Doppelsträngen innerhalb der 16S rRNA wurden hingegen keine Interaktionsstellen gefunden. *Loops* zeigten im Gegensatz zu Doppelsträngen die strukturelle Besonderheit, dass sie aufgrund ihrer Struktur für Interaktionen mit anderen Nukleinsäuren und

Proteinen leichter zugänglich waren. Die Ergebnisse der Interaktions- und Schneideexperimente zeigten zudem, dass eine Bindung der Nukleinsäure an das Argonaute-Protein nur bei einzelsträngiger RNA, nicht jedoch bei doppelsträngiger DNA stattfand. Ribotoxine, welche eine strukturelle Ähnlichkeit zu Argonaute-Proteinen aufwiesen, können 23S rRNA am sogenannten *sarcin-ricin-loop* spalten (Pichinuk und Wreschner, 2010). Die sechs gefundenen Interaktionsstellen innerhalb der 16S rRNA, welche alle strukturell durch *loops* gekennzeichnet waren, könnten somit für das Ago-Protein aus *P. furiosus* als Bindestelle dienen. Eine Nukleaseaktivität des Argonaute-Proteins hätte dort eine Spaltung der 16S rRNA und somit den Abbau der ribosomalen RNA zur Folge.

13. Knock-out des Argonaute-Proteins in *P. furiosus*

Die eben gezeigte Nukleaseaktivität des Ago-Proteins gegen 16S rRNA lässt auf eine essentielle Funktion des Proteins schließen. Dies könnte durch eine Ago-Knock-out-Mutante unterstrichen werden. Die Anzahl an Argonaute-Proteinen kann je nach Organismus variieren. So besitzt der Fadenwurm *C. elegans* 27 verschiedene Ago-ähnliche Gensequenzen, die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* im Vergleich dazu nur eine (Hutvagner und Simard, 2008). Argonaute-Proteine kommen in allen drei Domänen des Lebens vor und ihre Funktion ist im Bereich der Eukaryoten größtenteils entschlüsselt. Dort spielen sie bei der RNA-Interferenz eine entscheidende Rolle, einem Mechanismus, welcher zur Verteidigung des Organismus gegen das Eindringen fremden Erbgutes dient (Jansen *et al.*, 2002; Bolotin *et al.*, 2005; Barrango *et al.*, 2007). Über das prokaryotische Ago-Protein war bis vor kurzem wenig bekannt. Neueste Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass das bakterielle Ago-Protein aus *Thermus thermophilus* bei der Abwehr von fremder DNA eine entscheidende Rolle spielt (Swarts *et al.*, 2014). Das hyperthermophile Archaeum *P. furiosus* besitzt ein Argonaute-Protein, welches eine Länge von 770 Aminosäuren hat und die für die Nukleaseaktivität benötigte PAZ-Domäne verfügt. Andere Organismen besitzen mehrere für Argonaute-Proteine kodierende Genabschnitte. So findet man in embryonalen Stammzellen vier verschiedene Proteine der Argonaute-Subfamilie. Die Wichtigkeit dieser Proteine zeigte sich bei dem Versuch, alle vier Vertreter auszuknocken. Dies endete in der Apoptose der Zellen, dem programmierten Zelltod (Liu *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2009). Daher stellte sich die Frage, was der Knock-out des einzigen Ago-Proteins in *P. furiosus* zur Folge hätte. Um diese Frage zu beantworten, wurde für den Ago-Knock-out die Methode der homologen Rekombination gewählt. Der Genabschnitt PF0537, welcher für das Ago-Protein kodiert, wurde dazu durch eine Simvastatin-Resistenzkassette aus *Thermococcus kodakarensis* (*Tk-SimR*) ersetzt. Dazu musste die Kassette mit Genabschnitten flankiert werden, welche den Argonaute-Abschnitt flankieren. Dies garantierte einen Einbau der Kassette in das Genom (III. Abb. 27). Mittels PCR wurden die drei Bestandteile des DNA-Konstruktes hergestellt: PF0537 up (*upstream*-Bereich des Ago-Genabschnitt), PF0537 do (*downstream*-Bereich des Ago-Genabschnitt) sowie die Resistenzkassette. Anschließend erfolgten eine Verbindung der drei Abschnitte mit Hilfe zweier Fusion-PCRs sowie der Einbau des Konstruktes in den pUC19-Vektor. Der somit entstandene pUC19-ΔPF0537::*Tk-SimR* konnte in DH5 α -Zellen transformiert und vervielfältigt werden. Positive Klone wurden durch Restriktionshydrolyse sowie einer Sequenzierung überprüft. Anschließend erfolgte die Transformation in *P. furiosus*-Zellen. Als Positivkontrolle wurde der bereits häufig erprobte Vektor pMUR93 eingesetzt, welcher ebenso eine Simvastatin-Resistenzkassette besaß. Nach der Transformation wurden nur auf den Gelrite-Platten mit der Positivkontrolle Kolonien gefunden. Die anderen Platten enthielten keine Kolonien. Auch eine erneute Transformation unter leicht abgeänderten Voraussetzungen hatte das gleiche Ergebnis zur

Folge. Somit war bewiesen, dass der Knock-out des Ago-Proteins in *P. furiosus* letal war. Die Ergebnisse des Knock-outs aller Ago-Proteine in embryonalen Stammzellen wurde dadurch bestätigt (Liu *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2009). Dieses Resultat deutet auf die essentielle Aufgabe des Ago-Proteins in Archaeen hin. Der Abbau der 16S rRNA durch das Ago-Protein wäre eine wichtige Funktion, jedoch kann über einen möglichen Zusammenhang zwischen fehlendem 16S rRNA-Abbau und Letalität der Organismen aufgrund des Knock-outs nur spekuliert werden.

V.Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, den LSm-Proteinkomplex aus *P.furiosus* zu reinigen und die oligomere Zusammensetzung des Komplexes zu bestimmen. Das Protein wurde in *E.coli* exprimiert, über den angefügten His-Tag aufgereinigt und einer analytischen Gelfiltration zugeführt. Durch Gelfiltration wurde ermittelt, dass der LSm-Komplex aus sieben Kopien des Proteins besteht.

Außerdem stand das archaeelle Argonaute-Protein im Zentrum des Interesses. Das Ago-Protein wurde in *P. furiosus* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Ein anschließender Saccharose-Dichtegradient entschlüsselte PF1848, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, als möglichen Interaktionspartner. Dieser könnte bei der Erkennung der *guide* bzw. *target* RNA wichtig sein. Für weitere Experimente wurden Argonaute-Antikörper generiert und gereinigt. Es konnte mittels Western-Blot-Analysen gezeigt werden, dass durch die IP-Versuche Argonaute-Proteine sowie hochmolekulare Komplexe präzipitieren. Eine Analyse der mit dem Ago-Protein Co-immunpräzipitierten Nukleinsäuren sollte zeigen, welche Art Nukleinsäure an das Protein band. Durch den Einsatz von RNasen und DNasen konnte somit gezeigt werden, dass es sich um RNA handelte. Diese wurde mit entsprechenden Adaptern versehen, welche eine Sequenzierung ermöglichen. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse zeigte, dass es sich bei den präzipitierten RNA hauptsächlich um Nukleinsäuren mit einer Länge zwischen 15 und 27 nt handelte, wobei die Moleküle mit 23 nt herausstachen. Die weitere Analyse zeigte, dass es sich bei der sequenzierten RNA vorwiegend um ribosomale RNA handelte, wobei auch einige Treffer im Bereich der sRNA/snoRNA gefunden wurden. Vor allem die durch das Mapping der Sequenzen gegen das *P. furiosus* erhaltenen sechs Gipfel im 16S rRNA-Bereich fielen auf. Ein Vergleich der Sequenzen dieser sechs Gipfel zeigte deutliche Übereinstimmungen in der Nukleotidabfolge. Zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse wurden Northern-Blot-Experimente durchgeführt. Diese zeigten für eine sRNA/snoRNA (snoRNA PFs027A) sowie für die sechs Gipfel im 16S rRNA Bereich (sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6) positive Ergebnisse, wohingegen der Nachweis bei 23S sowie 5S rRNA negativ verlief. Die daran anschließenden Interaktionsexperimente bestätigten die Ergebnisse der Northern-Blot-Experimente. So konnte gezeigt werden, dass das Ago-Protein mit der 16S rRNA interagierte. Durch Zugabe von Mg²⁺-Ionen wurde ein Abbau der 16S rRNA beobachtet. Ähnliche Versuche mit einzelsträngiger RNA sowie doppelsträngiger DNA verliefen negativ. Die sechs bei der Sequenzierung erhaltenen Sequenzgipfel im 16S rRNA Bereich erfuhren eine tiefergehende Untersuchung. So zeigten die *seed sequences* perfekte bzw. große Übereinstimmungen zu Abschnitten der 16S rRNA. Diese gefundenen Abschnitte wiesen innerhalb der Sekundärstruktur der 16S rRNA alle einen sogenannten *loop* auf. Diese *loop*-Struktur ermöglichte es dem Argonaute-Protein mit der 16S rRNA zu interagieren. Nach dem Knock-out des Ago-Proteins in *P. furiosus* waren die Organismen nicht mehr lebensfähig. Dadurch konnte die wichtige funktionelle Rolle des Proteins unterstrichen werden.

