

# **Fluoreszenzbasierte Analyse von RNA-Protein-Interaktionen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Technische Universität Dortmund  
Fakultät Chemie und chemische Biologie

Vorgelegt von  
M. Sc. Laura Roszyk

2017

Referent: Prof. Dr. Susanne Brakmann  
Korreferent: Prof. Dr. Daniel Summerer

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von November 2013 bis Oktober 2017 am *Chemical Genomics Centre* (CGC) der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund unter der Anleitung von Prof. Dr. Sven Hennig durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit konnten in folgendem Beitrag veröffentlicht werden:

L. Roszyk, S. Kollenda, S. Hennig, Using a specific RNA-protein interaction to quench the fluorescent RNA spinach, ACS Chemical Biology, DOI: 10.1021/acscchembio.7b00332.

## I. Eidesstattliche Versicherung

M.Sc. Laura Roszyk

Matrikelnummer: 125566

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Fluoreszenzbasierte Analyse von RNA-Protein-Interaktionen“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## II. Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	RNA-Protein-Interaktionen.....	2
1.1.1.	Methoden zur Detektion und Analyse von RNA-Protein-Interaktionen .....	3
1.1.2.	Die RNA-Protein-Interaktion des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Phagen 7.....	5
1.2.	Mechanismen der Fluoreszenzlöschung .....	7
1.2.1.	Statische Fluoreszenzlöschung .....	7
1.2.2.	Dynamische Fluoreszenzlöschung.....	9
1.2.3.	Förster-Resonanz-Energietransfer .....	12
1.3.	Die <i>Spinach</i> -RNA .....	15
1.3.1.	Entwicklung und Eigenschaften des <i>Spinach</i> -DFHBI-Komplexes .....	15
1.3.2.	Die Struktur des <i>Spinach</i> -DFHBI-Komplexes.....	21
1.3.3.	Anwendungen des <i>Spinach</i> -DFHBI-Komplexes .....	23
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.1.	Material .....	27
3.1.1.	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.2.	Geräte .....	27
3.1.3.	Affinitäts-, Größenausschluss- und Ionenaustauschsäulen und -materialien.....	28
3.1.4.	Chemikalien .....	29
3.1.5.	Kits.....	29
3.1.6.	Medien und Puffer .....	30
3.1.7.	<i>E. coli</i> Stämme .....	31
3.1.8.	Plasmide.....	31
3.1.9.	Enzyme.....	32

3.1.10.	Oligonukleotide / gBlocks .....	33
3.1.11.	Chromophore .....	36
3.1.12.	Software .....	36
3.1.13.	Online-Tools .....	37
3.2.	Methoden.....	38
3.2.1.	Molekularbiologische Methoden .....	38
3.2.2.	Biochemische Methoden.....	46
3.2.3.	Fluoreszenzbasierte und spektroskopische Methoden .....	50
3.2.4.	Computerbasierte Methoden.....	56
3.2.5.	Chemisch-synthetische Methoden .....	58
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
4.1.	Die <i>Spinach</i> -RNA als FRET-Donor und FRET-Akzeptor .....	60
4.1.1.	Aufbau des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments .....	60
4.1.2.	Vorbereitungen für das RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment.....	62
4.1.3.	Das FRET-basierte RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment unter Verwendung von <i>Spinach</i> $\Delta$ 15 .....	67
4.2.	Fluoreszenzlöschung der <i>Spinach</i> -RNA vermittelt über eine RNA-Protein-Interaktion .....	72
4.2.1.	Aufbau der RNA-Protein-Interaktionsanalyse.....	72
4.2.2.	Vorbereitungen für die RNA-Protein-Interaktionsanalyse .....	73
4.2.3.	Fluoreszenzlöschung von <i>Spinach-pp7</i> über die PP7- <i>pp7</i> -Interaktion.....	81
4.3.	Genetisch kodierte System für <i>Spinach-pp7</i> Fluoreszenzlöschung ..	84
4.3.1.	Aufbau der genetisch kodierten RNA-Protein-Interaktionsuntersuchungsmethode.....	84
4.3.2.	Fluoreszenzlöschung von <i>Spinach-pp7</i> über die genetisch kodierte RNA-Protein-Untersuchungsmethode.....	87

4.3.3.	Fluoreszenzlöschung von exprimierter <i>Spinach-pp7</i> -RNA über eine genetisch kodierbare RNA-Protein-Interaktion .....	89
4.4.	Entwicklung eines Hochdurchsatzformats mit Hilfe der <i>Spinach</i> -RNA .....	90
4.4.1.	Optimierung des <i>High Throughput Screenings</i> .....	90
4.4.2.	<i>High Throughput Screening</i> der LOPAC <sup>1280</sup> .....	93
4.4.3.	Validierung des <i>High Throughput Screenings</i> .....	94
<b>5.</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>96</b>
5.1.	Die verschiedenen <i>Spinach</i> -RNA-Konstrukte .....	96
5.2.	Fluoreszenzlöschungseigenschaften der <i>Spinach</i> -RNA .....	101
5.3.	Etablierte Systeme zur Detektion und Analyse von RNA-Protein-Interaktionen.....	104
5.4.	Etablierung des <i>High Throughput Screenings</i> .....	110
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>115</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>127</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>128</b>
<b>11.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
11.1.	Sequenzen der verschiedenen <i>Spinach</i> -Konstrukte .....	129
11.2.	Charakterisierung der <i>Spinach-wt</i> RNA .....	130
11.3.	SDS-PAGE Analyse der gereinigten <i>mCherry</i> -Proteine .....	131
11.4.	Alignment von PP7-wt und PP7 $\Delta$ FG.....	132
11.5.	Fluoreszenzspektren von <i>Spinach-pp7</i> , JOE, RHO und Cy3 .....	132

11.6.	Bindungsstudien von <i>Spinach</i> $\Delta$ 15 mit JOE-, RHO- und Cy3- markierten DNA-Sonden .....	133
11.7.	Abstandsmessungen, REMSAs und Titrationsen von <i>Spinach-pp7</i> mit PP7-A22C-TF3 und PP7A62C-TF3 .....	134
11.8.	Messung der Akzeptorzunahme in Anwesenheit von <i>Spinach</i> $\Delta$ 15 bzw. <i>Spinach-pp7</i> .....	135
11.9.	Vektorkarten.....	137
11.9.1.	Vektorkarte von pGEX6p-2_ <i>mCherry</i> .....	137
11.9.2.	Vektorkarte von pGEX6p-2_PP7 $\Delta$ FG .....	138
11.9.3.	Vektorkarte von pGEX6p-2_PP7 $\Delta$ FG- <i>mCherry</i> .....	138
11.9.4.	Vektorkarte von pOPIN_ <i>mCherry</i> -PP7 $\Delta$ FG.....	139
11.9.5.	Vektorkarte von pUC19_ <i>Spinach-pp7</i> .....	139
11.9.6.	Vektorkarte von pUC19_ <i>Spinach-wt</i> .....	140
11.9.7.	Vektorkarte von pUC19_ <i>Spinach</i> $\Delta$ 15.....	140
11.9.8.	Vektorkarte von pET28_ <i>Spinach-pp7</i> .....	141

### III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
$\kappa^2$	Orientierung der Übergangsdipolmomente
[F]	Konzentration des Fluorophors
[F] <sub>0</sub>	Gesamtkonzentration des Fluorophors
[Q]	Konzentration des Quenchers
A	Akzeptor im Grundzustand
Å	Ångström
A*	Akzeptor im angeregten Zustand
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure
A-Stelle	Aminoacyl-Stelle im Ribosom
bp	Basenpaar
CCMB	Puffer zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen ( <i>chemical competent making buffer</i> )
CRISPR	Sich wiederholende Abschnitte auf der DNA vieler Bakterien und Archaeen zur Resistenz gegen fremdes Erbgut ( <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> )
crRNA	CRISPR RNA
Cy3	Cyanin3
D	Donor im Grundzustand
D*	Donor im angeregten Zustand
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DF	Durchfluss
DFHBI	( <i>Z</i> )-5-(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden)-2,3-Dimethyl-3,5-Dihydro-4 <i>H</i> -Imidazol-4-on
DFHBI-1T	( <i>Z</i> )-5-(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden)-2-Methyl-3-(2,2,2-Trifluorethyl)-3,5-Dihydro-4 <i>H</i> -Imidazol-4-on
DMHBI	( <i>Z</i> )-5-(4-Hydroxy-3,5-Dimethoxybenzyliden)-2,3-Dimethyl-3,5-

Abkürzung	Beschreibung
	Dihydro-4 <i>H</i> -Imidazol-4-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
E	FRET-Effizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	„ <i>enhanced</i> “ GFP
Elu	Elution
E-Stelle	Exit-Stelle im Ribosom
EtOH	Ethanol
F	Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers
F*	Fluorophor im angeregten Zustand
F <sub>0</sub>	Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Quenchers
F <sub>D</sub>	Fluoreszenz des Donors
FG	Bereich im PP7-Protein zwischen den beta-Strängen F und G (AS 67–75)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FQ	Fluorophor-Quencher Komplex im Grundzustand
FQ*	Fluorophor-Quencher Komplex im angeregten Zustand
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
FTO	<i>Fat mass and obesity associated Protein</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GYT	Medium, das Glycerol, Hefeextrakt ( <i>yeast extract</i> ) und Trypton enthält
h	<i>hour</i> (Stunde)
His <sub>6</sub>	Protein-tag (engl. <i>tag</i> = Markierung) bestehend aus sechs Histidinen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
J(λ)	Überlappungsintegral von Absorptionsspektrum des Akzeptors mit

Abkürzung	Beschreibung
	dem Emissionsspektrum des Donors
JOE	6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
$k_q$	bimolekulare Quenchingkonstante
$K_S$	Bindungskonstante
$K_{SV}$	Stern-Volmer-Konstante
$k_{trans}$	Transferrate
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien)
LexA	<i>lambda excision protein</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
LOPAC <sup>1280</sup>	<i>Library of Pharmacologically Active Compounds</i>
Ly	Lyse
<i>mCherry</i>	<i>monomeric Cherry</i>
MPa	Megapascal
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS2	MS2 Bakteriophage
n	Brechungsindex
n. b.	nicht bestimmt
nt	Nukleotide
NTPs	Nukleotidtriphosphate
OD	<i>Optical density</i>
PB	<i>Pacific Blue</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PP7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Phage 7-Hüllprotein
<i>pp7</i>	RNA innerhalb des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Phagen 7
P-Stelle	Peptidyl-Stelle im Ribosom
Q	Quencher
$Q_D$	Quantenausbeute des Donors
r	Radius
$r^*$	berechneter Abstand
$r^+$	mit der Software PyMOL bestimmter Abstand

Abkürzung	Beschreibung
R <sub>0</sub>	Försterabstand
RBP	RNA-bindendes Protein
REMSA	<i>RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
RHO	<i>Rhodamine Red</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RPI	RNA-Protein-Interaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
rRNA	ribosomale RNA
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
Sek.	Sekunde
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SOC	Super optimales Medium, welches zusätzlich Glucose enthält
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TB	<i>Terrific broth</i> (Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien)
TF3	Tide Fluor 3
t-Lys	tRNA von Lysin
TMR	TAMRA
U	Unit
ÜS	Überstand
V	Volt
vI	vor Induktion
W	Waschfraktion
WO	<i>washout</i>

Abkürzung	Beschreibung
$\gamma$	Zerfallsrate
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\varepsilon_A$	Extinktionskoeffizient des Akzeptors
$\Sigma k_i$	Summe aller Quenchingprozesse
$\tau$	Fluoreszenzlebenszeit in Anwesenheit des Quenchers
$\tau_0$	Fluoreszenzlebenszeit in Abwesenheit des Quenchers
$\Omega$	Ohm

Aminosäuren wurden mit dem Drei-Buchstabencode nach der *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)* abgekürzt. Die Nucleobasen wurden mit A (Adenin), C (Cytosin), T (Thymin), G (Guanin) und U (Uracil) abgekürzt.

## 1. Einleitung

In allen lebenden Organismen sind Ribonukleinsäure-Moleküle (RNA) essentiell für die verschiedenen Funktionen innerhalb jeder Zelle. Während der Transkription wird z.B. die sogenannte *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) synthetisiert, die zu den Ribosomen transportiert wird. Diese Proteinsynthese-Maschinerie besteht neben Proteinen zum großen Teil aus ribosomaler RNA (rRNA). Transfer-RNA Moleküle (tRNAs) laden die dem Triplet Code entsprechend korrekte Aminosäure in das Ribosom, indem die einzelnen Aminosäuren zu einer Polypeptidkette verknüpft werden.<sup>1</sup>

Die drei verschiedenen Typen von RNA, die alleine bei dem Vorgang der Proteinbiosynthese benötigt werden, zeigen deutlich, dass RNA Moleküle eine bedeutende Rolle in einer Zelle spielen. In den letzten Jahrzehnten wurde herausgefunden, dass RNA wesentlich mehr Rollen einnehmen kann, als in der Proteinbiosynthese zu wirken.<sup>2</sup> Wird eine RNA nicht wie die mRNA in Proteine übersetzt, so fällt sie in die Kategorie der nicht-kodierenden RNAs. Dabei werden RNAs, die kleiner als 200 nt sind als kleine, nicht-kodierende RNAs bezeichnet. Darunter fällt z. B. die *small nuclear* RNA (snRNA), die innerhalb des Zellkerns eukaryotischer Zellen gefunden werden kann. SnRNAs haben Einfluss auf die Genregulation, indem sie spezifisch prä-mRNA in mRNA splicen.<sup>3</sup> MicroRNAs regulieren ebenfalls die Gene. Sie haben eine Länge von ca. 22 bis 26 nt und können die Genexpression durch die Repression der Translation inhibieren, indem sie die jeweilige mRNA zum Abbau markieren.<sup>4</sup> Eine weitere Spezies von RNA sind die *small interfering* RNAs (siRNAs). Hierbei handelt es sich, mit einer Länge von 21 bis 25 nt, um eine weitere Klasse der kleinen RNAs, die die Genexpression inhibieren können. Ein Strang der siRNA bindet den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC). Der entstehende RNA-Protein-Komplex wird so aktiviert und die Transkription der RNA, die eine komplementäre Sequenz zu der inkorporierten RNA Sequenz besitzt, wird verhindert.<sup>5</sup> Ähnlich dazu agiert die *antisense-RNA*. Da mRNA von dem Matrizenstrang der DNA als einzelsträngige RNA transkribiert wird, kann durch die Entstehung des zur mRNA komplementären Stranges und die damit einhergehende Basenpaarung eine Genregulation erreicht werden.<sup>6</sup> Ein anderes Beispiel ist die *small nucleolar* RNA (snoRNA), die rRNA funktionalisieren kann. Dabei entstehen häufig methylierte oder pseudouridylierte Nukleoside, die für die Funktion des Ribosoms essentiell sind.<sup>7</sup>

Ist eine nicht-kodierende RNA länger als 200 nt, fällt sie in die Kategorie der langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNA, *long non coding RNA*). LncRNAs nehmen diverse Rollen

innerhalb der Zelle ein, wie in der transkriptionalen, post-transkriptionalen, translationalen und epigenetischen Regulation.<sup>8,9</sup> In Prokaryonten sind häufig *Riboswitches* anzufinden. Dabei handelt es sich um RNAs in den nicht-translatierten Regionen der mRNA, die Metaboliten wie z. B. Guanin, Adenin oder *L*-Lysin binden. Die Erkennung dieser erfolgt spezifisch durch Ladungen, funktionelle Gruppen und ebenfalls durch die Stereochemie des *Riboswitches*. Nach der Bindung des Metaboliten findet eine Konformationsänderung der RNA statt, woraufhin häufig eine Repression der Genexpression eingeleitet wird.<sup>10</sup> Mit Ausnahme der *Riboswitches* gehen all diese verschiedenen Arten von RNAs mit Proteinen Interaktionen ein.