Das Ago-Protein aus *P. furiosus* ist somit in der Lage, kurze RNA-Abschnitte, welche ihren Ursprung innerhalb der 16S rRNA haben, zu binden. Dieser Komplex interagiert aufgrund der *seed sequence* dieser RNA-Abschnitte mit der 16S rRNA. Hilfreich hierbei könnte die HMG-CoA-Reduktase sein, welche als Interaktionspartner entschlüsselt wurde. Nach der Interaktion des Argonaute-Proteins mit *guide* und *target* RNA findet ein Schneideereignis statt, welches aufgrund der Ähnlichkeit des Ago-Proteins zu den Ribotoxinen äußerst wahrscheinlich ist. Das prokaryotische Ago-Protein ist somit für

den spezifischen Abbau der 16S rRNA verantwortlich. Die Abbauprodukte benutzt Ago erneut als *guide* RNA wodurch der Abbau der 16S rRNA sich dadurch selbst regulieren würde.

VI. Summary

Within the scope of this thesis I cleaned up the LSm protein complex from *P. furiosus* to determine the oligomeric composition of the complex. The protein was expressed in *E. coli*, purified by the added (appended) His-tag and tested with an analytical gel filtration experiment. I discovered by gel filtration that the LSm complex consists of seven copies of the protein.

In addition, the archaeal Argonaute protein was in the focus of this work. Ago was expressed in *P. furiosus* and purified afterwards. A sucrose density gradient decrypted PF1848, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, as a potential interaction partner. This protein may be important by the recognition of guide and target RNA. For further experiments Argonaute antibodies were generated and purified. It was shown by Western blot analysis that during IP experiments Argonaute proteins and high molecular weight complexes precipitate. An analysis of the co-immunoprecipitated nucleic acids should show the nature of the interacting nucleic acid. By the use of RNases and DNases I was able to demonstrate that the interacting nucleic acids were RNAs. These were flanked with adapters, which allowed a subsequent sequencing. Evaluating the sequencing results showed that the precipitated RNA had principally a length of 15 to 27 nt. However the molecules with 23 nt stood clearly out. Further analysis pointed out that the sequenced RNAs were predominantly ribosomal RNAs, whereas some hits in the sRNA / snoRNA areas were found. By mapping the sequences to the *P. furiosus* genome six peaks in the 16S rRNA were noticed. A sequence comparison of these six peaks showed significant similarities in the nucleotide sequence. For validation of the sequencing results Northern blot experiments were performed. The blot showed positive results for sRNA / snoRNA (snoRNA PF027A) and for the six peaks in the 16S rRNA region (sRNA 16S_1 – sRNA 16S_6), whereas the 23S and 5S rRNA detection was negative. The interaction experiments confirmed subsequently the results of the Northern blot experiments. It was shown that the Argonaute protein interacts with the 16S rRNA. Degradation of the 16S rRNA was observed by the addition of Mg²⁺-ions. Similar experiments with a single-stranded RNA and double-stranded DNA were negative. On-going investigations with the six 16S rRNA peaks found during sequencing were done. It was revealed that the seed sequences showed perfect or great similarities to parts of the 16S rRNA. All of these sections offered in the secondary structure of the 16S rRNA a so-called loop. This loop structure enabled the Argonaute protein to interaction with the 16S rRNA. After the knock-out of the Ago protein in *P. furiosus* the organisms were no longer viable. This result underlined the important functional role of the protein.

The *P. furiosus* Ago protein is thus capable of binding short RNAs, which have their origins in the 16S rRNA. This complex interacts due to the seed sequence of the short RNAs with the 16S rRNA. For this binding event the HMG-CoA reductase could be important, because this reductase was decoded as an interaction partner of the Ago protein. After the interaction of the Argonaute protein with guide and target RNA a cutting event takes place, which is most likely due to the similarity of the Ago protein to the Ribotoxinen. The prokaryotic Argonaute protein is therefore responsible for the specific degradation of the 16S rRNA. The degradation products are used again as a guide RNA and the 16S rRNA would thereby regulate itself.

VII. Literaturverzeichnis

- Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Lührmann R. (1999)** A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'- end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in *vitro*. *EMBO J.* 18, 5789-5802.
- Achsel T, Stark H, Lührmann R. (2001)** The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity. *PNAS* 98(7):3685-3689.
- Albrecht M, Lengauer T. (2004)** Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Lett.* 569(1-3):18-26.
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. (2003)** MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol.* 13(10):807-18.
- Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA. (2001)** Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol.* 11(13):1017-27.
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. (2003)** The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5(2):337-50.
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. (2006)** A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442(7099):203-7
- Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. (2007)** The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318(5851):761-4. Review.
- Babiarz J, Ruby J, Wang Y, Bartel D, Blelloch R. (2008)**. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development* 22 (20): 2773–2785.
- Babski J, Tjaden B, Voss B, Jellen-Ritter A, Marchfelder A, Hess WR, Soppa J. (2011)** Bioinformatic prediction and experimental verification of sRNAs in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *RNA Biol* 8:5
- Bachellerie JP, Cavaillé J, Hüttenhofer A. (2002)** The expanding snoRNA world. *Biochimie* 84 (8): 775–790.

- Barrera I, Schuppli D, Sogo JM, Weber H. (1993)** Different mechanisms of recognition of bacteriophage Q beta plus and minus strand RNAs by Q beta replicase. *J Mol Biol* 232, 512-521.
- Bartel DP. (2009)** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215-33. Review.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath A (2007)** CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 31, 1709-1712.
- Beggs JD. (2005)** Lsm proteins and RNA processing. *Biochem Soc Trans* 33, 433-438.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. (2006 a)** mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20(14):1885-98.
- Behm-Ansmant I, Massenet S, Immel F, Patton JR, Motorin Y, Brantl C. (2006 b)** A previously unidentified activity of yeast and mouse RNA:pseudouridine synthases 1 (Pus1p) on tRNAs. *RNA* 12(8):1583-93.
- Blum H, Beier H, Gross H. (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 93-99.
- Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C. (1998)** AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.* 17(1):170-80.
- Boland A, Tritschler F, Heimstädt S, Izaurralde E, Weichenrieder O. (2010)** Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep.* 11(7):522-7.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. (2005)** Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551-2561.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005)** Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3(3):e85.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. (2007)** Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128(6):1089-103.
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Schaller H, Khafif M, Schott G, Bendahmane A, Voinnet O. (2012)** Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE1 in *Arabidopsis*. *PNAS* 109(5):1778-83.

- Burggraf S, Jannasch HW, Nicolaus B, Stetter KO. (1990)** *Archaeoglobus profundus* sp. nov. represents a new species within the sulfate-reducing archaeabacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 13:24–28.
- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. (2002)** The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16(21):2733-42. Review.
- Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ. (2007)** MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 12(4):503-14.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. (2009)** Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- Cerutti L, Mian N, Bateman A. (2000)** Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: The novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25:481–482.
- Champoux JJ, Schultz SJ. (2009)** Ribonuclease H: properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription. *FEBS J.* 276(6):1506-16. Review.
- Chekulaeva M, Filipowicz W. (2009)** Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol.* 21(3):452-60. Review.
- Collins BM, Harrop SJ, Kornfeld GD, Ian DW, Curmi PMG, Mabbutt BC. (2001)** Crystal Structure of a Heptameric Sm-like Protein Complex from Archaea: Implications for the Structure and Evolution of snRNPs. *J Mol Biol.* 309, 915-23.
- Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. (1998)** A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12(23):3715-27.
- Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, Perrimon N, Kellis M, Wohlschlegel JA, Sachidanandam R, Hannon GJ, Brennecke J. (2008)** An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 453(7196):798-802.
- Davidson BL, McCray PB. (2011)** Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews Genetics* 12(329-340).
- Davis BM, Waldor MK. (2007)** RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. *Mol. Microbiol.* 65 (2): 373–85.
- DeLong EF, Wu KY, Prézelin BB, Jovine RVM. (1994)** High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371, 695-697.
- Deng W, Lin H. (2002)** miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell.* 2(6):819-30.

- Ding L, Spencer A, Morita K, Han M. (2005)** The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* 19(4):437-47.
- Doench JG, Sharp PA. (2004)** Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18(5):504-11.
- Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, Mower JP, Wolfe KH, Fink GR, Bartel DP. (2009)** RNAi in budding yeast. *Science* 326(5952):544-50.
- Eddy SR. (2001)** Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2:919-929.
- Eikhom TS, Stockley DJ, Spiegelman S. (1968)**. Direct participation of a host protein in the replication of viral RNA in *vitro*. *PNAS* 59, 506-512.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. (2001)** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2):188-200.
- Ender C, Krek A, Friedländer M, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, Pfeffer S, Rajewsky N, Meister G. (2008)** A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular Cell* 32 (4): 519–528.
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. (2008)** GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol.* 15(4):346-53.
- Eulalio A, Tritschler F, Büttner R, Weichenrieder O, Izaurralde E, Truffault V. (2009 a)** The RRM domain in GW182 proteins contributes to miRNA-mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 37(9):2974-83.
- Eulalio A, Helms S, Fritzsch C, Fauser M, Izaurralde E. (2009 b)** A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA* 15(6):1067-77.
- Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. (2009 c)** The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 15(8):1433-42. Review.
- Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, Chen CY, Shyu AB, Yates III JR, Hannon GJ, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. (2009)** Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* 35:868-880.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. (2010)** Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* 79:351-79. Review.
- Faehnle CR, Joshua-Tor L. (2007)** Argonautes confront new small RNAs. *Curr Opin Chem Biol.* 11(5):569-77. Review.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11.
- Fischer S, Benz J, Spät B, Maier LK, Straub J, Granzow M, Raabe M, Urlaub H, Hoffmann J, Brutschy B, Allers T, Soppa J, Marchfelder A. (2010)** The Archaeal Lsm Protein Binds to Small RNAs. *J Biol Chem* 285(45):34429-34438.
- Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT. (1968)** Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* 219, 588-590.
- Franze de Fernandez MT, Hayward WS, August JT. (1972)** Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* 247, 824-831.
- Ghildiyal M, Zamore PD. (2009)** Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 10(2):94-108. Review.
- Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. (2009)** Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology* 11:1143-1149.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. (2006)** A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442(7099):199-202.
- Gokhale SA, Gadgil CJ. (2012)** Analysis of miRNA regulation suggests an explanation for “unexpected” increase in target protein levels. *Mol. BioSyst.* 8, 760-765.
- Grabowski PJ, Seiler SR, Sharp PA. (1985)** A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 42, 345-353.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. (2007)** The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 8:172
- Guisbert E, Rhodius VA, Ahuja N, Witkin E, Gross CA. (2007)** Hfq modulates the sigmaE-mediated envelope stress response and the sigma32-mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 189 (5): 1963–73.
- Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. (2007)** A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315(5818):1587-90.
- Guthrie C, Patterson B. (1988)** Spliceosomal snRNAs. *Annu. Rev. Genet.* 22, 387-419.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. (2010)** Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466(7308):835-40.

Hale C, Kleppe K, Terns RM, Terns MP. (2008) Prokaryotic silencing (psi)RNAs in *Pyrococcus furiosus*. RNA 14(12):2572-2579.

Hall TM. (2005) Structure and function of argonaute proteins. Structure 13(10):1403-8. Review.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286(5441):950-2.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila cells*. Nature 404(6775):293-6.

Hauptmann J, Dueck A, Harlander S, Pfaff J, Merkl R, Meister G. (2013) Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. Nat Struct Mol Biol 20(7):814-7.

He W, Parker R. (2000) Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. Current Opinion in Cell Biology 2000, 12:346–350.

Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. (2013) Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. Cell 153(3):654-665.

Hermann H, Fabrizio P, Raker VA, Foulaki K, Hornig H, Brahms H, Lührmann R. (1995) snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein protein interactions. EMBO J 14, 2076-2088.

Heyer R, Dörr M, Jellen-Ritter A, Späth B, Babski J, Jaschinski K, Soppa J, Marchfelder A. (2012) High throughput sequencing reveals a plethora of small RNAs including tRNA derived fragments in *Haloferax volcanii*. RNA Biol 9(7):1011-8.

Höck J, Weinmann L, Ender C, Rüdel S, Kremmer E, Raabe M, Urlaub H, Meister G. (2007) Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. EMBO Rep. 8(11):1052-60.

Höck J, Meister G. (2008) The Argonaute protein family. Genome Biol. 9(2):210. Review.

Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RH, Hannon GJ, Draper BW, Ketting RF. (2007) A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. Cell 129(1):69-82.

Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P. (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. BMC Genomics. 10:413.

Huber R, Kurr M, Jannasch HW, Stetter KO. (1989) A novel group of abyssal methanogenic archaeabacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. Nature 342:833–834.

- Hunter C, Sun H, Poethig RS. (2003)** The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. *Curr Biol.* 13:1734–1739.
- Hur JK, Zinchenko MK, Djuranovic S, Green R. (2013)** Regulation of Argonaute slicer activity by guide RNA 3'end interactions with the N-terminal lobe. *J Biol Chem.* 288(11):7829-40.
- Huttenhofer A, Brosius J, Bachellerie JP. (2002)** RNomics: Identification and function of small, non-messenger RNAs. *Curr Opin Chem Biol* 6:835-843.
- Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschi T, Zamore PD. (2001)** A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293(5531):834-8.
- Hutvagner G, Simard MJ. (2008)** Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):22-32. Review.
- Jäger D, Pernitzsch SR, Richter AS, Backofen R, Sharma CM, Schmitz RA. (2012)** An archaeal sRNA targeting cis- and trans-encoded mRNAs via two distinct domains. *Nucleic Acids Res.* 40(21):10964-79.
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. (2002)** Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575.
- Jinek M, Doudna JA. (2009)** A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 405-412.
- Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS. (1983)** *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 136:254–261.
- Kajitani M, Kato A, Wada A, Inokuchi Y, Ishihama A. (1994)** Regulation of the *Escherichia coli* hfq gene encoding the host factor for phage Q beta. *J Bacteriol* 176, 531-534.
- Kambach C, Walke S, Young R, Avis JM, de la Fortelle E, Raker VA, Lührmann R, Li J, Nagai K. (1999).** Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* 96:375-387.
- Key SC, Yoshizaki T, Pagano JS. (1998)** The Epstein-Barr Virus (EBV) SM Protein Enhances Pre-mRNA Processing of the EBV DNA Polymerase Transcript. *J Virol.* 72(11):8485-8492.
- Khusial P, Plaag R, Zieve GW. (2005)** LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. *Trends Biochem. Sci.* 30 (9): 522–8.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003)** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2):209-16. Erratum in: *Cell*. 2003 Nov 14;115(4):505.

- Kim VN, Han J, Siomi MC. (2009)** Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(2):126-39. Review.
- Kirino Y, Mourelatos Z. (2007)** Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol.* 14(4):347-8.
- Kiss T (2004)** Biogenesis of small nuclear RNP s. *Journal of Cell Science* 117 (25): 5949–5951
- Klein RJ, Misulovin Z, Eddy SR. (2002)** Noncoding RNA genes identified in AT-rich hyperthermophiles. *PNAS* 99(11):7542–7547
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. (2005)** Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics* 37(5): 495–500
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010)** The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 11(9):597-610. Review.
- Landthaler M, Gaidatzis D, Rothbächer A, Chen PY, Soll SJ, Dinic L, Ojo T, Hafner M, Zavolan M, Tuschl T. (2008)** Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* 14(12):2580-96.
- Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, Kingston RE. (2006)** Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313(5785):363-7.
- Lazzaretti D, Tournier I, Izaurralde E. (2009)** The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* 15(6):1059-66.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993)** The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75(5):843-54.
- Lehmeier T, Foulaki K, Lührmann R. (1990)** Identification and characterization of novel Sm-autoantigens associated with the major snRNPs U1, U2, U4/U6 and U5. *Mol.Biol.Rep.* 14, 175.
- Lerner MR, Seitz JA. (1979)** Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *PNAS* 76, 5495-5499.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005)** Conserved seed pairing, often flanked by adenines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120(1):15-20.
- Liang XH, Crooke ST. (2011)** Depletion of key protein components of the RISC pathway impairs pre-ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 39(11):4875-4889.

- Lin H, Spradling AC. (1997)** A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124(12):2463-76.
- Lingel A, Simon B, Izaurrealde E, Sattler M. (2003)** Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426(6965):465-9.
- Lingel A, Sattler M. (2005)** Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol.* 15(1):107-15. Review.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. (2004)** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437-41
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ. (2005)** A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* 7(12):1261-6. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2006 Jan;8(1):100.
- Ma JB, Ye K, Patel DJ. (2004)** Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429(6989):318-22.
- Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. (2005)** Structural basis for 5'-end- specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434(7033):666-70.
- Maden BE, Hughes JM. (1997)** Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma* 105 (7-8): 391-400.
- Makarova KS, Wolf YI, van der Oost J, Koonin EV. (2009)** Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol. Direct.* 4:29.
- Maniatis T, Reed R. (1987)** The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* 325, 673-678.
- Massana R, Taylor LT, Murray AE, Wu KY, Jeffrey WH, DeLong EF. (1998)** Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic Archaea in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. *Limnol. Oceanogr.* 43:607-617.
- Matera AG, Terns RM, Terns MP. (2007)** Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 209-220.
- Mattick JS. (2001)** Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep* 2: 986-991.
- Mayes AE, Verdone L, Legrain P, Beggs JD. (1999)** Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J* 18(15):4321-4331.

- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. (2004)** Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 15(2):185-97.
- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. (2005)** Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol.* 15(23):2149-55.
- Miyoshi K, Okada TN, Siomi H, Siomi MC. (2009)** Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the *Drosophila* miRNA pathway. *RNA* 15(7):1282-91.
- Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. (2007)** One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89(6):687-96.
- Mowry KL, Steitz JA. (1987)** Identification of the human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3' end maturation of histone pre-messenger RNA's. *Science* 238: 1682-1687.
- Muffler A, Traulsen DD, Fischer D, Lange R, Hengge-Aronis R. (1997)** The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the σS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 297-300.
- Mura C, Cascio D, Sawaya MR, Eisenberg DS. (2001)** The crystal structure of a heptameric archaeal Sm protein: Implications for the eukaryotic snRNP core. *PNAS* 98(10):5532-5537.
- Mura C, Kozhukhovsky A, Gingery M, Phillips M, Eisenberg D. (2003 a)** The oligomerization and ligand-binding properties of Sm-like archaeal proteins (SmAPs). *Protein Sci.* 12(4):832-47.
- Mura C, Phillips M, Kozhukhovsky A, Eisenberg D. (2003 b)** Structure and assembly of an augmented Sm-like archaeal protein 14-mer. *PNAS* 100(8):4539-44.
- Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM, Hannon GJ. (2007)** Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev.* 21(6):682-93.
- Murray AE, Preston CM, Massana R, Taylor LT, Blakis A, Wu KY, DeLong EF. (1998)** Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2585-2595.
- Nakanishi K, Weinberg DE, Bartel DP, Patel DJ. (2012)** Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* 486(7403):368-74.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990)** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2(4):279-289.
- Nishida KM, Saito K, Mori T, Kawamura Y, Nagami-Okada T, Inagaki S, Siomi H, Siomi MC. (2007)** Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA* 13(11):1911-22.

- Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. (2008)** The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* 453(7196):803-6.
- Okamura K, Lai EC. (2008)** Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(9):673-8. Review.
- Olovnikov I, Chan K, Sachidanandam R, Newman DK, Aravin AA. (2013)** Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol Cell* 51(5):594-605.
- Ortom UA, Nielsen FC, Lund AH. (2008)** MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 30(4):460-71.
- Parker JS. (2010)** How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence* 1: 1-10.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. (2005)** Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434(7033):663-6.
- Pfaff J, Hennig J, Herzog F, Aebersold R, Sattler M, Niessing D, Meister G. (2013)** Structural features of Argonaute-GW182 protein interactions. *PNAS* 110(40):E3770-9
- Pichinuk E, Wreschner DH. (2010)** Similarities between Argonautes and the alpha-saracina-like ribotoxins: Implications for microRNA action. *Protein Sci.* 19(6):1272-8.
- Qi Y, Denli AM, Hannon GJ. (2005)** Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol Cell* 19(3):421-8.
- Rajewsky N. (2006)** microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 38 Suppl:S8-13. Review.
- Rana TM. (2007)** Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):23-36. Review.
- Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E. (2005)** A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11(11):1640-7.
- Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L. (2005)** Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol.* 12(4):340-9.
- Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H, Bartel DP. (2006)** Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* 127(6):1193-207.
- Ruvkun G. (2001)** Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294(5543):797-9.
- Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. (2007)** Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* 21(13):1603-8.

Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Séraphin B. (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J.* 18(12):3451-62.

Samarsky DA, Fournier MJ, Singer RH, Bertrand E (1998) The snoRNA box C/D motif directs nucleolar targeting and also couples snoRNA synthesis and localization. *EMBO J.* 17 (13): 3747–57.

Sarot E, Payen-Groschêne G, Bucheton A, Pélisson A. (2004) Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *Genetics* 166(3):1313-21.

Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82:323–330.

Schattner P. (2002) Searching for RNA genes using base-composition statistics. *Nucleic Acids Res* 30(9):2076–2082

Schubert T, Pusch MC, Diermeier S, Benes V, Kremmer E, Imhof A, Langst G. (2012) Df31 Protein and snoRNAs Maintain Accessible Higher-Order Structures of Chromatin. *Molecular Cell* (48): 031–040.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2):199-208.

Schwarz DS, Tomari Y, Zamore PD. (2004) The RNA-induced silencing complex is a Mg^{2+} -dependent endonuclease. *Curr Biol.* 14(9):787-91.

Scofield DG, Lynch M. (2008) Evolutionary diversification of the Sm family of RNA-associated proteins. *Mol Biol Evol* 25, 2255-2267.

Séraphin B. (1995) Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J* 14, 2089-2098.

Shapiro L, Franze de Fernandez MT, August JT. (1968) Resolution of two factors required in the Q-beta-RNA polymerase reaction. *Nature* 220, 478-480.

Sheng G, Zhao H, Wang J, Rao Y, Eian W, Swarts DC, van der Oost J, Patel DJ, Wang Y. (2013) Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *PNAS [in press]*

Shi Z, Ruvkun G. (2012) The mevalonate pathway regulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* 109(12):4568-73.

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305(5689):1434-7.

- Straub J, Brenneis M, Jellen-Ritter A, Heyer R, Soppa J, Marchfelder A. (2009)** Small RNAs in haloarchaea: identification, differential expression and biological function. *RNA Biol* 6:281–292
- Su H, Trombly MI, Chen J, Wang X. (2009)** Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev.* 23(3):304-17.
- Swarts DC, Jore MM, Westra ER, Zhu Y, Janssen JH, Snijders AP, Wang Y, Patel DJ, Berenguer J, Brouns SJ, van der Oost J. (2014)** DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Agronaute. *Nature* 507(7491):258-61.
- Taft R, Glazov E, Lassmann T, Hayashizaki Y, Carninci P, Mattick J. (2009)** Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA* 15 (7): 1233–1240.
- Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S. (2009)** Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* 15(6):1078-89.
- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hedges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ. (2008)** Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453(7194):534-8.
- Tan EM, Kunkel HG. (1966)** Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic *lupus erythematosus*. *J. Immunol.* 96 (3): 464–71.
- Tharun S, He W, Mayes AE, Lennertz P, Beggs JD, Parker R. (2000)** Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* 404(6777):515-8.
- Thore S, Mayer C, Sauter C, Weeks S, Suck D. (2003)** Crystal structures of the *Pyrococcus abyssi* Sm core and its complex with RNA. Common features of RNA binding in archaea and eukarya. *J Biol Chem.* 278(2):1239-47.
- Till S, Lejeune E, Thermann R, Bortfeld M, Hothorn M, Enderle D, Heinrich C, Hentze MW, Ladurner AG. (2007)** A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol.* 14(10):897-903.
- Törö I, Thore S, Mayer C, Basquin J, Séraphin B, Suck D. (2001)** RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *EMBO J.* 20(9):2293-303.
- Törö I, Basquin J, Teo-Dreher H, Suck D. (2002)** Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the Sm1 and Sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76, 4350-4354.

- Tsui HC, Leung HC, Winkler ME. (1994)** Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 13, 35-49.
- Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. (2006)** A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 313 (5785): 320-4.
- Varani G, McClain WH. (2000)** The G-U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO J* 19(1): 18-23.
- Vasudevan S, Steitz JA. (2007)** AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128(6):1105-18.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. (2007)** Switching from repression to activation: microRNAs can upregulate translation. *Science* 318(5858):1931-4.
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. (2002)** Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297(5588):1833-7.
- Waege I, Schmid G, Thumann S, Thomm M, Hausner W. (2010)** Shuttle Vector-based transformation system for *P. furiosus*. *Appl Environ Microbiol*. 76(10):3308-3313.
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H. (2008)** Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453(7194):539-43.
- Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T, Patel DJ. (2008 a)** Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 456: 921-926.
- Wang Y, Sheng G, Juranek S, Tuschl T, Patel DJ. (2008 b)** Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* 456(7219):209-13.
- Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E. (2009 a)** Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol*. 16(11):1148-53.
- Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS., Tuschl T., Patel DJ. (2009 b)** Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* 461: 754–761.
- Will CL, Lührmann R. (2001)** Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13, 290-301.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. (2004)** MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304(5670):594-6.

- Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC. (2006)** Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127(4):747-57.
- Yuan YR, Pei Y, Ma JB, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, Chen HY, Dauter Z, Tuschi T, Patel DJ. (2005)** Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*. 19(3):405-19.
- Zago MA, Dennis PP, Omer AD. (2005)** The expanding world of small RNAs in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 55(6):1812–1828
- Zekri L, Huntzinger E, Heimstädt S, Izaurralde E. (2009)** The silencing domain of GW182 interacts with PABP to promote translational repression and degradation of miRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* 29:6220-6231.
- Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, Filipowicz W. (2009)** Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* 15(5):781-93.