## 1.1. RNA-Protein-Interaktionen

RNA-Protein-Komplexe bestehen aus einem oder mehreren RNA-Molekülen sowie mindestens einem RNA-bindendem Protein (RBP). Der entstehende Komplex wird allgemein Ribonukleoprotein (RNP) genannt. RNPs sind in allen Lebewesen zu finden und kommen im Zellkern und Zytoplasma vor. Sie haben in der Mehrheit der Zellprozesse essentielle Funktionen, wie die Koordination und Stabilisierung von Proteinkomplexen oder die Maturation, Translokation und Stabilisierung von RNA.<sup>11-13</sup>

Einer der bekanntesten Ribonukleinkomplexe ist das Ribosom, das für die Proteinbiosynthese in allen Lebensformen verantwortlich ist. Das prokaryotische Ribosom bspw. ist ein 2,5 MDa-Komplex, der neben Proteinen und Kofaktoren zu zwei Dritteln aus rRNA besteht.<sup>14</sup> Die enthaltene rRNA katalysiert die Bildung der Peptidbindung in der wachsenden Peptidkette. Zudem trägt sie zur Dekodierung der mRNA sowie zur Translokation der rRNA und mRNA nach der Katalyse bei. Das prokaryotische Ribosom (70 S) unterteilt sich in eine kleine (30 S) und eine große (50 S) Untereinheit. Beide Untereinheiten spielen eine Rolle in der korrekten Translokation, bei der alle Komponenten präzise ineinandergreifen, um ein Kodon nach dem anderen zu translatieren. Die Translation beginnt mit der Erkennung des mRNA Startkodons und der Bindung der initialen tRNA an die kleine ribosomale Untereinheit. Anschließend interagiert dieser Komplex mit der großen Untereinheit. Dadurch werden innerhalb des Ribosoms drei Bindestellen für die tRNA erzeugt.<sup>15</sup> Zunächst bindet die aminoacylierte tRNA in die A-Stelle (Aminoacyl-Stelle), sodass in der P-Stelle (Peptidyl-Stelle) die Polypeptidkette elongiert werden kann. Die E-Stelle (Exit) entlässt schließlich die deacylierte tRNA. Die mRNA sowie die Antikodon-tragende Haarnadelschleife der tRNA werden währenddessen von der kleinen Untereinheit gebunden, wodurch die Basenpaarung zwischen Kodon und Antikodon kontrolliert wird. Die große Untereinheit bindet den

Akzeptorarm der tRNA und katalysiert die Peptidbindung in der P-Stelle.<sup>16,17</sup> Das komplexe Zusammenspiel von RNA und Proteinen wird an diesem Beispiel besonders deutlich. Die Untersuchung von z. B. dem prokaryotischen Ribosom steht für die Entwicklung neuer Antibiotika im Fokus.<sup>18</sup>

Ein Ribonukleinkomplex, der in den letzten Jahren in der Biotechnologie häufig Verwendung gefunden hat, ist das CRISPR / Cas-System.<sup>19</sup> Bei den *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) handelt es sich um Abschnitte sich wiederholender DNA, die in vielen Bakterien und Archaeen als adaptives Immunsystem fungieren. Wird z. B. das Bakterium von einer fremden Nukleinsäure infiltriert und diese anschließend von den CRISPR erkannt, werden kurze RNA Moleküle (crRNA) transkribiert. Die crRNA, die komplementär zu einem Teil der fremden Nukleinsäure ist, bildet dann mit dem Cas9-Protein einen RNP-Komplex. Dieser erkennt die Fremdnukleinsäure und zerschneidet sie sequenzspezifisch.<sup>20,21</sup> Die Biotechnologie verwendet diese Sequenzspezifität, um Modifikationen in das Genom eines Organismus einzubringen oder ganze Genabschnitte zu deletieren. Somit besteht die Möglichkeit z. B. Einflüsse eines Proteins mit endogenem Expressionslevel zu untersuchen.<sup>22</sup>

RNA-Protein-Interaktionen (RPIs) kommen ebenfalls häufig in Viren, wie z. B. den Grippe-auslösenden Influenza-Viren, vor.<sup>23</sup> Fast alle Influenzafamilien haben gemeinsam, dass ein einzelsträngiges RNA-Genom für ein Glykoprotein, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und ein Nukleoprotein kodiert. Dabei sorgt das Glykoprotein für den Zugang zur Wirtszelle, die RNA-Polymerase repliziert und transkribiert das Virusgenom und das Nukleoprotein geht eine Bindung mit der einzelsträngigen RNA ein, um diese in eine kompakte Struktur zu bringen. Der RNP-Komplex spielt somit eine wichtige Rolle bei der viralen Transkriptionskontrolle. Besonders Influenza A Viren können einen schweren Krankheitsverlauf erzeugen. Bei dieser Virenart werden mit den sogenannten P-Proteinen (PB1, PB2 und PA) ebenfalls RNP-Komplexe mit der Virus-RNA ausgebildet, die als einzige für die effektive Transkription und Replikation des Virusgenoms nötig sind.<sup>24-26</sup>

Diese Beispiele zeigen, dass RNP-Komplexe eine wichtige Rolle im zellulären Kontext, in der Biotechnologie und in der Entstehung von Krankheiten spielen können.

### 1.1.1. Methoden zur Detektion und Analyse von RNA-Protein-Interaktionen

Die Analyse von RPIs kann *in vitro* mit einer Reihe von Methoden erfolgen. Eine häufig verwendete Methode ist der *RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay* (REMSA). Dabei wird das elektrophoretische Laufverhalten des RPI-Komplexes durch eine native Gelmatrix wie

z. B. Polyacrylamid oder Agarose detektiert. Für gewöhnlich zeigt der RPI-Komplex eine geringere Mobilität als die Einzelkomponenten RNA und Protein.<sup>27</sup> REMSAs werden meistens für qualitative Analysen von RPIs verwendet, können jedoch unter geeigneten Bedingungen ebenfalls zur quantitativen Bestimmung von Affinität, Kinetik und Stöchiometrie genutzt werden. Dabei ist die jeweilige quantitative Bestimmung stark abhängig von unter anderem dem verwendeten elektrophoretischen System, den Pufferkonditionen, dem pH-Wert, der Ionenstärke, der Temperatur, dem Molekulargewicht der Einzelkomponenten und der Gelmatrix.<sup>27-31</sup> Ist der Unterschied zwischen den Laufweiten des RPI-Komplexes und den Einzelkomponenten gering, besteht die Möglichkeit, einen Antikörper gegen das Protein einzusetzen, sodass ein sogenannter *Supershift* entsteht.<sup>32</sup>

Ein RNA *pull down* kann ebenfalls zur Verifizierung einer RPI dienen. Typischerweise wird die RNA hierbei chemisch mit einem Affinitätstag versehen, wie z. B. einer Biotinmodifizierung. Anschließend kann das spezifisch an die RNA bindende Protein aus einem Zelllysat über eine Streptavidinmatrix angereichert werden.<sup>33-35</sup>

Eine fluoreszenzbasierte Methode, um die Kolokalisation eines Proteins mit der RNA *in vivo* nachzuweisen, ist die *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH).<sup>36,37</sup> Bei FISH wird eine zu der RNA von Interesse komplementäre, fluoreszenzmarkierte Nukleotidsonde in die Zelle injiziert. Diese Sonde kann anschließend spezifisch an die RNA von Interesse hybridisieren, sodass diese fluoreszenzmarkiert ist. Das Protein von Interesse wurde zuvor innerhalb dieser Zelle mit einem fluoreszenzmarkierten Protein exprimiert, sodass eine Kolokalisation von RNA und Protein mikroskopisch detektiert werden kann.<sup>38-40</sup>

Der *RNaseH protection assay* wird dazu benutzt, um die Bindesequenz der RNA näher zu charakterisieren, die spezifisch z. B. mit einem Protein interagiert. Dabei wird sich zu nutze gemacht, dass die direkten Binderegionen von diesem Protein vor der RNaseH geschützt sind und somit nicht von dieser abgebaut werden können. Nach der Zugabe der RNaseH kann anschließend die Länge der Bindesequenz über Gelelektrophorese oder die RNA-Sequenz über RNA-Sequenzierung identifiziert werden.<sup>41-45</sup>

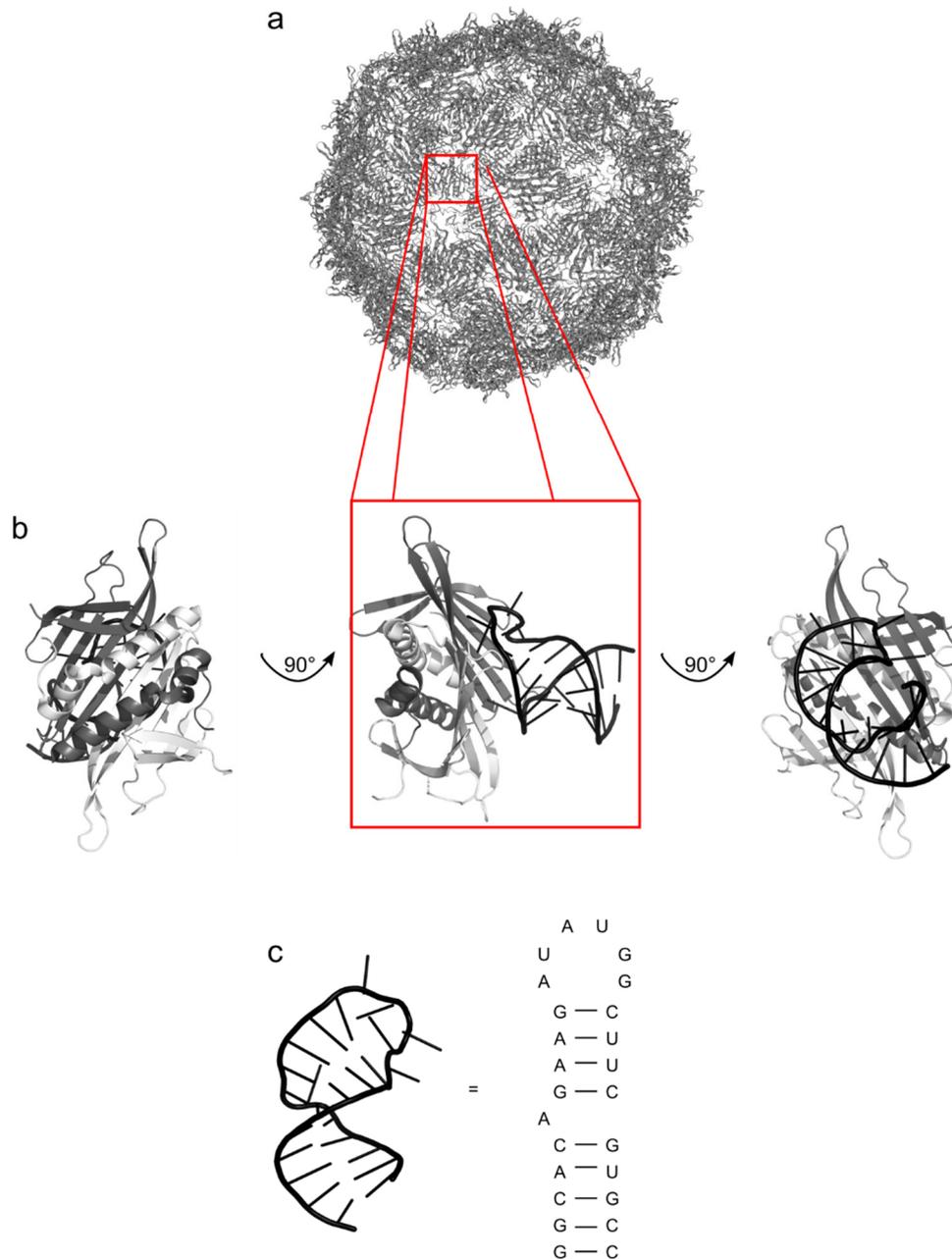
Zur Untersuchung von RPIs *in vivo* wird häufig das 1996 von Wickens *et al.* entwickelte Hefe-Drei-Hybrid-System verwendet.<sup>46</sup> Dabei wird sich eine schon bekannte RPI zu Nutze gemacht, wie z.B. die innerhalb des Bakteriophagen MS2 vorkommende MS2-Protein:*ms2*-RNA-Interaktion. Auf der einen Seite liegt das MS2-Protein als Fusion mit einer DNA-bindenden Domäne (z.B. *lambda excision protein*, LexA) vor. Diese bindet an den Promotor eines geeigneten Reportergens (z.B. *enhanced green fluorescent protein*, eGFP oder Galactose 4-Protein, Gal4). Auf der anderen Seite liegt die *ms2*-RNA fusioniert an die RNA

von Interesse vor. Durch eine Interaktion von der RNA von Interesse mit dem Protein von Interesse, welches als Fusionsprotein mit einer Aktivierungsdomäne vorliegt, wird das Reportergen transkribiert. In Folge dessen kann z. B. die grüne Fluoreszenz von eGFP ausgelesen werden.<sup>46-50</sup> Durch das komplexe Zusammenspiel an Interaktionen ist das Hefe-Drei-Hybrid-System fehleranfällig. So kann es z.B. zu einem falsch positiven Signal kommen, indem die Transkription des Reportergens durch frei vorliegende Aktivierungsdomänen und unspezifische Affinität zur DNA aktiviert wird.<sup>50</sup>

Eine weitere zellbasierte Methode ist *Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation* (PAR-CLIP), durch die in hoher Auflösung und transkriptomweit die Bindestellen der RNA an RBPs bestimmt werden können.<sup>51</sup> Dazu wird der Zelle 4-Thiouridin (4sU) zur Verfügung gestellt, die dieses modifizierte Nukleosid in die RNA einbaut. Das Protein von Interesse wird mit einem FLAG-Tag exprimiert und RNA und Protein anschließend durch UV-Crosslinking verknüpft. Der kovalent verknüpfte RNA-Protein-Komplex kann über Immunopräzipitation isoliert werden und die RNA wird teilweise durch eine RNase verdaut. Dabei schützt das Protein die direkte Bindestelle der RNA, die anschließend radiomarkiert wird. Danach wird das Protein ebenfalls verdaut und die cDNA der Bindestelle per PCR amplifiziert und sequenziert.<sup>51</sup> Durch diese Methode können alle RNA-Sequenzen, die spezifisch an das Protein von Interesse gebunden haben, identifiziert werden.

### 1.1.2. Die RNA-Protein-Interaktion des *Pseudomonas aeruginosa* Phagen 7

Der *Pseudomonas aeruginosa* Phage 7 wurde erstmals 1966 beschrieben und gehört der Familie der *Leviviridae* an.<sup>52</sup> Er ist gut untersucht und wird häufig als Modellsystem genutzt, um kompliziert aufgebaute Viren sowie RPIs zu studieren.<sup>53</sup> Dabei handelt es sich um einen Phagen mit positivem, einzelsträngigem RNA-Genom (3588 nt), das aus vier Genen besteht. Diese Gene kodieren die Replikase, Hüll- und Lyseproteine sowie ein Maturationsprotein.<sup>54</sup> Das *Pseudomonas aeruginosa* Phage 7-Kapsid besteht aus 180 Kopien des *Pseudomonas aeruginosa* Phage 7-Hüllproteins (PP7, Abbildung 1 a), welches als Dimer vorliegt. Zudem werden stabile Oligomere durch Disulfidbrücken zwischen dem Cys67 des einen Dimers und Cys72 des zweiten Dimers ausgebildet (Abbildung 1 b).



**Abbildung 1:** Aufbau der Interaktion zwischen PP7-Protein und *pp7*-RNA. (a) Dreidimensionale Struktur des Kapsids des *Pseudomonas Phagen 7* bestehend aus 90 Kopien des PP7-Proteindimers. (b) Dreidimensionale Struktur des PP7-Proteindimers (Monomere in grau und weiß) gebunden an die *pp7*-RNA-Haarnadelschleife (schwarz) in Front-, Seiten- und Hinteransicht. (c) Tertiär (links)-, Sekundär- und Primärstruktur (rechts) der *pp7*-RNA-Haarnadelschleife.

Beide Cysteine liegen dabei zwischen den  $\beta$ -Strängen F und G (*FG Loop*, Aminosäuren 67–75) des Proteinmonomers. Das Kapsid nimmt die Geometrie eines Ikosaeders an, die das Genom des Phagen umschließt. Das Hüllprotein ist 127 Aminosäuren lang und formt ein stabiles Dimer durch ineinandergreifende  $\alpha$ -Helices. Dadurch befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite eine  $\beta$ -Oberfläche, die spezifisch die *pp7*-RNA-Haarnadelstruktur (*pp7*) bindet (Abbildung 1 c).<sup>55</sup> Hierbei handelt es sich um einen Regulationsmechanismus, da die RNA-Sequenz zum Teil für die Replikase kodiert. Durch die

Bindung wird die Translation dieser reprimiert und im Zuge dessen wird die Replikation verhindert.<sup>53</sup> Die RNA-Haarnadelschleife bildet dabei eine A-Helix, dessen Konformation durch die Bindung an das PP7-Proteindimer stabilisiert wird. Die Bindetasche für die RNA wird von Arg54, Lys58, Val83, Ser85, Asp87 und Thr89 des PP7-Dimers gebildet, wobei jedes Protomer drei Reste beiträgt. Die *pp7*-RNA:PP7-Hüllprotein-Bindung wird größtenteils durch Wasserstoffbrücken ausgebildet, aber auch Van-der-Waals-Kontakte tragen zu einer nanomolaren Affinität bei. Für einige Studien wurde die übergeordnete Struktur eines Ikosaeders durch die Deletion des FG Bereichs unterbunden. Das daraus resultierende PP7 $\Delta$ FG Protein bildet dann weiterhin ein stabiles Dimer, das die *pp7*-RNA mit ebenso hoher Affinität bindet, allerdings ohne höher-oligomere Strukturen auszubilden. Dadurch bietet diese Interaktion eine gute Basis für die Entwicklung neuer Methoden zur Untersuchung von allgemeinen RPIs.<sup>55</sup>

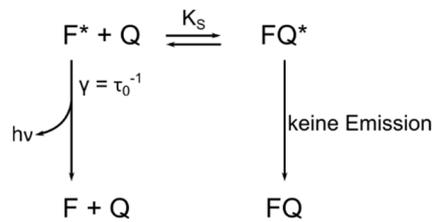
## 1.2. Mechanismen der Fluoreszenzlöschung

Die Fluoreszenzintensität eines Fluorophors kann durch viele Vorgänge vermindert werden. Diese Löschung der Fluoreszenz wird Quenching genannt und kann durch unterschiedliche Mechanismen stattfinden. Neben trivialen Prozessen, wie z. B. molekularer Umstrukturierung oder der Absorption durch Lösungsmittel, unterscheidet man die statische und dynamische Fluoreszenzlöschung.<sup>56</sup> Bei dem statischen Quenching bildet sich ein Komplex aus Fluorophor und Quencher, der nicht fluoreszierend ist. Es handelt sich hierbei um einen Vorgang, der unabhängig von Diffusion und molekularer Kollision ist. Dynamisches Quenching dagegen findet statt, wenn der angeregte Fluorophor durch Kontakt mit einem Quenchermolekül deaktiviert wird. Hierbei fällt der Fluorophor in den Grundzustand zurück, wenn er durch Diffusion mit einem Quencher kollidiert. Eine Sonderform des dynamischen Quenching ist der Förster-Resonanz-Energietransfer, bei dem ein angeregter Donorfluorophor seine Energie strahlungslos auf ein Akzeptormolekül überträgt, wenn bestimmte Voraussetzungen gegeben sind. Dadurch wird der Donorfluorophor ebenfalls gequenchet.<sup>57</sup> Die verschiedenen Quenchingmechanismen werden im Folgenden erläutert.

### 1.2.1. Statische Fluoreszenzlöschung

Ein angeregter Fluorophor fällt normalerweise mit der Zerfallsrate  $\gamma$ , die der inversen Lebenszeit des Fluorophors  $\tau_0$  entspricht, in den Grundzustand zurück. Die freigegebene Energie wird durch Fluoreszenz abgegeben. Quenching kann durch die Formation eines

Komplexes aus Fluorophor und Quencher stattfinden. Dieser Prozess wird statische Fluoreszenzlöschung genannt.<sup>58</sup> Im Falle der Anregung dieses Komplexes fällt dieser ohne ein Photon zu emittieren in den Grundzustand zurück (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung für statisches Quenching.<sup>57</sup> F\* = freier, angeregter Fluorophor, Q = Quencher, F = Fluorophor im Grundzustand, FQ\* = Fluorophor-Quencher Komplex im angeregten Zustand, FQ = Fluorophor-Quencher-Komplex im Grundzustand,  $h\nu$  = Energie,  $\gamma$  = Zerfallsrate,  $\tau_0$  = Fluoreszenzlebenszeit.

Dabei liegen der freie, angeregte Fluorophor F\* und Quencher Q im Gleichgewicht mit dem Komplex FQ\* vor. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Quencherkonzentration kann durch die Berücksichtigung der Bindungskonstante  $K_S$  aufgestellt werden.  $K_S$  ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz.

$$K_S = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad \text{Formel 1}$$

Dabei entsprechen [F] und [Q] den Konzentrationen des freien Fluorophors bzw. Quenchers und [FQ] der Konzentration des Fluorophor-Quencher-Komplexes. Unter der Annahme, dass der Komplex aus Fluorophor und Quencher nicht fluoreszierend ist, stimmt die Fluoreszenz mit der des freien Fluorophors überein. Die Gesamtkonzentration des Fluorophors  $[F]_0$  ist durch Formel 2 gegeben.<sup>57</sup>

$$[F]_0 = [F] + [FQ] \quad \text{Formel 2}$$

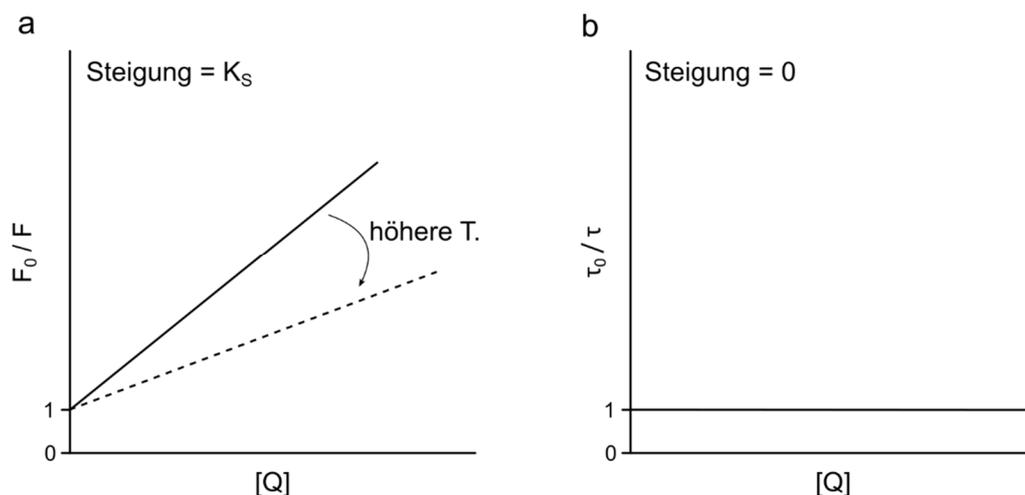
Durch die Zusammenführung von Formel 1 und Formel 2 ergibt sich für die Bindungskonstante  $K_S$  folgendes Verhältnis.

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad \text{Formel 3}$$

Anschließend können die Fluorophorkonzentrationen durch Fluoreszenzintensitäten ersetzt und eine Version der Stern-Volmer-Gleichung abgeleitet werden.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad \text{Formel 4}$$

Daraus ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von  $F_0/F$  und der Quencherkonzentration (Abbildung 3 a). Die statische Fluoreszenzlöschung besitzt mehrere spezifische Eigenschaften, die ebenfalls zur Unterscheidung der dynamischen Fluoreszenzlöschung verwendet werden können. So nimmt im Fall einer erhöhten Temperatur die statische Fluoreszenzlöschung ab, da die Assoziationskonstante ebenfalls abnimmt. Die Erhöhung der Temperatur hat zur Folge, dass der Fluorophor-Quencher-Komplex eine schwächere Bindung eingeht und freier Fluorophor und Quencher vorliegt (Abbildung 3 a). Daraus ergibt sich eine geringere Quencheffizienz  $F_0/F$ .<sup>57</sup>

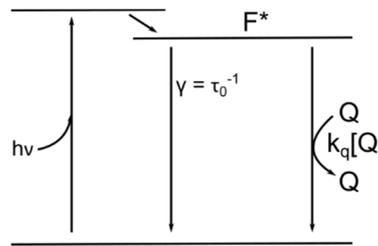


**Abbildung 3:** Abhängigkeit der Fluoreszenz und Fluoreszenzlebenszeit von der Quencherkonzentration bei dem statischen Quenching.<sup>57</sup> (a) Darstellung der linearen Zunahme von  $F_0/F$  mit steigender Quencherkonzentration  $[Q]$  im Fall der statischen Fluoreszenzlöschung. (b) Grafik zur Darstellung  $\tau_0/\tau = 1$  unabhängig von der Quencherkonzentration  $[Q]$ .

Da sich bei dem statischen Quenching die Fluoreszenz allein aus der freien Fluorophorpopulation ergibt, bezieht sich die Fluoreszenzlebenszeit ebenso nur auf diese Population. Daraus ergibt sich, dass sich die Fluoreszenzlebenszeit mit steigender Quencherkonzentration nicht ändert und somit das Verhältnis  $\tau_0/\tau$  bei 1 liegt (Abbildung 3 b). Außerdem führt die Bildung eines Fluorophor-Quencher-Komplexes häufig durch eine Änderung des Extinktionskoeffizienten zu einer Änderung des Absorptionsspektrums des Fluorophors.<sup>57</sup>

### 1.2.2. Dynamische Fluoreszenzlöschung

Die dynamische Fluoreszenzlöschung findet statt, wenn ein angeregter Fluorophor durch Kontakt mit einem Quencher-molekül deaktiviert wird. Der Fluorophor fällt dabei in den Grundzustand zurück, wenn ein Quencher durch Diffusion auf diesen trifft (Abbildung 4).<sup>59</sup>

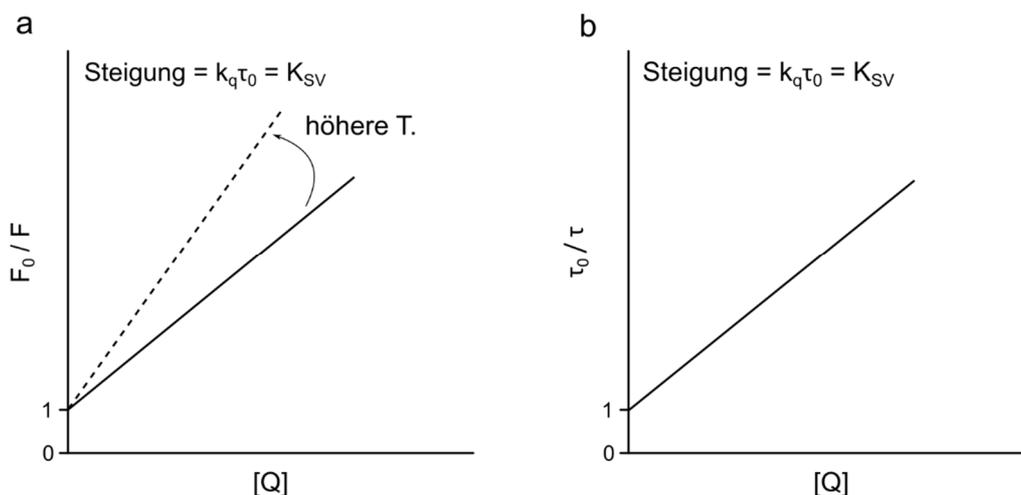


**Abbildung 4:** Jablonski-Diagramm der dynamischen Fluoreszenzlöschung.<sup>56</sup> F\* = Fluorophor im angeregten Zustand, Q = Quencher, [Q] = Konzentration des Quenchers  $k_q$  = bimolekulare Quenchingkonstante,  $h\nu$  = Energie,  $\gamma$  = Zerfallsrate,  $\tau_0$  = Fluoreszenzlebenszeit.

Bei diesem Prozess werden beide Moleküle nicht verändert. Die dynamische Fluoreszenzlöschung wird durch die klassische Stern-Volmer-Gleichung beschrieben (Formel 5).<sup>60</sup>

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Formel 5}$$

Dabei beschreibt  $K_{SV}$  die Stern-Volmer-Konstante,  $F_0$  die Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abwesenheit des Quenchers,  $F$  die in Anwesenheit des Quenchers,  $k_q$  die bimolekulare Quenchingkonstante,  $\tau_0$  die Lebenszeit des Fluorophors in Abwesenheit des Quenchers und  $[Q]$  die Konzentration des Quenchemoleküls. Die Stern-Volmer-Konstante  $K_{SV}$  definiert die Sensitivität des Fluorophors gegenüber dem Quencher. Ist bekannt, dass es sich bei dem vorliegenden Fluoreszenzlöschungsmechanismus um einen rein dynamischen Prozess handelt, dann entspricht die Stern-Volmer-Konstante  $K_{SV}$  der  $K_D$ . Dabei entspricht die  $K_D$  der Steigung im Stern-Volmer-Plot bei dem  $F_0/F$  gegen die Quencherkonzentration  $[Q]$  aufgetragen ist (Abbildung 5).<sup>57</sup>



**Abbildung 5:** Stern-Volmer-Plots des dynamischen Quenchings.<sup>57</sup> (a)  $F_0/F$  zeigt eine lineare Abhängigkeit der Quencherkonzentration  $[Q]$ . Die Steigung der Geraden entspricht der Stern-Volmer Konstanten  $K_{SV}$  und im Falle des rein dynamischen Quenchings der Dissoziationskonstanten  $K_D$ . (b)  $\tau_0/\tau$  ist im selben Maße von der Quencherkonzentration abhängig wie  $F_0/F$ .