VIII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elemente wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

1° AK	primärer Antikörper
2° AK	sekundärer Antikörper
AA	Acrylamid
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	D,L-Dithiotreitol
et al.	<i>et alii / et aliae</i> , und andere
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
KFB	Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik
Lsg.	Lösung
M	Molar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSA	Multiple Sequenz Alignment
MWCO	Molecular Weight Cut Off
ncRNA	short non-coding RNA
nt	Nukleotide
p.A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
pH	Pondus hydrogenii (Wasserstoff-Exponent)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per

	minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SME	synthetisches Meerwasser
<i>spec.</i>	Spezies
sRNA	small Ribonukleinsäure
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
UZ	Ultrazentrifugation
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
v/w	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
YE	Hefeextrakt

2. Sequenzdaten

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen der verwendeten Konstrukte dargestellt. Sequenzbereiche, welche für die Konstruktion von Primern verwendet wurden, sind rot dargestellt. Die Farbgebung der einzelsträngigen DNA-Sequenzen wird in den entsprechenden Abschnitten detailliert beschrieben.

2.1. pMUR315

Doppelsträngige Sequenz des Inserts

ttcttttggaaatttcaactttaacttttgcacaaaacagactgtttccagcctgttatcgaaaggtttatatatg < 800
 aagaaaaccttaaagtgataaattgaaaaacaagggttgcacaaaaggctggacaaatagttccaaatatac
 730 740 750 760 770 780 790

HpaI
 |
 caaacgcctaagttacccgcagattaccgaaatgaggtggatgaATGAACCTTGAAGAGCTTGTGAGAAGGTAGCA < 880
 gtttgcggattcaattggagcgtcaatggcttactccaccataactTACTTGAAACTTCTCGAACACTTCCATCGT
 810 820 830 840 850 860 870

AGCGGTGAAATTAAAGCTCCACCAGGTCGAGAAGTACACGAACGGCGATAAAAGCTCGCGACTGAAATAAGAAGAAAAGC < 960
 TCGCCACTTTAATCGAGGTGGTCCAGCTTCATGTGTTGCCCTATTTTCGAGCGTCACTTTATTCTTCTTTCG
 890 900 910 920 930 940 950

Bsp1286I
HindIII **BaeGI**
 | |
 CCTTGAGAAAAAGCTCGGAATAAGCTGAGAACATCGGGCACTACTCAATAGATCCAACCGAGTCATAGGAAAGAAC < 1040
 GGAACCTTTTCGAGCCTTATTCGAACCTCTGTAGCCGTATGAGTTATCTAGGGTTGGTCCAGTATCCTTCTTGT
 970 980 990 1000 1010 1020 1030

BsaHI **NcoI**
 | |
 TTGAGAACATGATCGCGCTCGTCCAGATACCCATGGCGTTGCTGGGCCGTTAAATCAACGGCGAGTACCGCGAAAGGA < 1120
 AACTCTTGACTAGCCGCAGCAGGTCTATGGTACCCGCAACGACCCGGCAATTAGTTAGTGCCTCATCGCCTTCT
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110

| | |
 <RpaBI <R1.BceSIV
 <R1.BceSIV TseI
SacII <BbvI
 | ||
 GAGTTTACATTCTCGCCACAACGAGGGCGACTCGTGCAGCGTGAACCGCGCTGTTCTGCCTTGACCGCTGC < 1200
 CTCAAAATGTAAGGAGAGCGGTGTTGACTCCCGCTGAGCAACGCTCGCACTTGGCGCCGACAGACGGAACGGCAG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

MauBI
 |
 GGGAGGCCTTAAGACAACCCATAAGACGACAAGATGACGCGCGCCACTCCTCAAGTGTCCGACGCGAGGAGGGCTA < 1280
 CCCTCCGCAATTCTGTTGGATTATCTGCTGTTACTCGCGCGCGTGGAGGTTACAGGGCTGCGCTCCCTCCGAT
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270

PfoI **BstEII** <BbvCI
 | | |
 GAGAAGTTGCTGAGTGGGTGAAGAACACCTTGACTACCTCCAGGAGAAGGGCGCTCAAAGGTACCGAGGCACGGGAAG < 1360
 CTCTTCAACGACTCACCCACTTCTGTTGGAACCTGATGGAGGTCTTCCCGCAGAGTTCCAGTGGTCCGTGCCCTTC
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350

>CjeI
 |
 CTGAGGGGTAGGCCATTATCGGGCAACAAACCTCTATTACGCTTGAGTTGAGACCGCGATGCAATGGGAAT < 1440
 GACTCCCCACATCCGGTAAGTAGCAGCCGTTGGAGATAATGCGAAACTCAAGCTGGCGCTACGTTACCCCTA
 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430

EcoRI <BmgBI
 | |
 GAACATGGTCACGATAGCGAGCGAGGAGATAATGAAGGTACCGAGGAGAATCCCCGACGTGAAGTATCTGCACTCT < 1520
 CTTGTACCAAGTGTCTATCGCTCGCTCTATTACTCCAGTAGCTCCCTTAAGGGCTGCACTCATAGAACGTGAGA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510

>MaqI
 |
 CGGGCAACCTCTCGCTTGACAAGAACGCCAACCGCATGAACTTCATCAACGGGAGGGCAAGACCGTCATTGCCAGGCC < 1600
 GGCGCTGGAGACGCAACTGTTCTCGGGTGCCTACTTGAAGTAGTTGCCCTCCCCGTTGGCAGTAACGGCTCCGG
 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

>DraRI
 |
 GTGATTCTCGGAAGATCGTCGAGGAGAAGCTGAAGAACACGCCCTGAACCTAGCCGAGGTGAACCTACCGCAAGAACCT < 1680
 CACTAAGGAGCCTCTAGCAGCTCCCTTCGACTTGTGCGACTTGAGTATCGGCTCCACTTGATGGCGTTCTTGG
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670


```

>BsrI
|
tctacttactggttcagtcttaaaaaccttgcgcggAACAAAGCTGGGAGGAGACGATTGAAAAAAAGAATTGAGGAGTGGGATGATTAGTGTG
agatgaatgaccaaaagtcaagaattttggaaagcgccgttttaggtcggtttttctttgggtcccggttattggac < 2720
2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710

>TspGWI
<BsgI
|
tacctgcacggactaaggtaacagacaggtaggaacaatcctcgaaatcagccacacaacagtctggaaacagtcggaaaa < 2800
atggacgtgcgttattcaatgtctgtccatcctgttaggagcttagtcgggtgttcagacccttgcaggttt
2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790

MfeI
|
attcgcgaaagcagtttaccagccaaaaatcctcgactcaaaaaacagagaaacttcatcgaatttgcacggacagtcgat < 2880
taagcgcttcgtcaatggtcggtttaggagcgtcagttttgtcttgaagtagcgttaactgtctgtcact
2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870
rightPF0536EcoRV

taagatcccatt < 2892
attctaggat < 2890

```

Einzelsträngige Sequenz des Inserts

Zusätzlicher Überhang:	1-3
EcoRV/SmaI – Schnittstelle:	4-9
PF0537do:	10-609
HMG-CoA Reduktase Tk0914 mit Gdh Promotor und Gdh Terminator:	610-2196
PF0537up:	2197-2883
EcoRV/SmaI – Schnittstelle:	2884-2889
Zusätzlicher Überhang:	2890-2892

```

ATCCCCATCTCATCACACAGGGAGGAAGAGCTAAATCTTGGAGAGAGACGATTGAAAAAAAGAATTGAGGAGTGGGATGATTAGTGTG
GGAATTAGAGGATTTGGGGCTTGAATCAAGGTTCTCACCAAAAAACATTACTATGGTGAAGTTGAATAAAAGCAGATTAAACCTT
CTCTCTGGTGTCAAGTTATTGATCAAAGACCTTTATATTTGCTTGCCTTACAAGAAAAGCATTGATAAAAGACTGCAATAAATCCGAA
AAAGGAAAAGTAATAGATATGGTAATGGACGAGAAAGATAGTCCTATATACTCCAGGAGATCGCAGAAGAGCTGGATCTTAAGCTGT
TATCAGAAAAGTGTGAATACGTGGGGCCGCTCCCTACCTATAATGTTATCTGCCAATCTCACCGCAAGGTTAAAAATTCTTAA
TAAGCATAGAGTTTCGAGTATGGACCGGTAGCCTAGCCAGGATAAGGGCGCCCTCTAAGCCGCAGGTCCGGGTTCAAATCCCCG
CCGGTCCGCAAGTTCTTTAGACTTTTGGATTATTTCTGGTACGATCAAGAAACTATGATATTAGGATAAGGGCATT
TCATCATTTTGAACCTTGTGAACGCTAAAGTCCTTGGTGTATAAAAATTCTCGATGTACATCGCTCTTGGCAGATCT
CGAGAATTGGCTTGTCTTTGGAAATTTCACTATTAACCTTTGGTCAAACAGACTGTTCCAGCTGTTATCGAAAGGTT
TATATATGCAAACGCTAAGTTAACCTCGCAGATTACGAAATGAGGTGGTATGAACGTTGAAGAGCTGTTGAGAAGGTAGCA
AGCGGTGAAGATTAGCTCACCAGGTGAGAAGTACACGAACCGCATAAAAAGCTCGCAGTGAATAAGAAGAAAAGCCCTTGAGA
AAAAGCTCGGATAAAAGCTGAGAACATCGGGCACTACTCAATAGATCCAAACCAGGTATAGGAAAGAACATTGAGAACATGATCGG
CGTGTCCAGATACCCATGGCGTTGCTGGCCGCTTAAACCAACGGCGAGTACCGCAGAGGAGAGTTTACATCCCTCTGCCACAC
ACTGAGGGCGCACTCGTGCAGCGTGAACCGCGGCTTCTGCCCTGACCGCTGCCGGAGGCGTTAAGACAACCTTAATAGACGACA
AGATGACGCGCGCCACTCTCAAGTGTCCGACCGCAGGAGGGCTAGAGAAGTTGCTGAGTGGGTGAAGAACACCTTGACTACCT
CCAGGAGAAGCGGTCTCAAGGTACACGGCACAGGAAGCTGAGGGGTGTTAGGCATTATCGTGGCAACACCTATTTACGC
TTGAGTTGAGACCGCGTGAATGGAATGAACATGGTACGATAGCGCAGGAGATAATGAAGGTACATGAGGAGGAATTCC
CCGACGTGAAGTATCTGCACTCTCCGCAACCTCTCGGTGACAAGAGCCCAACCGCAGTGAACCTCATCAACGGAGGGCAAGAC
CGTCACTGGCGAGGCCGATTCTCGGAAGATCGTGCAGGAGAAGCTGAAGACAACGCCCTGAACATCATAGCCGAGGTGAACCTACCGC
AAGAACCTCGTTGGTCAAGCAGGCCGCTCGTACGGTTCAAGCTCGGAAACATCGTGGCGGATATTCTCTGCTACCG
GGCAGGAGCAGGCCAGATAACAGAAGGATCACACGGCATAACTCTCGCGAAGTAACCGCAGAGGGCGACCTCTACATCAGCATCAC
CATGCCGACCTTGAGATTGGGACAGTGGCGAGGTACAAGAGTCCCAACCGCAGAGGGAGGCTCTCGATTATGGCGTTGCCGA
GGTGGAGACCCACCGGGACGAACGCCAGAAGTTCGCGGAGATAGTCGCTGGAGCAGTCTCGTGGCGAGCTTCCCTTCTCTGCTACTTCTGACG
CGATAGCGCGAAGCAGCACCTAGCAAGGCCATAAGGAGCTGGACGTTAGTTCTCCCTTCTCTGCTTACTTTCTGACG
TTCTGATGGTTCTAAGATTTAAACCAACTTGGCGCTATTCAAAACTAAATAAAAGCAGAACAGAAGTTAACCTCGCATT
AACTTTCTATTTAAACAAATTCTAACCTCTATCAGTCTCAATCCCTCCATAAAACTCTTCTTAATTACTTTGCTTCTAAAGT
CTAACCTTCTAGTATGAGATATAGTAATTGATGCTTCCCTGAACCTCTGGCTACCTCATTATCTCTCTTAATCCTTCAGTAAG
CCTGAGAACTAGAACTAAATTCTCAACTTATAGCCTTTTTATAGTCCCTATAATTCTCTGCTAAAGGCTATTCTCAAACCT
CAGTGATTCCAAATAATTGTCTATGCTCTATGTTCTTAAAGGAGCTAAAGAGATAAAAGGTTCTGCTGGAGAG
ACACTGTCAGGATAAGCAGTGGGACGTTAGGTTAAGTCTGATACCTCTCAGAAAAGGGAGAGAAATGAGGACTGAAACCATTA
TCTACTTACTGGTTCTAGCTTAAACACCTTCCGGAAACAAATCCCAGCAGAAAAGAAAACCAGGGCAATAACCTGTACCTGCA
CGGACTAAGTTACAGACAGGTAGGAACAATCTCGAAATCAGCCACACAACAGTCTGGGAAACAGTCTGGGAAACAGTCTGGGAAAGCAGTT
TACCAAGCCGAAACCTCTCGCAGTCAAAACAGAGAAACTTCATCGCAATTGACGAGACAGTGTAAAGATCCCATG

```

2.2. pMUR272

Doppelsträngige Sequenz des Inserts

FwdFr-BPPromotorPstI ctgcagt ccttaacattctccaaaat attcggattgtttaatattaactgagat taattacaat acgacaata < 80
 10 20 30 40 50 60 70

aatctcacaagataaaaagtttatagaaaatttcttcatcattctgggtgataatgttataaagttat < 160
 attagagtgttttataatctttaaaagaagtagtaagaccacttataaattgactctaaatataatgtttatgctgttat
 90 100 110 120 130 140 150

>NlaCI

Fwd Ago Protein | Fr-BP Promotor

tagaaaaatgttaacataagttgtaaaattctgagggtaaaaATGCACCATCATCACACCATAAAGCAGAAAGTGC < 240
 atccttttacaattgtattcaaacat ttaagacccactttTACGTGGTAGTGTGGTATTCGCTTCAAC
 170 180 190 200 210 220 230

RevFr-BPPromotor

AseI | >AquiIV

TTATAATCTGGTAAAGATAAATAAAAAATAATCCAGATAAAATATGTATATAGGCTCTTAATGACCCAGAGGAA < 320
 AATAATTAGACCATTCTATTATTTTATTAAAGGTCTATTATACATATATCCGAGAAATTACTGGGTCTCCT
 250 260 270 280 290 300 310

NdeI | **AclI** | <AlwI

GAACTTCAAAAAGAGGGATATTCTATTATCGCCTTGCATATGAAACGTTGGTATTGTTATTGATCCAGAGAATCTGAT < 400
 CTGAGTTTCTCCCTATAAGATAAATAGCGAACGTATACTTTGCAACCATAACAATAACTAGGTCTCTAGACTA
 330 340 350 360 370 380 390

AvaI | **Nli3877I** |

TATTGCCACCACAAAGAGCTTGAATATGAGGGAGAATTATTCCCGAGGGTGAAATATCATTCTCGGAATTGCGTAATG < 480
 ATAACCGGGTGTCTCGAACTTAACTCCCTTAAATAAGGGCTCCACTTTATAGTAAGAGCCTAACGCATTAC
 410 420 430 440 450 460 470

AfI |

ACTATCAGAGTAAACTTGTCTTAAGATTGTTGAAGGGAGAATGGAATAGGTGAATATGAATTATCGAAACTCTTAGGAAG < 560
 TGATAGTCTCATTGAACAGAATTCTAACAACTTCTTACCTTACACTTAACTTAATAGCTTGAAGAATCCTC
 490 500 510 520 530 540 550

TTTAGAAAACCAAAACTTTGGGGATTATAAGGTCAATTCCAAGCGTTGAGATGAGTGTGATAAAGCATGATGAAGATT < 640
 AAATCTTGGTTTGAAACCCCTAATATTCCAGTAAGGTTCGCAACTCTACTCACACTATTCGTACTACTTCTAA
 570 580 590 600 610 620 630

<RleAI |

TTATTTAGTAATTCAATAATTCAAAATACAATCAATGAAAACACTGTGGGAGCTGTAAACAAAGACCCCTAAAGAGC < 720
 AATAATCATTAAAGTATTAAGTAGTTATGTTAGTTACTTTGTGACACCTCGAACATTGTTCTGGGATTCTCG
 650 660 670 680 690 700 710

<HgaI | **<BsrDI** |

TTGAAGAGTTTAATGACTCACAAGGAAATTAAATGCTGAAGGGACATTGCGTCACCACTTAAACTGTTATAAGCCT < 800
 AACTCTCAAAATTACTGAGTGTCTTTAAATTACGACTTCTGTAAACGAGTGGTAATTGACAAATATTCTGG
 730 740 750 760 770 780 790

BstZ17I | **BcI** | **Scal** |

TGCTTGAAGAGTAACTAAAAACCAAAACTGATCATAATCAAGAAATAGTAAAGTACTGGTATAATTATCATATTGA < 880
 ACGAAACTCTCATATGATTGGTTGAAGTAGTATTAGTTCTTATCATTCATGACCCATATTAAAGTATAACT
 810 820 830 840 850 860 870

MscI
EaeI

|

AAGATATTGAAACTCCAGAAGCTAATTAGAGTTATAGAAAATTGGCAAGTTGATTAAAACACCTGCAATTCTCTCTGCCCCAATTAGTTGTCCTTAAACCGGTTCAACTAAATTGGACGTTAAG < 960
TTCTATAACCTTATGAGGTCTCGATTAACTCAAATATCTTTAAACCGGTTCAACTAAATTGGACGTTAAG
890 900 910 920 930 940 950

PlaDI

|

TAGCGAAATTGATCTAAAATAAGAAAAACAAAATTACAAGATATCTCTTGGCCCAATTAGTTGTCCTTAAACCGGTTCAACTAAATTGGACGTTAAG < 1040
ATCGCTTAAACGTAGATTTATTTCTTTAATGTTCTATATAGAGAACGGGTTAATCAACAGGGTTGAATA
970 980 990 1000 1010 1020 1030