Ein linearer Verlauf des Stern-Volmer-Plots ist ein klarer Hinweis, dass es sich bei dem vorliegenden Prozess um einen einzigen Quenchingprozess handelt und nicht um eine Mischung aus statischem und dynamischem Quenching. Dabei gibt die Linearität jedoch keinen Aufschluss darauf, ob es sich um statische oder dynamische Fluoreszenzlöschung handelt. Eine Unterscheidung zwischen beiden Mechanismen kann durch mehrere spezifische Eigenschaften derer vorgenommen werden. So können z. B. die Fluoreszenzlebenszeiten des Fluorophors unter den verschiedenen Mechanismen betrachtet werden. Die Fluoreszenzlebenszeiten des Fluorophors bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung in Ab- und Anwesenheit des Quenchers sind durch folgende Formeln gegeben.<sup>56</sup>

$$\tau_0 = \gamma^{-1} \quad \text{Formel 6}$$

$$\tau = (\gamma + k_q [Q])^{-1} \quad \text{Formel 7}$$

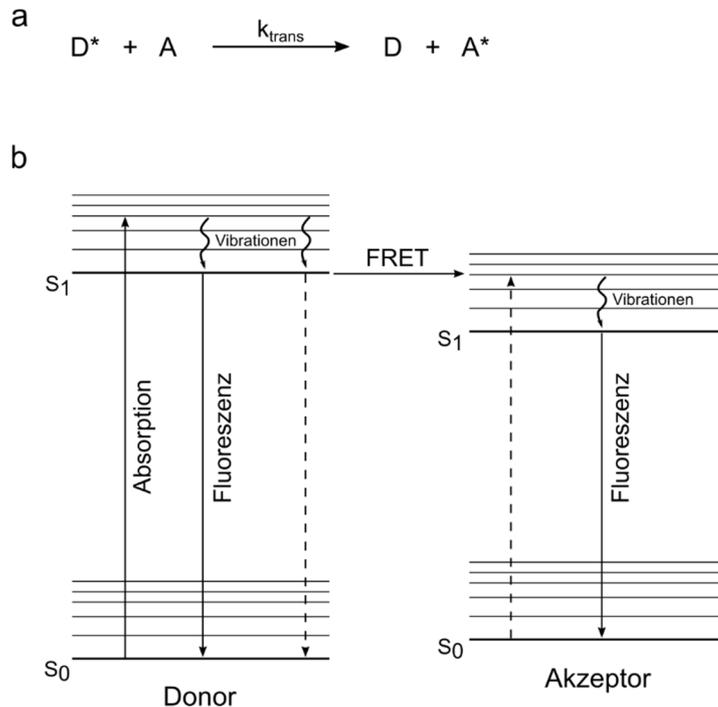
Da sich aus dem Verhältnis von  $\tau_0/\tau$  ebenfalls die Stern-Volmer-Gleichung ergibt (Formel 5), resultiert daraus eine spezifische Eigenschaft für das dynamische Quenching (Formel 8).

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad \text{Formel 8}$$

Während sich die Fluoreszenzlebenszeit bei der statischen Fluoreszenzlöschung nicht ändert, steigt diese bei dem dynamischen Mechanismus mit erhöhter Quencherkonzentration im selben Maße wie die Fluoreszenz (Abbildung 5, Formel 8). Ebenfalls steigt das Maß der Löschung mit erhöhten Temperaturen, wobei bei dem statischen Quenching der gegenteilige Effekt eintritt. Da das dynamische Quenching abhängig von der Diffusion ist und diese mit erhöhten Temperaturen ansteigt, kommt es statistisch gesehen häufiger zu Kollisionen von Fluorophor und Quencher.<sup>57</sup>

### 1.2.3. Förster-Resonanz-Energietransfer

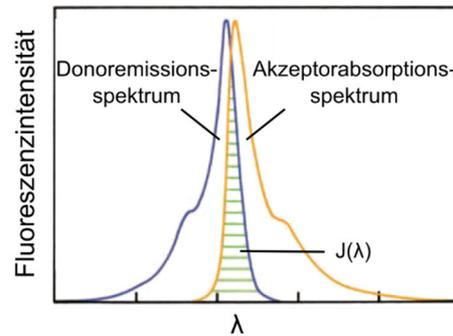
Der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist ein elektrodynamischer Prozess, der 1948 von Theodor Förster entdeckt und näher untersucht wurde.<sup>61-64</sup> Die Energie eines angeregten Donorfluorophors wird bei diesem Mechanismus strahlungslos auf ein Akzeptormolekül übertragen (Abbildung 6).<sup>56</sup>



**Abbildung 6:** Schema zum Förster-Resonanz-Energietransfer.<sup>56,57</sup> (a) Darstellung des allgemeinen Prinzips des Förster-Resonanz-Energietransfers.  $D^*$  = Donor im angeregten Zustand,  $A$  = Akzeptor im Grundzustand,  $k_{\text{trans}}$  = Transferrate,  $D$  = Donor im Grundzustand,  $A^*$  = Akzeptor im angeregten Zustand. (b) Jablonski-Diagramm zur Darstellung des Förster-Resonanz-Energietransfers.  $S_0$  = Grundzustand des Donors / Akzeptors,  $S_1$  = angeregter Zustand des Donors / Akzeptors. Die gestrichelten Pfeile indizieren den Energietransfer basierend auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen.

Es ist zu beachten, dass bei dem Prozess kein Photon reabsorbiert wird.<sup>56</sup> Der Energietransfer basiert auf dem Konzept des Fluorophors als oszillierender Dipol. Dieser kann Energie mit einem nahegelegenen Dipol mit ähnlicher Resonanzfrequenz austauschen. Dabei ist im Unterschied zu statischem und dynamischem Quenching kein Kontakt von Donor und Akzeptor nötig, sondern die Energieübertragung findet über Dipol-Dipol-Interaktionen statt. Dabei handelt es sich um einen Singulett-Singulett-Spintransfer, bei dem die quantenmechanischen Eigenschaften des Spins von Donor und Akzeptor erhalten bleiben. Relaxationen, wie z. B. Vibrationen führen zu einem Energieverlust in angeregten sowie in höhergelegenen Grundzuständen (Abbildung 6). Durch eine schwache Kopplung von Donor und Akzeptor kann dieser Mechanismus über einen Abstand von bis zu ca. 10 nm stattfinden. Dafür muss die Konzentration des Akzeptors ausreichend sein, damit der mittlere Abstand

zwischen dem angeregten Donor und dem Akzeptor 10 nm nicht überschreitet. Eine weitere Voraussetzung für FRET ist, dass das Donoremissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Darstellung der Überlappung ( $J(\lambda)$ ) des Donorfluoreszenz- und Akzeptorabsorptionsspektrums. Abbildung modifiziert aus Lakowicz *et al.*<sup>56</sup>

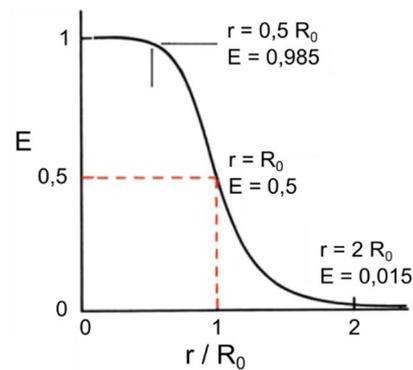
Dabei ist der Akzeptor gegenüber dem Donor in den meisten Fällen rotverschoben. Das Überlappungsintegral berechnet sich wie folgt.

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) d\lambda} \quad \text{Formel 9}$$

Die Rate des Energietransfers ist, neben dem Abstand beider Fluorophore voneinander und dem Grad der Überlappung von Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrum, abhängig von der Quantenausbeute des Donors und den Orientierungen der Übergangsdipolmomente beider Fluorophore zueinander. Die Energietransferrate  $k_T(r)$  ist zur sechsten Potenz abhängig von der Distanz von Akzeptor und Donor und definiert durch Formel 10.

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Formel 10}$$

Dabei beschreibt  $\tau_D$  die Fluoreszenzlebenszeit des Donors,  $R_0$  den Förster-Abstand und  $r$  den mittleren Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Der Förster-Abstand ( $R_0$ ) ist der Abstand zwischen Akzeptor und Donormolekül zueinander, bei dem die Transferrate 50 % beträgt (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Abhängigkeit der FRET-Effizienz ( $E$ ) von dem Abstand beider Fluorophore ( $r$ ) zueinander.<sup>56</sup> Der Abstand, an dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt, wird als Förster-Abstand ( $R_0$ ) bezeichnet. FRET kann normalerweise bis zu einem Abstand von  $2R_0$  detektiert werden.

$R_0$  beträgt typischerweise 20–60 Å und lässt sich mit Formel 11 berechnen.

$$R_0 = 0,211 (\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad \text{Formel 11}$$

Dabei beschreibt  $\kappa^2$  die Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander.  $\kappa^2$  kann Werte von 0–4 annehmen, wobei 0 eine senkrechte Anordnung beider Dipole, 1 Parallelität und 4 eine kollineare Anordnung bedeutet. Die Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor haben in der Regel unterschiedliche Orientierungen, weshalb  $\kappa^2$  zur Vereinfachung in Lösung 2/3 gesetzt wird. Der Brechungsindex des Mediums, in dem die Messung stattfindet, wurde mit  $n$  abgekürzt und  $Q_D$  ist die Quantenausbeute des Donors.  $R_0$  ist wiederum abhängig von dem Grad der Überlappung  $J(\lambda)$  (Formel 9) von Donorfluoreszenz- und Akzeptorabsorptionsspektrum.

Sind die Bedingungen für FRET gegeben, findet der Prozess für gewöhnlich auch statt. In der Biologie wird dieser elektrodynamische Effekt häufig genutzt, um Bindungsstudien durchzuführen. Dabei sind beide Interaktionspartner mit einem Fluorophor markiert, die zusammen ein FRET-Paar ergeben.<sup>56</sup> Findet eine Interaktion zwischen den fluoreszenzmarkierten Biomolekülen von Interesse statt, kann FRET detektiert werden. Die Messgröße kann, neben Fluoreszenzlebenszeiten des Donors und der Akzeptorintensität, die Donorfluoreszenz sein (Formel 12).

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Formel 12}$$

Zur Bestimmung der FRET-Effizienz  $E$  wird dabei die Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit ( $F_D$ ) und Anwesenheit ( $F_{DA}$ ) des Akzeptors gemessen. Die oben beschriebene,

starke Distanzabhängigkeit (Formel 12) kann zudem zu Abstandsmessungen von Donor und Akzeptor verwendet werden, wenn  $R_0$  bekannt ist. Der mittlere Abstand liegt zumeist zwischen 2,5–5,5 nm. Im Allgemeinen ist es praktikabel, Abstände von Fluorophoren via FRET zu messen, wenn der Abstand der Fluorophore zwischen  $0,5 R_0$ – $2 R_0$  liegt (Abbildung 8). Aufgrund der Abschätzung der Orientierung der Dipolübergangsmomente  $\kappa^2$  werden hierbei jedoch meist keine exakten Werte ermittelt und die Abstandsmessungen sind nur qualitativ zu betrachten. Insgesamt ist FRET ein in der Biologie häufig genutztes Werkzeug und viele Interaktionsstudien wurden mit Hilfe dieses Systems untersucht.<sup>56</sup>

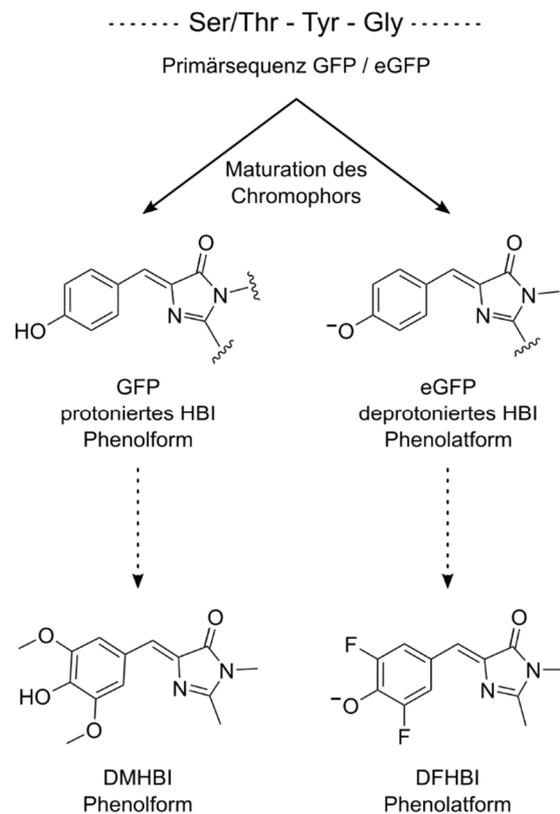
### 1.3. Die *Spinach*-RNA

Die *Spinach*-RNA wurde 2011 von Paige *et al.* entwickelt.<sup>65</sup> Dabei handelt sich, um ein RNA-Aptamer, das spezifisch das organische Molekül (*Z*)-5-(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden)-2,3-Dimethyl-3,5-Dihydro-4*H*-Imidazol-4-on (DFHBI) bindet und im Zuge dessen die Fluoreszenz dieses Chromophors erhöht. Dabei sind weder das RNA-Aptamer noch das Chromophor fluoreszierend, sondern erst die Bindung bedingt die Fluoreszenz. Zudem ist die Fluoreszenzentwicklung bioorthogonal, was bedeutet, dass DFHBI keine zellulären Komponenten unter Bildung von Hintergrundfluoreszenz bindet. Da das Chromophor ebenfalls zellgängig ist, kann *Spinach*-DFHBI als genetisch kodierbarer Fluoreszenzmarker für RNA-Moleküle von Interesse dienen.

#### 1.3.1. Entwicklung und Eigenschaften des *Spinach*-DFHBI-Komplexes

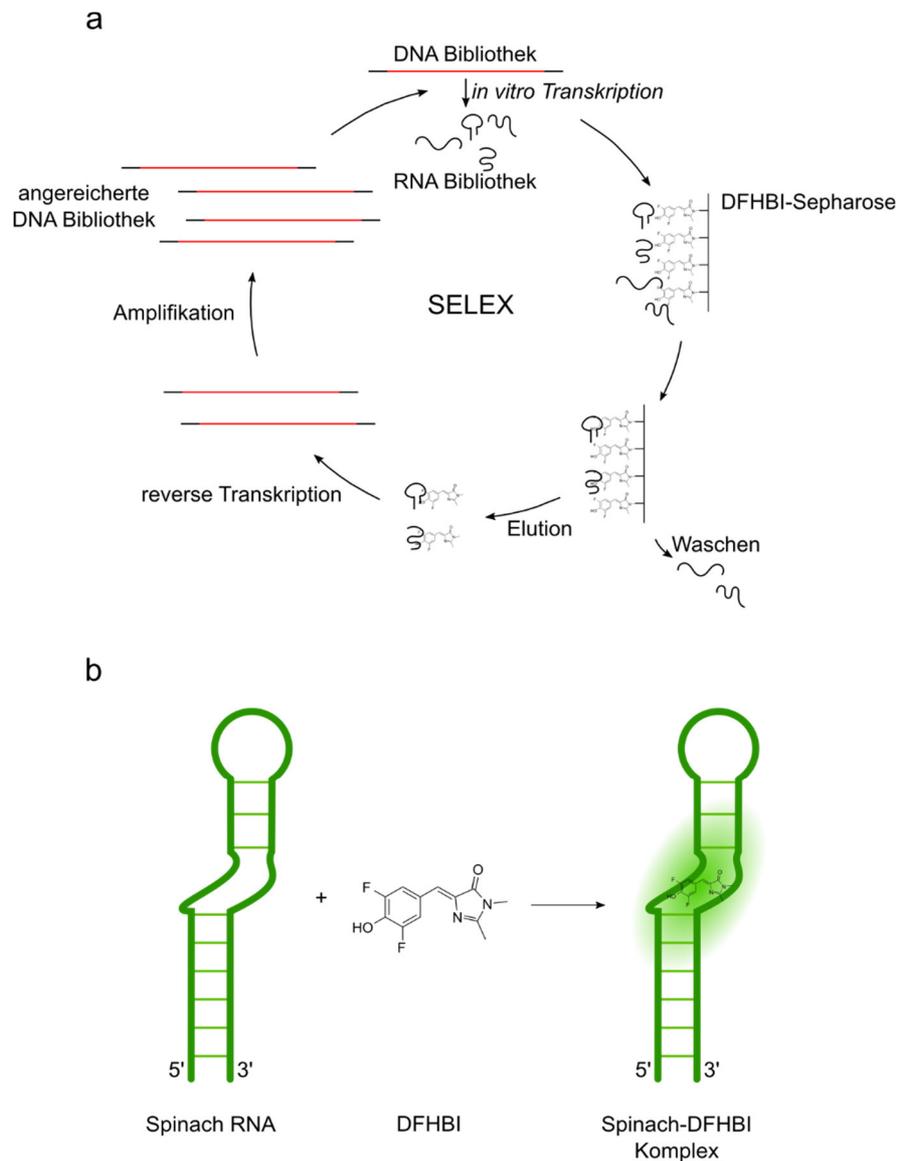
Die Intention von Paige *et al.* war es, einen einfachen Ansatz für die fluoreszente Markierung von RNA-Molekülen zu entwickeln.<sup>65</sup> Analog zu dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), mit dem in gängiger Weise Proteine fluoreszent markiert werden können, sollte die RNA von Interesse mit dem Fluorophor exprimiert werden können. GFP weist im Gegensatz zu allen bekannten RNA-Molekülen eine intrinsische Fluoreszenz auf.<sup>66</sup> Durch eine intramolekulare Zyklisierung der Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67 und anschließender Oxidation wird das Chromophor 4-Hydroxybenzyliden-Imidazolidon (HBI) gebildet. Die Oxidation resultiert in einem  $\Pi$ -Elektronensystem, das verantwortlich für die intrinsische Fluoreszenz des korrekt gefalteten Proteins ist.<sup>67,68</sup> Nach Anregung eines Moleküls kann dieses über radiative Prozesse, wie z. B. Fluoreszenz oder durch nicht-radiative Prozesse, wie z. B. Vibrationen oder intramolekulare Bewegungen in den Grundzustand zurückfallen. Darum spielt die nahe Umgebung des Chromophors HBI eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Fluoreszenz.

Nur in dem gefalteten GFP fällt das angeregte, durch die Umgebung fixierte Chromophor mit der Ausstrahlung von Fluoreszenz in den Grundzustand.<sup>69</sup> Innerhalb des ungefalteten Proteins wird das Chromophor zwar ebenfalls ausgebildet, aber der Grundzustand wird durch eine *cis-trans*-Isomerisierung erreicht, sodass das Protein nicht fluoreszierend ist. Im gefalteten Protein wird durch die Proteinumgebung die benötigte Rigidität erzeugt, die eine solche Isomerisierung verhindert.<sup>70</sup> Dieser Prozess wird bedingte Fluoreszenz genannt, da bestimmte Bedingungen für die Entwicklung der Fluoreszenz gegeben sein müssen. Ein weiteres Merkmal von GFP ist, dass ein Teil der Chromophor-Moleküle innerhalb von GFP protoniert, in der Phenolform und der verbleibende Teil deprotoniert, in der Phenolatform, vorliegt. Diese unterschiedlichen Protonierungszustände haben verschiedene Absorptionsspektren. GFP, indem das Chromophor protoniert ist, hat ein Absorptionsmaximum von 395 nm und das deprotonierte Chromophor erzeugt ein Absorptionsmaximum von 470 nm. Allein die Phenolat-Form des Chromophors ist für die entstehende Fluoreszenz bei einem Emissionsmaximum von 509 nm verantwortlich. Die Hydroxyl-Form emittiert dagegen kein Licht, sondern lagert sich in die Phenolat-Form um. Die Fluoreszenzausbeute wurde erhöht, indem Mutanten von GFP generiert wurden, in denen das Phenolat des Tyr66 bevorzugt vorliegt. Durch Mutation von F64L und S65T wurde so die verbesserte Form „*enhanced*“ GFP (eGFP) entwickelt.<sup>71</sup> Das fluoreszente Protein eGFP besitzt allein das Absorptionsmaximum von 470 nm und somit liegt HBI nur als Anion vor (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Die Primärsequenz des grün fluoreszierenden Proteins GFP und seiner verbesserten Form eGFP, sowie die durch Maturation der Proteine entstehenden Chromophore.<sup>72</sup> In Anlehnung an diese Chromophore wurden synthetisch DMHBI und DFHBI synthetisiert und in dem SELEX-Verfahren zur Selektion von RNA-Aptameren verwendet.

Das Konzept der bedingten Fluoreszenz wollten Paige *et al.* auf ein RNA-Molekül anwenden. Da RNA jedoch die Möglichkeit zur intrinsischen Fluoreszenzentwicklung fehlt, sollte dafür eine bestimmte RNA-Sequenz ein nicht fluoreszierendes, organisches Molekül ähnlich dem von HBI binden. So sollte erst durch die RNA-Umgebung die für die Fluoreszenz benötigte Rigidität erzeugt werden.<sup>65,72</sup> Dazu wurden verschiedene organische Moleküle synthetisiert, die genau wie freies HBI, nicht fluoreszierend sind. Angelehnt an HBI in GFP wurde (*Z*)-5-(4-Hydroxy-3,5-Dimethoxybenzyliden)-2,3-Dimethyl-3,5-Dihydro-4*H*-Imidazol-4-on (DMHBI) und angelehnt an eGFP das Chromophor DFHBI synthetisiert. Dabei liegt DMHBI überwiegend als Phenol und DFHBI überwiegend als Phenolat vor. Als nächster Schritt wurden RNA-Sequenzen, die spezifisch die synthetisierten Moleküle binden, über *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) selektiert (Abbildung 10 a).



**Abbildung 10:** Die Entwicklung des *Spinach*-DFHBI-Komplexes. (a) Der SELEX-Zyklus zur Selektion von RNA-Aptameren, die spezifisch das kleine, organische Molekül DFHBI binden. (b) Generelles Prinzip der Fluoreszenzentwicklung des *Spinach*-DFHBI-Komplexes.

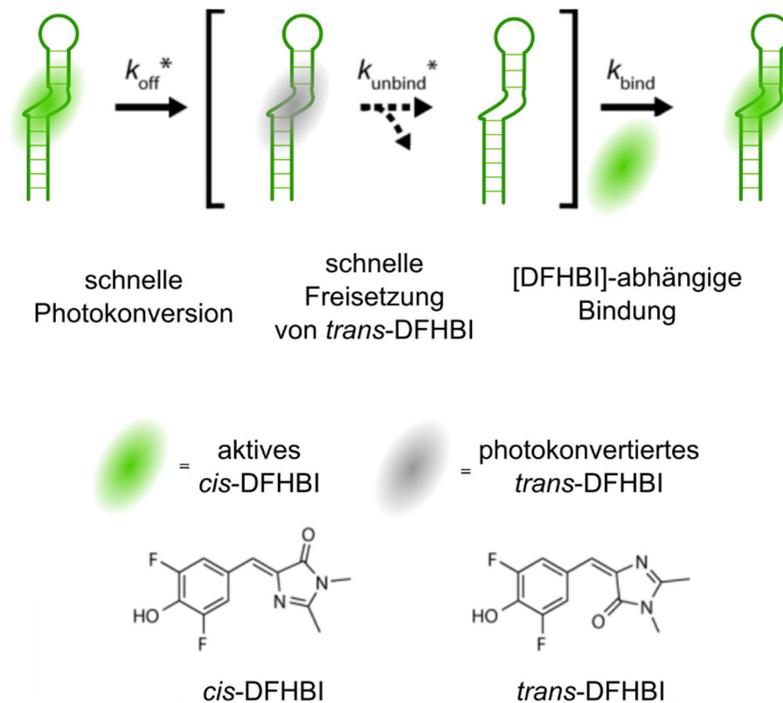
Dazu wurde eine DNA-Bibliothek der Größe  $\sim 5 \times 10^{13}$  *in vitro* in RNA transkribiert und zu einer Sepharose-Matrix gegeben, an der das Chromophor (z. B. DFHBI) immobilisiert wurde. Anschließend wurden alle nicht bindenden Aptamere durch Waschen entfernt und die bindenden Aptamere mit einem Überschuss an freiem Chromophor eluiert. Die verbleibenden RNA-Sequenzen wurden in DNA transkribiert, um eine Amplifizierung durch PCR zu ermöglichen. Die angereicherte DNA-Bibliothek steht anschließend für den folgenden SELEX-Zyklus zur Verfügung.<sup>73,74</sup>

Durch dieses Anreicherungsverfahren wurde aus der RNA-Bibliothek über mehrere Zyklen hinweg ein RNA-Aptamer selektiert, das sowohl DMHBI, als auch DFHBI bindet. Dabei wurde festgestellt, dass der jeweilige entstehende Komplex fluoreszente Eigenschaften

aufweist. RNA-Aptamer und das Chromophor sind im ungebundenen Zustand nicht-fluoreszent (Abbildung 10 b) und erst nach Komplexbildung wird die Rigidität des Chromophors in der Weise erhöht, dass Fluoreszenz bevorzugt wird. Aufgrund der Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich wurde das RNA-Aptamer *Spinach* genannt. Dabei zeigt *Spinach* im Komplex mit DFHBI, auf Grund des alleinigen Vorliegens in der Phenolatform (Abbildung 9) bei einem pH-Wert  $> 6$ , eine höhere Quantenausbeute und Helligkeit als der *Spinach*-DMHBI Komplex. *Spinach* bindet an DFHBI mit einer Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 537 nM, die Quantenausbeute des Komplexes liegt bei 0,72 und der Extinktionskoeffizient beträgt  $24271 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Die Helligkeit des fluoreszenten Komplexes liegt im Vergleich zu GFP bei 80 % und im Vergleich zu eGFP bei 53 %. Das Anregungsmaximum beträgt 469 nm und das Emissionsmaximum 501 nm.<sup>75</sup>

Im Gegensatz zu eGFP zeigt der *Spinach*-DFHBI-Komplex nach Anregung mit einem blauen Laser einen sehr schnellen Abfall der Fluoreszenz innerhalb von 2 Sekunden auf unter 5 % der initialen Fluoreszenz.<sup>76</sup> Jedoch findet eine Rückbildung der Fluoreszenz nach Abschalten des Lasers innerhalb von wenigen Sekunden bis auf 85–95 % statt. Der Verlust der Fluoreszenz findet demnach nicht durch irreversibles *Photobleaching* statt, sondern durch eine reversible Konversion. Bindet *Spinach*-DFHBI in Abwesenheit von Licht, besteht der Komplex für  $> 40$  Sekunden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Fluoreszenzrückbildung hauptsächlich durch eine bimolekulare Interaktion zwischen *Spinach* und DFHBI stattfindet, anstatt durch eine Photokonversion des gesamten Komplexes.

Nach dem heutigen Wissensstand wird davon ausgegangen, dass nachdem *Spinach*-DFHBI angeregt wurde, DFHBI mit einer hohen kinetischen Rate ( $k_{\text{off}}$ ) photoisomerisiert (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Möglicher Mechanismus der Photokonversion durch Lasereinstrahlung.<sup>76</sup> Es kommt zum Quenching des *Spinach*-DFHBI-Komplexes durch Photoisomerisierung von *cis*-DFHBI in die *trans*-Stellung. Dadurch kann es zu einer schnellen Bindung eines neuen *cis*-DFHBI-Moleküls kommen und das Quenching wird rückgängig gemacht. [DFHBI] = Konzentration von DFHBI.

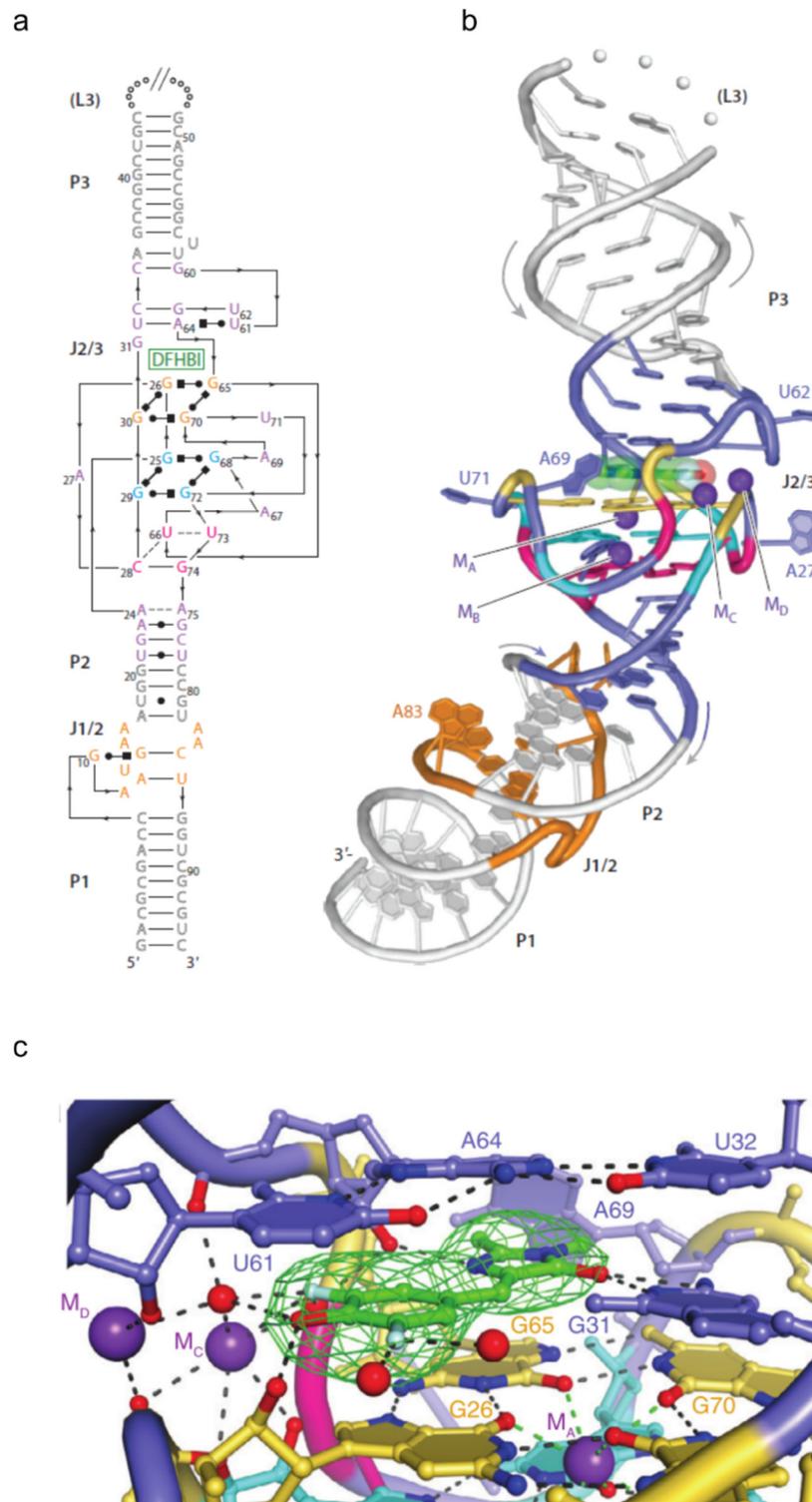
Es ist möglich, dass der photoisomeronisierte Komplex bereits vor der Freisetzung von DFHBI komplett gequenchet vorliegt. Die Photoisomerisierung führt zu einer schnelleren Freisetzung von DFHBI im Vergleich zu nicht angeregtem Komplex. Gründe für die schnellere Freisetzung kann zum einen eine Erniedrigung der Affinität von photoisomeronisiertem *trans*-DFHBI im Vergleich zu *cis*-DFHBI zu *Spinach* sein. Zum anderen kann das *Spinach*-Aptamer seine Konformation so ändern, dass photoisomeronisiertes DFHBI weitaus schwächer gebunden wird. Eine schnelle Dissoziation von photoisomeronisiertem DFHBI ermöglicht dann die Bindung eines *cis*-DFHBI-Moleküls und die Fluoreszenz wieder herstellt.<sup>76</sup>

Nach der näheren Untersuchung des *Spinach*-DFHBI-Komplexes wurden darauf aufbauend *Spinach*-Chromophor Versionen mit veränderten Eigenschaften entwickelt, wie z. B. mit verschobenen Anregungs- und Emissionsmaxima, erhöhter Thermostabilität oder einer verbesserten Fluoreszenz innerhalb von Zellen.<sup>77-79</sup> Es wurde das Chromophor (*Z*)-5-(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden)-2-Methyl-3-(2,2,2-Trifluorethyl)-3,5-Dihydro-4*H*-Imidazol-4-on (DFHBI-1T) entwickelt, dass im Vergleich zu DFHBI eine Trifluorogruppe anstelle einer Methylgruppe besitzt. Durch den verstärkten -I-Effekt wurde die Fluoreszenz im Komplex mit *Spinach* erhöht und die Emissionswellenlänge leicht rotverschoben, sodass sie ähnlich zu der von eGFP sind. Dadurch stimmte die Emissionswellenlänge mit denen von häufig verbauten Filtersetzen in Spektrometern überein.<sup>77</sup> Zur Erhöhung der Stabilität von