>AquiII

|

AACGCCGAACAATTAGAAAGTGACGTGGCGAAAGAAATTAGAATATACAAAACGTGATGCCAGAAGAACGTAAGAGCT < 1120
TTGCGGCTTGTAACTTTCACTGCACCGTTCTTAAATCTTATATGTTGACTACGGTCTTGTGATTCTCGA
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110

<FokI
<BtsCI
<StsI

|

TTTAGAAAACATCCTTGAGAAAGTTGATAGTGACATTATAGACAAATCATTAAGTGAAGATTGAAAGTAGAAAAATTGCAC < 1200
AAATCTTTGTAGAACGCTTCAACTATCACTGTAATATCTGTTAGTAATTCACTTAACTTCATCTTTAACGTG
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

EcoRI

BaeI **XbaI**

| |

AAGAATTGGAAAACAAAATAAGGGTTAGAGATGACAAAGGGAACAGTGTACCAATTCTCAATTAAATGTTCAAAAATCT < 1280
TTCTTAACCTTTGTTTATTCCAATCTACTGTTCCCTGTACATGGTAAAGAGTTAACTTACAAGTTAACGTGTTAGA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270

ClaI

Ca

|

CAATTACTACTTGACGAATTATTCAAGAAAATTCAGTTATATTGCTTATGAAGTTCCAGAAAAGTCAGAAAAT < 1360
GTTAATGATGAAACCTGCTTAATAAGTCTTTATAGTCATAACGGAAACTTCAAGGTCTTTCAAGTCTTTA
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350

EcoRI

NspI

|

ACGGGAGATAACCAATGTTATAATTCTAGATTTCAGGACTTCTGCCGACATTCAAAATTTCGAACTAATGAATTCAAGGG < 1440
TGCCCTCTATGGTACAAATATTAAGATCTAAGTCTGAAGAACGGCTGTAAGTTAACGTGATTACTTAAGTCCC
1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430

BbvI
BisI
TseI
<R1.BceSIV
BthCI
BlsI
Fnu4HI

BspHI **StuI**

| |

GGATTACCCTTTAGACTTCGTGGAAAGAAAAGGTATAACTGAAGATTAAACTCTGACAAAGGTATTAGAAGT < 1600
CCTAATGGGAAAATCTGAAAGCACCTTCTTTCAATATTGACTCTAAATTGAGACTGTTCCATAATATCTCA
1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

SwaI

|

TGTGGAGCAGGTATCTAGTTCATGAAAGAAAAGAAACTAGGCCATTAGCTGCAAGAAATAACCTTCATCTG < 1680
ACACCTCGTCCATAGATCAAAGTACTTCCTTTCTGATCCGGATCGAAATATCGACGTTCTTATTGAAAGTAGAC
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670

SalI

|

AGAAGTTGAGGAAATTAAAGGAGACTCTTAAATTAAATGTAATATCTCAAGTGGTTAACGAAGATACTTAAAAAAT < 1760
TCTTCAAACCTTTAATTCCTGAGAAATTACATATAGAGTTCACCAATTGCTTATGAAATTGAA
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750

>ApyPI

AAAAGAGACAAATACGATAGAAATCGACTTGATCTATTGTCAGACACAACTTACTTTCAAGTATTATCTAAACTTGG < 1840
 TTTCTCTGTTATGCTATCTTAGCTGAACAGTCTGTGTTGAATGAAAAGTCATAATAGATTGAACC
 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830

AGTAAAGTATTATGTGCTAGATTACAGGTTCAATTATGACTACATCATTGAAATTGATGTTGCTCCATGAAGCGTTCTG < 1920
 TCATTTCTATAACAGATCTAATGTCAGTTAACACTGATGTTAACCTTAACACAGGGTACTTCGAAGAC
 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910

<BceAI
<BcefI

AGGGATATATAGGTGGTAGTGGCGTAATGTTGACTCTCAAGGTTACATACGAAAAATTGTCCTAATTAAATTGGTGAA < 2000
 TCCCTATATATCCACCATCACGGCATTACAAACTGAGAGTCCAATGTTAACAGGGTAAATTAAACCACTT
 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990

<BsaXI
>BseRI **>NgoAVIII**
>AqIII **>SdeOSI**

CAAAGAGGAGAATCAGTTGACATGAATGAGTTTCAAAGAAATGGTTGATAAATTAAAGAGTTCAATATTAAGCTAGA < 2080
 GTTCTCCTTACTGCAACTGTACTTACCAACTATTAAATTCTCAAGTTATAATTGATCT
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070

Bsp1286I
BanII

TAATAAGAAAATACTACTTCTAAGAGATGGAAGAATTACTAATAACGAAGAAGAAGGGCTCAAGTATATTCCGAGATGT < 2160
 ATTATTCTTTATGATGAAGATTCTACCTCTTAATGATTATGCTCTCTCCGAGTTCAATAAAGGCTCTACA
 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150

<CdiI **DraIII** **AvrII**

TTGATATTGAGGTGGTCACGATGGACGTGATAAAAAATCACCTGTGAGAGCCTTGCTAATATGAAAATGACTTTAAC < 2240
 AACTATAACTCCACCACTGCTACCTGCACTATTTTAGGGACACTCTCGAAACGATTATACTTTACATGAAATTG
 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230

CTAGGTGGTGCATATACCTAATCCCCATAAGCTAAACAGCTAAAGGAACACCAATACCAATAAGTTAGCCAAAAA < 2320
 GATCCACCACGTTATATGGATTAGGGGGTATTCGAGTTGTTGATTCGATTTCCTTGTTATGGTTATTCATCGTTTT
 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310

ZraI
AatII
BsaHI **EcoRV**

GAGGATAATTAAGAATGGAAAAGTCGAGAAGCAGAGTACTAGACAGGACGCTTAGATATCTCATTAACTCGTC < 2400
 CTCCTATTAAATTCTTACCTTTAGCTCTCATAGTGATCTGCTCTGAGATCTAGTAAAGTAAATTGAGCAG
 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390

Cac8I
<AciI

TTAACTATGGAGTATTCCTGCTGATATGCGGTTGCCAGCACCGCTTCACTATGCTCACAAGTTGCAAATGCAATCAGA < 2480
 AATTGATACCCCTATAAGACGACTATACGCCAACGGCTGGCAAGTGATACGAGTGTCAAACGTTACGTTAGTCT
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470

<Bpu10I
<BbvCI

EcoNI

AATGAATGGAAAATAAAAGAAGAGTTCCTGCTGAGGGATTTGTATTTGTTGAcattaacttttctattaaaca < 2560
 TTACTTACCTTTATTTCTCAAGGAACGACTCCCTAAACATAAAACAAACTgttaattgaaaaagataaatttg
 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550

<BbsI
<Bbr7I

atttctaacctcatcagtcataatccctccataaaaactctttcttaattactttgtcttctaaaagtctaacccctta < 2640
 taaagattggagatagttagagttggggatatttgagaaaagaattatgaaacagaagatttcagattggaaat
 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630

gtatgagatatagtaaattgtatgtttccctgaactccttggctacccatatatctctttaatcctttagtaaggct < 2720
 catactctatcatttacatacggaaaggacttggaggaccatggaaagtagaataagagaaattaggaagtcattcgga
 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710

Rev Ago Terminator PstI

gagactgcag < 2730
 ctctgacgtc

Einzelsträngige Sequenz des Inserts

Zusätzlicher Überhang:	1-3
PstI – Schnittstelle:	4-9
Fr-1,6-BP-Promotor:	10-198
PF0537 mit 6xHis-Tag und Terminator:	199-2730
PstI – Schnittstelle:	2731-2733
Zusätzlicher Überhang:	2734-2736

CACCTGCAGTCCTAACATTCTCCAAATATTCGGATTGTTAATATTTAACTGAGATTAAATTACAAATACGACAATATAATC
 TCACAAAGATAAAAGTTTATAGAAATTTCTCATCATTCTGGGTGATAATGTTTATCAAAGTAAGTTTATTAGGAAAAATGTT
 AACATAAGTTGTAATCTGGAGGTGAAAAATGCACCATCATCACCACATAAGCGAAAGTTGTTAATCTGGTAAAGATAA
 ATAAAAAAATAATTCCAGATAAAATATGTTATAGGCTCTTAAATGACCCAGAGGAAGAACTCAAAAGAGGGATATTCTATTAA
 TCGCCTTGCAATTGAAACAGTTGGTATTGTTATTGATCCAGAGAACTGATTATTGCCACACAAAAGAGCTTGAATTGAGGGAGAA
 TTTATTCCCGAGGGTGAATATTCTCGGAATTGCGTAATGACTATCAGAGTAAACCTTGTCTTAAGATTGTTGAAGGAGAATGGAA
 TAGGTGAATATGAAATTATGAAACACTTCTAGGAAGTTTAGAAAACCAAAACTTGGGGATTATAAGTCATTCAAGCGTTGAGAT
 GAGTGTGATAAACATGATGAGATTATTAGTAATTCAATAATTCAACATCAATGAAAACACTGTGGGAGCTTGTAA
 AACAAAGACCTAAAGAGCTTGAAGAGTTTAATGACTCACAAGAAAATTAAATGCTGAAGGACATGCGTCAACCACTAAACTG
 TTTATAAGCCTGCTTGAAGAGTATACTAAAAACCAAAACTGTGATCATAATCAAGAAAATGTAAGACTGTGTTAATTATCATAT
 TGAAAAGATATTGAAATACTCCAGAAGCTAAATTAGAGTTTATAGAAAATTGGCCAAGTTGATTAAAACAACCTGCAATTCTAGCG
 AAATTGCACTAAAATAAAAGAAAACAAAATTACAAGATATACTCTTGGCCCAATTAGTTGTCCTAACCTATAACGCCGAACAAAT
 TAGAAAGTGACGTGGCGAAAGAAATTAGAATATACAAAACGTATGCCAGAAGAACGTAAGAGCTTTAGAAAACATCCTTGAGA
 AGTTGATAGTGACATTATAGACAAATCATTAAGTGAAGTAGAAAAATTGCACAGAAATTGAAAACAAATAAGGGTTAGA
 GATGACAAAGGGAACAGTGACCAATTCTCAATTAAATGTTCAAAATCTCAATTACTACTTTGGACGAATTATTCAAGAAAATATC
 CAGTTATATTGCCATTGAGTTCCAGAAAAGTTCAAGAAAATACGGGAGATACCAATGTTATAATTCTAGATTTCAGGACTTCTTGC
 CGACATTCAAATTTGCAACTAATGAATTCAAGGGATTAGTAAAGAGCATGTTACTATAGTCTTGGCCAAAAAATACAATAGTCTGCC
 AAAAAGCAAGGTCAACAAATGAAATTAGGATTACCTTTTAGCTTGTGGGAAAGAAAAGGTTAACTGAAGATTAACTCTG
 ACAAAAGTTATAGAAGTTGAGCAGGTATCTAGTTCATGAAAGGAAAAGAATAGGCTTACGCTTATAGCTGCAAGAAATAA
 ACTTTCATCTGAGAAGTTGAGGAATTAAAAGGAGACTCTTAAATTAAATGTAATATCTCAAGTGGTTAACGAAGATACTTTAAA
 AATAAAAGAGACAAATACGATAGAAATGACTTGATCTATTGTCAGACACAACCTACTTTCAAGTATTATCTAAACTGGAGTAA
 AGTATTATGTGCTAGATTACAGGTTCAATTATGACTACATCATTGAAATTGTTGCTCCATGAAGCGTCTGGGGATATAGG
 TGGTAGTGGCGTAATGTTGACTCTCAAGGTTACATACGAAAATTGTCCTAATTAAATTGGTGAACAAAGAGGAGAATCAGTTGAC
 ATGAATGAGTTTCAAAGAAATGGTGATAAATTAAAGAGTTCAATATTAAAGCTAGATAATAAGAAAATACTACTTCTAAGAGATG
 GAAGAATTACTAATAACGAAGAAGAAGGGCTCAAGTATATTCCGAGATGTTGATATTGAGGTGGTCAGATGGACGTGATAAAAAA
 TCACCCCTGTGAGAGCCTTGCTAATATGAAAATGACTTTAACCTAGGTGGTCAATATACTAACATCCCCATAAGCTCAAACAGCT
 AAAGGAACACCAATACCAATAAGTTAGCCAAAAGAGGATAATTAAAGATGAAAAGTCGAGAAGCAGAGTACTAGACAGGAGC
 TCTTAGATATCTTCATTAACTCGTCTTAACATGGGAGTATTCTGCTGATATGCCGTTGCCAGCACCCTGTCATGCTCACAA
 GTTGCAAATGCAATCAGAAATGAATGGAAAATAAGAAGAGTTCTTGTGAGGGATTGGTATTGTTGACATTAACTTTT
 CTATTTAAACAAATTCTAACCTCTATCAGTCTCAATCCCTCCATAAAAACCTTTCTTAATTACTTTGTCTTCTAAAGTCTAACCC
 TTAGTATGAGATATGAAATTGTTGCTTCCCTGAACTCCTGGTACCTTCATTATCTCTCTTAATCCTTCAGTAAGCCTGAGAC
 TGCAGCAC

3. Begleit-CD

Die Begleit-CD ist auf der Innenseite des rückwärtigen Umschlags angeheftet. Da möglicherweise einige Abbildungen in dieser Arbeit druckerbedingt nicht optimal wiedergegeben werden konnten, ist die Arbeit zusätzlich als PDF-Datei angehängt.

4. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Bosch
geboren am: 21. 02. 1980 in Deggendorf
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1986 – 1992 Grund- und Teilhauptschule Ottmaring / Wisselsing / Buchhofen
1992 – 1996 Landgraf-Leuchtenberg Realschule in Osterhofen
Abschluss: Mittlere Reife
2001 – 2003 Staatliche Berufsoberschule in Deggendorf
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1996 – 1999 Ausbildung zum Polizeimeister im Bundesgrenzschutz
(mittlerer Dienst)

Praktische Erfahrungen

1999 – 2001 Polizeidienst im Bundesgrenzschutz

Hochschulausbildung

Universität Regensburg

2003 – 2009 Studium der Biologie an der Universität Regensburg mit dem Thema „Wechselwirkung von Proteinen mit kleinen nicht-kodierenden RNAs von *Pyrococcus furiosus*“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Michael Thomm, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum

Promotion

Universität Regensburg

seit 2009 Promotion mit dem Thema „Analyse von kleinen RNAs mit RNA-bindenden Proteinen in *P. furiosus*“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Michael Thomm, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum

5. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Thomm für das spannende Thema bedanken. Ich danke für sein Interesse, die wissenschaftlichen Diskussionen und für das in mich gesetzte Vertrauen die verschiedenen Projekte sehr selbstständig bearbeiten zu können. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen interessanten Tagungen und Workshops bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Gunter Meister. Ohne seine Anregungen und sein Know-how wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Poul Valentin-Hansen (Universität Odense / Dänemark) für die Übernahme der Mentorentätigkeit bedanken. Durch seine Erfahrungen auf dem Gebiet der LSm- und HfQ-Proteine war er stets ein kompetenter Gesprächspartner.

PD Dr. Winfried Hausner gebührt großer Dank für die Übernahme der Mentorentätigkeit und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Natalie Asthausen, Corina Eichenseer und Anders Steno Olsen danke ich für ihr Engagement im Rahmen ihrer Labor-Praktika bzw. Bachelorarbeit.

Norbert Eichner vom Lehrstuhl Meister möchte ich für die Hilfe bei vielen Klonierungsarbeiten ausdrücklich danken.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gilt PD Dr. Oliver Bosch. In der Welt der Naturwissenschaft war ein vertrautes Gesicht der Familie stets wichtig und anspornend.

Ein besonderer Dank gilt meinen Schrebraumkollegen Antonia Gindner und Wolfgang Forster vom think tank, die stets für einen entspannten und lustigen Ablauf im Labor sorgten und mir bei jeglichen (Computer-)Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Mikrobiologie und Archaeenzentrum danke ich für so manche Hilfe bei unterschiedlichsten Problemen. Allen voran Elisabeth für die vielen Gespräche und für ihre Geduld beim Ausfüllen verschiedenster Formulare und Anträge. Besonders bedanke ich mich auch bei den „Huber-Mädels“ Gabi, Lydia, Steffi, Vroni und Pia. Ich habe euer Labor stets mit einem Lächeln verlassen.

Danke auch an Ulf Küper. Auch wenn du nicht mehr Teil des Lehrstuhls warst, so hattest du immer ein offenes Ohr für meine Anliegen. Danke für die Freundschaft fernab der Wissenschaft.

Danke auch an Erika und Ulrich Lattner für eure regelmäßige Unterstützung per Post und die humoristische Herangehensweise an naturwissenschaftliche Themen.

Danken möchte ich auch meiner Schwester Kerstin und den Rest der „Weber-Bande“. In eurer Anwesenheit konnte ich den stressigen Arbeitsalltag schnell vergessen.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern Marianne und Alois Bosch. Ihr wart immer für mich da. Danke für die Unterstützung. Danke für die Zuversicht. Danke für einfach Alles.

Ganz besonders danke ich natürlich Fili. Selbst in Zeiten größter Verzweiflung gabst du mir Halt und eine tröstende Schulter. Ohne dich hätte ich es nicht geschafft.

6. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt und durch meine Unterschrift, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig, ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist. Inhalte und Passagen, die aus fremden Quellen stammen und direkt oder indirekt übernommen worden sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Ferner versichere ich, dass ich keine anderen, außer der im Literaturverzeichnis angegebenen Literatur verwendet habe. Diese Versicherung bezieht sich sowohl auf Textinhalte sowie alle enthaltenden Abbildungen und Tabellen.

Regensburg, März 2014

Bosch Andreas