*Spinach*, wurde *Spinach2* mit Hilfe von rationalem Design entwickelt. Dazu wurden nicht-paarende Basen und Ausstülpungen in der ursprünglichen *Spinach*-RNA abgeändert. Zudem wurden mehrere Positionen identifiziert und mutiert, sodass das resultierende *Spinach2*-Aptamer im Komplex mit DFHBI zu  $58 \pm 4.8 \%$  bei  $25^\circ\text{C}$  und zu  $37 \pm 3.3 \%$  bei  $37^\circ\text{C}$  gefaltet vorliegt. Dabei zeigten *Spinach* und *Spinach2* im Komplex mit DFHBI nahezu gleiche photochemische Eigenschaften.<sup>79</sup> Mit einem ähnlichen Vorgehen wurde *iSpinach* für *in vitro* Anwendungen entwickelt. Durch zufällige Mutation mit anschließendem rationalem Design wurde *Spinach* so abgeändert, dass es weniger abhängig von Salzkonzentrationen ist.<sup>80</sup> Für die Anwendung in prokaryotischen Zellen wurde ein Aptamer-Chromophor-Komplexes durch ein SELEX-Verfahren mit anschließendem *Fluorescence Assisted Cell Sorting* (FACS) entwickelt. Direkt anschließend an das SELEX-Verfahren wurde die RNA in *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen exprimiert und diese nach Helligkeit der Fluoreszenz durch FACS sortiert.<sup>81</sup> Das daraus resultierende Aptamer, welches ebenfalls einen Komplex mit DFHBI bildet, wurde *Broccoli* genannt und erfüllt die Anforderungen für eine Anwendung innerhalb von *E. coli* Zellen.<sup>78</sup>

### 1.3.2. Die Struktur des *Spinach*-DFHBI-Komplexes

Die Kristallstruktur des *Spinach*-DFHBI-Komplexes wurde 2014 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen gelöst.<sup>72,82</sup> Im Rahmen der Strukturaufklärung wurde gezeigt, dass sich die *Spinach*-RNA in eine koaxiale Helix faltet. Die einzelnen Abschnitte von *Spinach* lassen sich auf Grund ihrer Sekundärstruktursegmente in die Stämme P1, P2 und P3, sowie der Haarnadelschleife L3 unterteilen, die von den verzweigten Regionen J1/2 und J2/3 unterbrochen sind. (Abbildung 12 a und b). Die J2/3-Verzweigung faltet dabei in einen besonderen G-Quadruplex, der das kleine Molekül DFHBI binden kann.



**Abbildung 12:** Die Kristallstruktur des *Spinach*-DFHBI-Komplexes. (a) Primär- und Sekundärstruktur des *Spinach*-DFHBI-Komplexes. Die Stämme P1, P2 und P3 werden durch Basenpaarung ausgebildet. Diese werden von den zwei irregulären Verzweigungen J1/2 (orange) und J2/3 (violett) unterbrochen. DFHBI (grün) bindet innerhalb von J2/3, die aus zwei G-Quartetten (gelb und blau) und einer Tetrade mit gemischter Sequenz (magenta) bestehen. Nicht-kanonische Basenpaarung wurde mit der Leontis-Westhof-Nomenklatur gekennzeichnet. (b) Kristallstruktur des *Spinach*-DFHBI-Komplexes mit einer Auflösung von 2,8 Å. Die G-Quartette, auf denen DFHBI lokalisiert ist werden von Kaliumionen (violett) stabilisiert. (c) Dreidimensionale Struktur der DFHBI Bindetasche innerhalb der *Spinach*-RNA. Der Farbenkode entspricht dem aus (a) und Wassermoleküle wurden als rote Kugeln dargestellt. Die Abbildungen wurden von Warner *et al.* und Jaffrey *et al.* übernommen.<sup>72,83</sup>

Dieser G-Quadruplex (Abbildung 12 a) besteht aus drei gestapelten Tetraden. Zwei Guanin-Quartette, die durch zwei Kaliumionen stabilisiert werden, liegen unterhalb eines Quartetts, das aus einer gemischten Basensequenz besteht. Im Gegensatz zu anderen RNA-G-Quadruplexen, haben die Guanin-Reste verschiedene Abstände zueinander und es fehlt die parallele Faltungstopologie.

DFHBI bindet in einer koplanaren Konformation zwischen G26 und G65 des oberen G-Quartetts (Abbildung 12 c). Dabei interagiert das Molekül über Hoogsteen-Basenpaarung mit U61 und A64 des Basentriplets von J2/3. Zusätzlich findet  $\Pi$ - $\Pi$ -Stacking über die Imidazolringe von DFHBI statt. Das ungepaarte G31 von *Spinach* interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Carbonylsauerstoff von DFHBI und über van-der-Waals Kontakte mit dem Benzylidenkohlenstoff. A63 bildet ebenfalls eine Wasserstoffbrücke von dem 2'OH zu einem Stickstoffatom (N3) von DFHBI aus. Weitere Wasserstoffbrücken werden von dem Phenolatsauerstoff von DFHBI zu dem 2'OH von G26 sowie zu einem Wassermolekül gebildet. Ebenso koordinieren die Fluoratome, die in *ortho*-Stellung zu dem phenolischen Sauerstoff von DFHBI sitzen, je ein Wassermolekül.

Innerhalb eines 8 Å Radius von dem Phenolsauerstoff von DFHBI liegen sieben Phosphate, die eine hohe negative Ladung erzeugen und dadurch Kationen anziehen. Darum befinden sich zwei Kaliumionen in diesem Bereich der Struktur, die über funktionelle Gruppen der RNA sowie Wasser und DFHBI binden. Die Kationen scheinen daher eine essentielle Funktion in der Stabilisierung von DFHBI innerhalb der RNA einzunehmen. Insgesamt unterliegt das *Spinach*-Aptamer bei der Bindung an DFHBI nur einer sehr geringen Konformationsänderung.<sup>31,32</sup>

### 1.3.3. Anwendungen des *Spinach*-DFHBI-Komplexes

Seit der Entwicklung des *Spinach*-DFHBI-Komplexes wurde dieser und dessen verschiedene Mutanten sowie Chromophor-Alterationen verschieden angewendet.

*Spinach*-Mutanten wurden z. B. zur Detektion von kleinen Metaboliten und Proteinen *in vitro* und *in vivo* entwickelt.<sup>84-91</sup> Dazu wurden mit Hilfe von SELEX verschiedene *Spinach*-Sensoren entwickelt, für deren Fluoreszenzentwicklung neben DFHBI noch ein Metabolit oder Protein nötig ist. Ein Beispiel ist der von Jeffrey *et al.* entwickelte Sensor, der spezifisch und quantitativ innerhalb von *E. coli* Zellen S-Adenosylmethionin (SAM) identifizieren kann.<sup>91</sup> Dazu wurde ein Aptamer, welches SAM bindet anstelle der Haarnadelschleife (L3, Abbildung 12 a) integriert und eine sogenannte „*Transducer*“ Region eingefügt. Diese Region bedingt, dass der *Spinach*-Sensor ohne den Metaboliten keine Fluoreszenz entwickelt.

Erst nach Zugabe des Metaboliten und DFHBI kann eine 25-fach erhöhte Fluoreszenz detektiert werden. Die spezifische Fluoreszenzentwicklung konnte ebenfalls in *E. coli* Zellen quantifiziert werden. Nach demselben Prinzip wurden Sensoren für z. B. Adenosin-5'-Diphosphat (ADP) oder Proteine wie Streptavidin, Thrombin und dem Hüllprotein des Bakteriophagen MS2 (MS2) entwickelt.<sup>84-91</sup>

Angelehnt an die *Spinach*-Sensoren wurde *Spinach-ST* entwickelt.<sup>92</sup> *Spinach-ST* wurde am 5'- und 3'-Ende verlängert, sodass eine nicht-fluoreszente Faltung angenommen wird. Wird ein sogenanntes „Trigger“-Oligonukleotid zu *Spinach-ST* gegeben, kann die korrekte Faltung wieder eingenommen werden und nach Zugabe von DFHBI Fluoreszenz detektiert werden. Die Detektion des „Triggers“ kann in Echtzeit quantitativ detektiert werden. Diese *Spinach*-Variante stellt ein Äquivalent zu Hybridisierungssonden (*molecular beacons*) dar, ohne die Notwendigkeit der chemischen Konjugation mit einem Farbstoff.<sup>93</sup>

Das *Spinach*-Aptamer wurde zudem verwendet, um die Stärke verschiedener T7-Transkriptionspromotoren zu vergleichen. Dazu wurde *Spinach* auf genetischer Ebene hinter die verschiedenen Promotoren eingebaut und anschließend die Fluoreszenzentwicklung detektiert. Durch die Insertion eines zusätzlichen Gens, das für ein fluoreszentes Protein kodiert, konnte danach bestimmt werden, ob der Promotor einen größeren Einfluss auf die Produktion des Proteins oder der RNA-Transkription hat.<sup>94,95</sup>

Verschiedene *Spinach*-Varianten wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenz *in vivo* untersucht, wenn sie in der kleinen Untereinheit des Ribosoms eingebaut vorliegen. Dabei stellte sich heraus, dass besonders *Broccoli*<sup>78</sup> und *Babyspinach*<sup>83</sup> gut geeignet sind, in strukturellen RNA-Protein-Komplexen Fluoreszenz auszuüben. Trotzdem ist die Position der Markierung mit diesen Aptameren im Hinblick auf die Fluoreszenzentwicklung wichtig.<sup>96</sup>

*Spinach*-Aptamere wurden ebenfalls verwendet um verschiedene RNA-Moleküle *in vivo* zu verfolgen.<sup>97-100</sup> So wurde z. B. mRNA in Bakterienzellen mit mehreren *Spinach*-Molekülen markiert überexprimiert (Tandem-*Spinach*)<sup>97</sup> oder es wurde eine *Spinach*-Version konzipiert, die erst bei spezifischer Bindung an die mRNA fluoresziert (*Turn-On* Sonde)<sup>99</sup>, um so auf endogenem Level die mRNA zu verfolgen. Auch auf endogenem Level wurde mRNA ebenfalls in Hefezellen betrachtet.<sup>98</sup> Ebenso wurde die Expression des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) *in vivo* mit Hilfe der *Spinach*-RNA näher untersucht.<sup>100</sup> All diese Anwendungen in lebenden Zellen haben gezeigt, dass der *Spinach*-DFHBI-Komplex und seine Alternativen es ermöglichen RNA von Interesse fluoreszent zu markieren, ohne einen Einfluss auf die Funktion dieser RNA zu haben.

Die Weiterentwicklung der *Spinach*-RNA, das *Broccoli*-Aptamer, wurde zudem in einem *High Throughput Screening (HTS)* angewendet, um einen Inhibitor für die Demethylase *Fat mass and obesity associated Protein (FTO)* zu identifizieren.<sup>101</sup> Für den *HTS* wurde innerhalb von *Broccoli* N6-Methyladenosin eingebaut, welches das Substrat von *FTO* ist. N6-Methyladenosin befindet sich zusätzlich in der Nähe der DFHBI-1T Bindestelle, sodass die Bindung zu DFHBI-1T und damit die Fluoreszenz des Komplexes verhindert werden. Wird das Substrat von *FTO* demethyliert, kann DFHBI wieder gebunden werden und die Fluoreszenz des *Broccoli*-DFHBI-1T-Komplexes kann entwickelt werden. Der entwickelte Assay zeigte sich robust genug, sodass die LOPAC<sup>1280</sup> mit diesem getestet wurde. Durch die Anwendung dieses Assays konnten neue affine Inhibitoren der *FTO* identifiziert werden.<sup>101</sup>

## 2. Zielsetzung

Um die Funktionen von RNA-Molekülen mit ihren Interaktionspartnern näher zu untersuchen und im Hinblick auf Fehlfunktionen, Medikamente gegen Krankheiten zu entwickeln, sind homogene Untersuchungsmethoden auf molekularer Ebene unabdingbar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine auf FRET basierende Analyseverfahren zur Charakterisierung von RNA-Protein-Interaktionen (RPIs) entwickelt werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob der fluoreszente *Spinach*-DFHBI-Komplex in der Nähe eines passenden Fluorophors einem Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterliegen kann. Um die nötige Nähe zu erzeugen, wurde die *Spinach*-RNA auf einer Seite verkürzt, sodass eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde hybridisieren konnte. Innerhalb dieses experimentellen Aufbaus wurden danach die Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften der beteiligten Fluorophore charakterisiert.

Anschließend sollte der *Spinach*-DFHBI-Komplex genutzt werden, um ein FRET-basiertes RPI-Analysesystem zu etablieren. Dazu wurde die RPI zwischen dem PP7-Protein und der *pp7*-RNA verwendet. Auf der einen Seite wurden verschiedene Cysteinmutanten des PP7-Proteins mit einem organischen Fluorophor versehen. Auf der anderen Seite wurde die *pp7*-RNA mit dem *Spinach*-DFHBI-Komplex fluoreszenzmarkiert. Nach Verifizierung der RPI über REMSA wurde untersucht, ob und in welchem Maße ein FRET-Signal erzeugt wurde.

Weiterführend sollte dieses System genetisch kodierbar genutzt werden. Der vorherige Versuchsaufbau wurde dahingehend abgeändert, dass das organische Fluorophor durch das genetisch kodierbare, fluoreszierende Protein *mCherry* ausgetauscht vorlag. Der *Spinach*-DFHBI-Komplex stellt dabei bereits einen genetisch kodierbarer RNA-Marker dar. Die Funktionalität dieser Analyseverfahren wurde *in vitro* und innerhalb eines zellulären Kontexts untersucht.

Die am Beispiel der *pp7*-RNA:PP7-Protein-Interaktion aufgestellte Analyseverfahren sollte abschließend auf ihre Anwendbarkeit in einem *High Throughput Screening (HTS)* geprüft werden. Optimierungen hinsichtlich einer verbesserten Assaystabilität sollten durchgeführt werden, bevor eine kleine Substanzbibliothek von pharmakologisch relevanten Molekülen getestet wurde. Initial identifizierte *Hits* wurden schließlich auf ihre potentiell inhibitorische Funktionalität hin untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1:** Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Assay Platten (384 well, Katalognummer 4514)	Corning (New York, USA)
Falcon Röhren (15 und 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Finntips	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipettenspitzen (0–20 µl und 20–200 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen (1 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE) oder Bioline
Reaktionsgefäße (0.5, 1 und 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Serologische Pipetten (10 und 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

##### 3.1.2. Geräte

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Äkta Explorer	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)
Äkta FPLC	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)
ChemiDoc MP	BioRad (Hercules, USA)
Elektroporator 2510	Eppendorf (Hamburg, DE)
Gene Pulser/Micro Pulser Küvetten 0,1 cm Schichtdicke	BioRad (Hercules, USA)
Inkubator	BINDER (Tuttlingen, DE)
kuroGel Mini/Midi Plus 6/15	VWR (Radnor, USA)
Elektrophoresekammer horizontal	
Microfluidizer Model 110S	Microfluidics Corporation (Newton, USA)
Mini-Protean Tetra System SDS-PAGE	BioRad (Hercules, USA)
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab (Erlange, DE)

Gerät	Hersteller
Paradigm Mikroplattenleser	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Peristaltikpumpe MCP process IP65	ISMATEC (Wertheim, DE)
PowerPac Basic Power Supply	BioRad (Hercules, USA)
Rotoren (JA-10, JA-25.50, JLA8100)	Beckmann-Coulter (Krefeld, DE)
Safire <sup>2</sup> Mikroplattenleser	Tecan (Männedorf, CHE)
Schüttelinkubator innova 4430	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Schüttler	INFORS HAT (Hamburg, DE)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, DE)
Tischzentrifugen	Eppendorf (Hamburg, DE)
UV-light Scanner Fluor Chem	Alpha Innotech (Kasendorf, DE)
Zentrifuge Avanti J-26XP	Beckmann-Coulter (Krefeld, DE)

### 3.1.3. Affinitäts-, Größenausschluss- und Ionenaustauschsäulen und -materialien

**Tabelle 3:** Liste der verwendeten Affinitäts-, Größenausschluss- und Ionenaustauschmatrizen.

Säule / Säulenmaterial	Hersteller	Verwendung
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)	Affinitätschromatographie
HiLoad Superdex 200 pg	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)	Präparativer Größenausschluss
HiLoad Superdex 75 pg	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)	Präparativer Größenausschluss
HisTrap FF	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)	Affinitätschromatographie
Nickel Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)	Affinitätschromatographie
Superdex 75 10 / 300 GL	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)	Analytischer Größenausschluss / Reinigung von RNA und chemisch markiertem Protein

### 3.1.4. Chemikalien

**Tabelle 4:** Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, DE)
DFHBI	Daniel Längle (AG Schade, TU Dortmund) und eigene Synthese
DFHBI-1T	Eigene Synthese
DMSO	Roth (Karlsruhe, DE)
dNTPs	Bioline
Doppelsträngige synthetische DNA	IDT (Leuven, BEL)
EDTA	Roth (Karlsruhe, DE)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe, DE)
LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe, DE)
NTPs	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Primer / Oligonukleotide	IDT (Leuven, BEL) oder MWG Eurofins (Ebersberg, DE)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe, DE)
Spermidin	Roth (Karlsruhe, DE)
TF3-Maleimid	AATbioquest (Sunnyvale, USA)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe, DE)

### 3.1.5. Kits

**Tabelle 5:** Liste der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
Cycle Pure	VWR (Radnor, USA)
E.N.Z.A. Plasmid Isolation	VWR (Radnor, USA)
Gelextraktion	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis	New England Biolabs (Ipswich, USA)
NucleoBond Xtra Midi Plasmid Isolation	Macherey-Nagel (Düren, DE)

### 3.1.6. Medien und Puffer

**Tabelle 6:** Liste der verwendeten Medien und Puffer.

Medium / Puffer	Zusammensetzung
CCMB	10 mM Kaliumacetat (pH = 7), 80 mM CaCl <sub>2</sub> , 20 mM MnCl <sub>2</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 % (v/v) Glycerin
Coomassie Färbelösung	40 % (v/v) EtOH, 0,3 % (w/v) Coomassie Blue R250, 0,3 % (w/v) Coomassie Blue G250
Coomassie-Entfärber	50 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure
DEPC behandeltes Wasser	0,1 % (v/v) DEPC in ddH <sub>2</sub> O, 12 h Inkubation, anschließende Inaktivierung durch Autoklavieren
DNA / RNA-Ladepuffer	30 % (w/v) Sucrose, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) OrangeG
GYT-Medium	0,25 g/100 ml Trypton, 0,125 g/100 ml Hefeextrakt, 10 % (v/v) Glycerin
LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 1 % NaCl, pH = 7,5
Low Salt LB Medium	0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, pH = 7,5
RNA-Puffer (10x)	500 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM MgCl <sub>2</sub> , 3 M KCl, 20 mM Spermidin
RNase Dekontaminationslösung	0,1 NaOH, 1 mM EDTA in DEPC behandeltem ddH <sub>2</sub> O
SDS-PAGE-Laufpuffer (1x)	30,2 g/l, Tris-HCl, 188 g/l Glycin, 1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (5x)	250 mM Tris-HCl (pH = 6,8), 10 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) β-Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) Bromphenolblau
SDS-Sammelgelpuffer (1x)	0,25 M Tris-HCl (pH = 6,8)
SDS-Trenngelpuffer (1x)	1 M Tris-HCl (pH = 8,8)
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g/l

Medium / Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer (50x)	NaCl, 0,19 g/l KCl, 2,03 g/l MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O, 2,5 g/l MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O, 40 ml 50 % Glukose 243 g/l Tris-HCl (pH = 8), 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA

### 3.1.7. *E. coli* Stämme

**Tabelle 7:** Liste der verwendeten *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )
BL21(DE3)Star	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) gal dcm rne131</i> (DE3)
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>

### 3.1.8. Plasmide

**Tabelle 8:** Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Referenz
pDONR201 gBlock_Spinach-pp7	diese Arbeit
pDONR201 gBlock_Spinach-wt	diese Arbeit
pDONR201 Leervektor	AG Hennig
pET28 Leervektor	AG Hennig
pET28 Spinach-pp7	diese Arbeit
pET28b His-PreScission	AG Hennig
pGEX-6p-2 Leervektor	AG Hennig
pGEX-6p-2 mCherry-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pGEX-6p-2 PP7 A22C	Sebastian Kollenda (Masterarbeit <sup>102</sup> )
pGEX-6p-2 PP7 A62C	Sebastian Kollenda (Masterarbeit <sup>102</sup> )
pGEX-6p-2 PP7 N93C	Sebastian Kollenda (Masterarbeit <sup>102</sup> )

Plasmid	Referenz
pGEX-6p-2 PP7-mCherry-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pGEX-6p-2 PP7ΔFG	diese Arbeit
pOPIN mCherry-PP7	Dortmund Protein Facility Dortmund (DPF)
pUC19 Leervektor	AG Brakmann
pUC19 Spinach-pp7	diese Arbeit
pUC19 Spinach-wt	diese Arbeit
pUC19 SpinachΔ15	diese Arbeit

### 3.1.9. Enzyme

**Tabelle 9:** Liste der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
BP-Clonase	Invitrogen Corporation (Waltham, USA)
DNaseI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
His- <i>PreScission</i>	Eigene Präparation
Lysozym	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MyTaq-Mix	Bioline
PfuCX-Polymerase	Eigene Präparation
ProteinaseK	Invitrogen Corporation (Waltham, USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T7-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Terminatormix	MPI Dortmund Sequencing Facility

### 3.1.10. Oligonukleotide / gBlocks

Alle zur Klonierung und Hybridisierung verwendeten gBlocks, sowie unmarkierten Oligonukleotide wurden von Integrated DNA Technologies (IDT DNA) erworben.

**Tabelle 10:** Liste der verwendeten gBlocks.

Name des gBlocks	Sequenz des gBlocks
gBlock_Spinach-pp7	ggggacaagtttgtaaaaaaagcaggcttcggccggaattcggacgcgac cgaaatggtgaaggacgggtccagtgccgacagaagatatggcttcgtgcc gcaactgttgagtagagtgtgagctccgtaactggtcgcgtcaagcttcggcc gacaccagctttcttgtaaaaaagtggtcccc
gBlock_Spinach-wt	ggggacaagtttgtaaaaaaagcaggcttcagatctcgatcccgcgaaatt aatacgactcactataggggacgacgaaatggtgaaggacgggtccagt gcttcggcactgttgagtagagtgtgagctccgtaactggtcgcgtctagca taacccttggggctctaaacgggtcttgaggggttttttctcgagagtc gacggcgggtcgggccccgggtctgaggctgtgatggagg atgtgctgagacctttggaacaggcattggaagactgccgtggccacacaag gaagcaggtatgtgatgacatcagccgacgctggcactgctgcaggaacag tgggctggagaattcggcgggtcgggccccgggtctgaggctgtgatggagg gtggttctggtctcgagcaccagctttcttgtaaaaaagtggtcccc

**Tabelle 11:** Liste der verwendeten Klonierungs- und Sequenzierungsprimer.

Name des Oligonukleotids	Sequenz des Oligonukleotids
3' EagI_HindIII_pp7RNA	atcgcggccgaagcttggcacgaagccatatcttctgtgcc
3' EagI_PP7	gatgcggccgctcaacgg
3' EagI_pp7_EagI	cgatcggccgggacgaagccatatcttctgtgccccggccgcat
3' EagI-Flag-PP7	atcgcggccgctcaggccatatcttctgtcatcgtcatccttgaatcacggc ccagcggcacaag
3' EagI_HindIII_ pp7RNA_EcoRI_EagOH	ggccgaagcttggcacgaagccatatcttctgtgcccgaattcc
3' EagI-PP7	atcgcggccgctcaacggccccagcggc
3' EcoRI_mCherry	atcggaaattctttaaactgcttgtacagctcgtccatg
3' HindIII-mCherry	gatcaagcttcttgtacagctcgtccatgccc
3' mCherry-SalI	tttaaactgcttgtacagctcgtccatgctcgactgcc
3' mCherry-Stop-BamHI	tttaaactgcttgtacagctcgtccatttaggatcctgcc
3' NotI_PP7	actggcggccgctcaacggc
3' PP7_KpnI_TEV	accgctgccctggaagtaaagggttttcggtaccaatacggccccagcgg ca
3' PP7_NotI/EagI	cgatgcggccgcttaacggccc
3' PP7_XbaI_His6_EcoRI	actggaattcttagtgatgggtgatgggtgatgtctagaaatacggccca gcggca
3' pp7RNA_spwtP1	ggcacgaagccatatcttctgtgcccagccacacctggacc
3' pUC19_Seq	ttcccgactggaaagcggg

Name des Oligonukleotids	Sequenz des Oligonukleotids
3' QC_PP7_A22C	gatctgacggtcgcaggtggactggatctc
3' QC_PP7_A62C	catcaacgacgtcgcactgatccagttttag
3' QC_PP7_N93C	gcgaggcctcgggtgctgcacgcaacgattgtcac
3' spinach(min_mut)	gacaggaccagttacggagc
3' spinach(wt)	gacgcgactagttacggagc
3' spmwt_dellast_15	agcttggagctcacactctactcaacagtgccgaagcactggaccctg ccttcaccatttcggtcgctcg
3'spmwt-last15_IVT	ggagctcacactctactcaacagtgcc
3' TEV_PP7	gccctggaagtaaaggttttcaatacggcccagcggcaca
3' mCherry-SalI(2)	ggcagtcgacttttaaactgcttgtacagctcgtccatg
3' mCherry-Stop-BamHI(2)	ggcaggatccttattttaactgcttgtacagctcgtccatg
3' T7prom_PP7RNA	cccgtccttcaccatttcggctcctgtcggcacgaagccatatcttctg tgccc
5' BamHI_PP7	atcgggatcctccaaaaccatcgttcttgagg
5' BamHI_PP7_2	cctgggatcctccaaaaccatcg
5' BamHI_PP7_3	ctgggatcctccaaaaccatcgttc
5' BamHI_PP7_SC	actgggatcctgcaaaaaccatcgttcttg
5' EagI_EcoRI_pp7RNA	atcgcggccggaattcggcacagaagatatggcttcgtgccc
5' EagI_pp7_EagI	atcgcggccgggcacagaagatatggcttcgtgcccggccgatcg
5'	ggccggaattcggcacagaagatatggcttcgtgccaagcttc
EagIOH_EcoRI_pp7RNA_Hi ndIII_EagI	
5' HindIII-mCherry	gatcaagcttatgggtgagcaagggcgaggag
5' NcoI PP7_SG	ggatccatgggaaaaaccatcgttcttgcggtcg
5' NcoI-Flag-PP7	atcgccatgggattacaaggatgacgatgacaagatggc
5' NcoI-PP7	atcgccatgggaaaaaccatcgttcttgcggtcg
5' PP7_TEV_Cherry	cgtattgaaaacctttacttccagggcagcgggtgtgagcaagggcg
5' pp7RNA	ggcacagaagatatggcttcg
5' pp7RNA_spwtp2	ggcacagaagatatggcttcgtgccgcagtcagcttgttgagtagag t
5' pUC19_Seq	gcatcaggcgccattcgc
5' QC_PP7_A22C	gagatccagtccacctgacgaccgtcagatc
5' QC_PP7_A62C	ctaaaactggatcagtgcgacgtcgttgatg
5' QC_PP7_N93C	gtgacaatcgttgctgacgacaccgaggcctcgc
5' spinach(min_mut)	gacaggaccgaaatggtgaa
5' spinach(wt)	gacgcaactgaatgaaatggtg
5' spmwt_dellast_15	aattcgacgcgaccgaaatggtgaaggacgggtccagtgcttcggcac tggtgagtagagtgtgagctcca
5' spmwt-last15_IVT	gaaattaatacgaactcactataggacgcgaccgaaatggtgaa
5' TEV_NcoI_PP7	gaaaacctttacttccagggcagcgggtccatggtccaaaaccatcgtt c
5' XhoI_mCherry(2)	ggcactcgaggtgagcaagggcgaggaggataa
5' XhoI-mCherry	ggcactcgagatggcgccaagctttctgga
5' XmaI_mCherry(2)	ggcaccgggggtgagcaagggcgaggaggataa

Name des Oligonukleotids	Sequenz des Oligonukleotids
5' XmaI-mCherry	ggcaccgccgggatggcgccaagctttctgga
5' T7prom_PP7RNA	gactcactataggggcacagaagatatggcttcgtgccgacaggacc
anti 3'spmwt	gacgcgaccgaaatg
anti 5'spmwt	catttcggtcgcgtc
pET28_seq_3'	cggtggcagcagccaactca
pET28_seq_5'	ggcgccagcaaccgcac
pGEX_seq_3'	ccgggagctgcatgtgtcag
pGEX_seq_5'	ggcctttgcagggctggc

Zudem wurden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide für das in Kapitel 4.1.2.3 beschriebenen Hybridisierungsexperiment von Eurofins MWG Operon (Eurofins) oder IDT DNA bezogen.

**Tabelle 12:** Liste der verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide.

Name des Oligonukleotids	Hersteller	Fluoreszenzmarkierung	Sequenz	Herstellerbezeichnung Fluoreszenzmarker
anti3' spmwt 5'RhoRed	IDT DNA	<i>Rhodamine Red</i>	gacgcgaccgaaatg	/5RhoR-XN/
anti3' spmwt_5'Cy3	IDT DNA	Cy3	gacgcgaccgaaatg	/5Cy3/
anti3' spmwt_5'PB	Eurofins	<i>Pacific Blue</i>	gacgcgaccgaaatg	5'-EXT (EXT = Extra)
anti3' spmwt_IBQF	IDT DNA	<i>Iowa Black FQ</i>	gacgcgaccgaaatg	/5IABkFQ/
anti3' spmwt5'JOE	IDT DNA	JOE	gacgcgaccgaaatg	/56-JOEN/
anti3'spmwt_5'TAMRA	Eurofins	TAMRA	gacgcgaccgaaatg	[TAM]
anti5' spmwt 3'Cy3	IDT DNA	Cy3	catttcggtcgcgtc	/3Cy3Sp/
anti5' spmwt 3'JOE	IDT DNA	6-JOE	catttcggtcgcgtc	/3Joe_N/
anti5' spmwt 3'RhoRed	IDT DNA	<i>Rhodamine Red</i>	catttcggtcgcgtc	/3RhoRd-XN/
anti5' spmwt 5'Cy3	IDT DNA	Cy3	catttcggtcgcgtc	/5Cy3/
anti5' spmwt 5'JOE	IDT DNA	6-JOE	catttcggtcgcgtc	/56-JOEN/
anti5' spmwt 5'PB	Eurofins	<i>Pacific Blue</i>	catttcggtcgcgtc	5'-EXT (EXT = Extra)
anti5' spmwt 5'RhoRed	IDT DNA	<i>Rhodamine Red</i>	catttcggtcgcgtc	/RhoR-XN/
anti5' spmwt 5'TAMRA	IDT DNA	TAMRA	catttcggtcgcgtc	/56TAMN/

Name des Oligonukleotids	Hersteller	Fluoreszenzmarkierung	Sequenz	Herstellerbezeichnung Fluoreszenzmarker
anti5' spmwt_3'PB	Eurofins	<i>Pacific Blue</i>	catttcggtcg cgtc	3'-PAB
anti5' spmwt_IBQF	IDT DNA	<i>Iowa Black FQ</i>	catttcggtcg cgtc	/3IABkFQ/
anti5'spmwt_3'TAMRA	Eurofins	TAMRA	catttcggtcg cgtc	[TAM]

### 3.1.11. Chromophore

**Tabelle 13:** Liste der synthetisierten Chromophore.

Chromophor	Hersteller
DFHBI	Daniel Längle (TU Dortmund, AG Schade) und eigene Synthese
DFHBI-1T	Eigene Synthese

### 3.1.12. Software

**Tabelle 14:** Liste der verwendeten Software.

Software	Hersteller
ale	Fluortools <sup>103</sup> , Søren Preus (Kopenhagen, DK)
ChemDraw 16.0	PerkinElmer (Waltham, USA)
ImageJ 1.46	National Institute of Health (Rockville, USA)
Inkscape 0.91	General Public License
LabVIEW 8.2 ( <i>Förster Distance Calculator</i> )	National Instruments <sup>104</sup> (Osman Bilsel, Austin, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, USA)
Prism 5.0	Graphpad (La Jolla, USA)
PyMOL 1.8	Schrödinger <sup>105</sup> (Cambridge, USA)
SnapGene Viewer	SnapGene (Chicago, USA)

### 3.1.13. Online-Tools

**Tabelle 15:** Liste der verwendeten Online-Tools.

Online-Tool	Internetpräsenz
Lab Calculator / <i>FRET Distance Calculator</i>	<a href="https://labcalculator.net/convert/microscopy/fret-distance">https://labcalculator.net/convert/microscopy/fret-distance</a> <sup>106</sup>
Protein Databank (PDB)	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird allgemein dazu genutzt DNA zu amplifizieren. Dabei befinden sich in der Reaktionslösung neben dem Template Primer, dNTPs und DNA-Polymerase in geeigneter Pufferumgebung. Die doppelsträngige Template-DNA wird bei 95°C aufgeschmolzen, sodass Einzelstränge vorliegen und im nächsten Schritt bei niedrigerer Temperatur die komplementären Primer hybridisieren können. Im Anschluss bindet die DNA Polymerase an den neu gebildeten doppelsträngigen Bereich und verlängert entlang des Leitstrangs den Primer, indem sie das komplementäre dNTP einbaut. Die Dauer der Elongation richtet sich dabei nach der Länge des zu amplifizierenden DNA Strangs und findet bei 72°C statt. Anschließend beginnt ein neuer Zyklus mit dem Aufschmelzen der neu gebildeten und wiederum der Template-DNA, sodass sich eine exponentielle Vervielfältigung der DNA ergibt. In dieser Arbeit wurde die PCR für mehrere Zwecke eingesetzt, die im Folgenden erläutert werden.

#### a) Amplifikations-PCR

Die Amplifikations-PCR wurde eingesetzt, um Inserts für die Klonierung zu vervielfältigen. Dafür dienten Vektoren, die das Insert enthielten, als Template. Für gewöhnlich wurden 50 µl wie folgt angesetzt:

**Tabelle 16:** Reaktionsansatz Amplifikations-PCR.

Reagenz	Volumen / Menge
5x PfuCX Puffer	10 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µl
3'-Primer (10 µM)	1 µl
Template	50 ng
dNTPs (25 nM)	0,5 µl
PfuCX Polymerase	1 µl
DMSO	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl

Die Primer hybridisieren am 5'- und 3'-Ende des Inserts. Dabei enthielten die Primer zusätzlich Überhänge mit Restriktionsschnittstellen, die für die Ligation in das gewünschte

Vektor-Rückgrat vonnöten waren. Die Insert-DNA wurde mit folgendem PCR-Programm amplifiziert.

**Tabelle 17:** Programm für die Amplifikations-PCR.

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	45 Sek.	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	30 Zyklen
Annealing	X°C	20 Sek.	
Elongation	72°C	X Sek.	
Finale Elongation	72°C	5 Min.	
Pause	4°C	Pause	

Die Annealing-Temperatur wurde den Primern entsprechend so angepasst, dass sie 2°C unter den berechneten Schmelztemperaturen derer lagen. Die Elongationszeit betrug 1 Min. / 1000 bp zu amplifizierender DNA.

#### b) Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente bei der Klonierung als erste Einschätzung, ob diese erfolgreich verlief. Dazu wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in ein Reaktionsgemisch gegeben (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Reaktionsansatz Kolonie-PCR.

Reagenz	Volumen / Menge
2x MyTaq-Mix	5 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µl
3'-Primer (10 µM)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 µl

Anschließend wurde die restliche Kolonie abermals auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen oder direkt in 5 ml LB Medium überführt. Der Reaktionsansatz wurde folgendem PCR-Programm unterzogen und anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

**Tabelle 19:** Programm für die Kolonie-PCR.

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	45 Sek.	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	30 Zyklen
Annealing	56°C	20 Sek.	
Elongation	72°C	45 Sek.	
Finale Elongation	72°C	2 Min.	
Pause	4°C	Pause	

Die amplifizierte DNA wurde gelelektrophoretisch analysiert und genauen Verifikation sequenziert.

c) QuikChange<sup>®</sup>-Mutagenese

Die QuikChange<sup>®</sup>-PCR wurde dazu verwendet, einzelne Mutationen in ein Plasmid einzuführen (Kapitel 3.2.1.8 c)). Dazu wurden 5'- und 3'-Primer benutzt, die die einzuführende Mutation enthielten und das gesamte Plasmid nach dem Protokoll der Amplifikations-PCR (Kapitel 3.2.1.1 a)) amplifiziert.

**Tabelle 20:** Programm für die Quikchange-PCR.

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	12–18 Zyklen
Annealing	55°C	1 Min.	
Elongation	68°C	1 Min. / kbp	
Pause	4°C	Pause	

d) Anschließend wurde ein Teil der PCR gelelektrophoretisch analysiert und der verbleibende Teil in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert. Die QuikChange<sup>®</sup>-Mutagenese wurde im Rahmen seiner Masterarbeit von Sebastian Kollenda durchgeführt, um die verschiedenen Cysteinmutanten des PP7-Proteins (A22C, A62C und N93C) zu erzeugen<sup>102</sup>.

### 3.2.1.2. Sequenzierung nach Sanger<sup>107</sup>

Zur Bestimmung einer DNA Sequenz wurde eine Sequenzierung nach Sanger<sup>107</sup> durchgeführt. Dabei werden zusätzlich zu den dNTPs fluoreszenzmarkierte ddNTPs in das Reaktionsgemisch eingebracht.

**Tabelle 21:** Reaktionsansatz Sequenzierungs-PCR.

Reagenz	Volumen / Menge
Terminator-Mix	2 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Template	250–350 ng
H <sub>2</sub> O	auf 20 µl

Hier wurde je ein Reaktionsansatz für die vorwärts und rückwärts gerichtete PCR angesetzt und folgendes PCR Programm angewendet:

**Tabelle 22:** Programm für die Sequenzierungs-PCR.

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	
Annealing	50°C	15 Sek.	26 Zyklen
Elongation	60°C	4 Min.	
Pause	4°C	Pause	

Durch den zufälligen Einbau der ddNTPs durch die DNA-Polymerase wird eine weitere Elongation der DNA durch Fehlen der 3'-OH-Gruppe verhindert und die für den Baustein spezifische Fluoreszenz kann positionsgebunden ausgelesen werden. Die Sequenzanalyse wurde von dem MPI-internen Service übernommen.

### 3.2.1.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse und Auftrennung von DNA wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Dafür wurden je nach Größe der zu analysierenden DNA 0,7–3 %ige Agarosegele gegossen. Im Anschluss wurde die DNA mit Probenpuffer versetzt und das Gel beladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100–150 V für 45 Min. in TAE Puffer und anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid für 30 Min. gefärbt.

#### 3.2.1.4. Gelextraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die durch PCR amplifizierte DNA wurde mit Hilfe des Cycle Pure Kits (Kapitel 3.1.5) nach Herstellerangaben gereinigt. Die gewünschten, durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mittels des Gelextraktions-Kit (Kapitel 3.1.5) nach Herstellerangaben gereinigt.

#### 3.2.1.5. Ethanolfällung von DNA

Für einige Zwecke, wie z. B. der Klonierung, war es notwendig die amplifizierte DNA über Ethanolfällung anzureichern. Dazu wurden 1/10 des Volumens 3 M NaAc und das 3-fache Volumen Ethanol zu dem Gemisch gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA für 15 Min. bei 20000 rpm zentrifugiert und somit pelletiert. Das Pellet wurde danach mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Anschließend konnte das Pellet in einem beliebigen Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen werden.

#### 3.2.1.6. Plasmidamplifikation und -isolierung

Zur Amplifikation eines Plasmids wurde dieses zunächst in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert und anschließend auf LB-Agarplatten, die das Selektionsantibiotikum enthielten, ausplattiert. Nach 37°C Inkubation über Nacht wurde eine einzelne Kolonie gepickt und wiederum über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum kultiviert. 4 ml der Zellen wurden für 1 Min bei 10000 g pelletiert und das Plasmid mit Hilfe des Plasmid-Isolationskits (Kapitel 3.1.5) nach Herstellerangaben isoliert. Zur Generierung einer größeren Menge Plasmids wurden 400 ml *E. coli* DH5 $\alpha$ , die das zu amplifizierende Plasmid enthielten, über Nacht kultiviert. Die Kultur wurde für 30 Min. bei 2500 g pelletiert und mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi Plasmid Isolationskits (Kapitel 3.1.5) nach Herstellerangaben gereinigt.

#### 3.2.1.7. Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen diente zum einen der Klonierung. Dazu wurden sowohl das als Insert dienende gereinigte PCR Produkt als auch das Plasmid in je einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz mit 5  $\mu$ l enzymespezifischem 10x Puffer und 1  $\mu$ l Restriktionsenzym (1U Enzym / 1 $\mu$ g Plasmid) inkubiert. Zum anderen diente der Restriktionsverdau der Überprüfung klonierter Plasmide. Dazu wurde ein 20  $\mu$ l Reaktionsansatz bestehend aus 2  $\mu$ l 10x Puffer, 0,2  $\mu$ l Restriktionsenzym und 200 ng des Plasmids gemischt. Alle Reaktionen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Des Weiteren diente der Restriktionsverdau von DNA der

Linearisierung, wie im Fall des Templates für die *in-vitro*-Transkription. Da für diese Reaktion eine größere Menge von Plasmid vonnöten war, wurde die Reaktion über Nacht inkubiert. Zudem wurde anhand der Herstellerangaben exakt berechnet, wie viel Enzym benötigt wurde. Dabei verdaute 1 U Enzym in 1 h bei 37°C 1 µg Plasmid.

### 3.2.1.8. Klonierungsmethoden

#### a) Restriktion-Ligation-Methode

Bei der Restriktion-Ligation-Klonierungsmethode wurde zunächst das gewünschte Insert per PCR generiert und anschließend über Restriktion verdaut. Das Vektorrückgrat wurde ebenfalls mit denselben Enzymen verdaut, sodass die Restriktionsüberhänge von Insert und Vektor übereinstimmen. Anschließend wurde das Insert in das Vektorrückgrat ligiert. Dabei betrug das molare Verhältnis von Insert zu Vektor 1:1, 1:3 und 1:10. Die benötigte Menge des Inserts wurde mit folgender Formel bestimmt.

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \text{molares Verhältnis} \left[ \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right] \times \frac{\text{Masse} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]} \quad \text{Formel 13}$$

Die Masse des Vektors betrug meist 25 ng. Zu Insert und Vektor wurden 1 µl Ligasepuffer und 0,5 µl Ligase gegeben und das 20 µl Reaktionsgemisch für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Im Anschluss wurden 5 µl des Ansatzes in *E. coli* DH5α Zellen transformiert und ausplattiert. Nach der Gewinnung des Plasmids aus einer Einzelkolonie wurde dieses sequenziert.

#### b) Gateway

Eine weitere Möglichkeit, ein Insert in ein Vektorrückgrat zu klonieren, basiert auf der Gateway Methode. Diese Art der Klonierung wurde zur Überführung eines gBlocks in den pDONR201 Vektor verwendet, um den gBlock anschließend in *E. coli* amplifizieren zu können. Bei gBlocks handelt es sich um synthetisierte, doppelsträngige DNA, die in dieser Arbeit für die Klonierung von bestimmten Sequenzen verwendet wurde. Für die Amplifizierung waren der synthetisierten DNA attB Seiten für eine BP-Reaktion angehängt und 4,8 ng gBlock, 300 ng pDONR201 und 0,6 µl BP KlonaseII Mix wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde für weitere 10 Min. mit 1 µl ProteinaseK die BP KlonaseII abgebaut. Das Reaktionsgemisch wurde in *E. coli* DH5α Zellen transformiert und ausplattiert. Nach der Gewinnung des Plasmids aus einer Einzelkolonie wurde dieses sequenziert.

c) QuikChange<sup>®</sup>-Mutagenese

Die Mutagenese wurde dazu verwendet, Mutationen in ein Plasmid einzuführen. Dazu wurde in einer PCR ein komplementäres Primerpaar verwendet, welches die gewünschte Mutation enthielt und das gesamte Plasmid amplifiziert (Kapitel 3.2.1.1 d)). Die Anzahl der Zyklen war abhängig von der Art der einzuführenden Mutation: für eine Punktmutation auf DNA-Ebene wurden 12 Zyklen, für eine einzelne Aminosäureänderung auf Proteinebene 16 Zyklen und für mehrere Aminosäureinsertionen oder -deletionen 18 Zyklen angewandt. Im Anschluss an die PCR wurde zur Überprüfung ein Teil des Reaktionsgemischs gelelektrophoretisch analysiert und der verbleibende Teil in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert und ausplattiert. Um die eingeführte Mutation zu bestätigen, wurde das aus einer Einzelkolonie gewonnene Plasmid sequenziert.

3.2.1.9. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation eines Plasmids in *E. coli* Zellen war es notwendig, diese zunächst kompetent für die chemische Transformation oder Elektrotransformation zu machen.

a) Chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine 5 ml Übernacht-Vorkultur, ggf. unter Selektionsdruck, kultiviert und damit am nächsten Tag 100 ml LB Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Die Zellen wuchsen bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4–0,6 und wurden anschließend für 30 Min. auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugieren für 30 Min. bei 3000 g wurden die Zellen in 25 ml CCMB Puffer (Kapitel 3.1.6) resuspendiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abermals durch Zentrifugieren sedimentiert, in 2 ml CCMB Puffer aufgenommen, in 100  $\mu$ l Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

b) Elektrokompente *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden zunächst 10 ml der gewünschten Zellen in LB über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde diese 10 ml Vorkultur in 1 l Low Salt LB (Kapitel 3.1.6) überführt und die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5–0,7 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Min. auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation für 10 Min bei 4000 g geerntet. Die Zellen wurden dreimal mit je 100 ml kaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 20 ml GYT Medium (Kapitel 3.1.6) resuspendiert. Das

Zellgemisch wurde in 50 µl Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

#### 3.2.1.10. Transformation von *E. coli* Zellen

Die Transformation diente der Aufnahme eines Plasmids in *E. coli* Zellen, um dieses dadurch amplifizieren, reinigen und ggf. exprimieren zu können.

##### a) Chemische Transformation

Für die chemische Transformation wurden die chemisch kompetenten Zellen zunächst 5 Min. auf Eis aufgetaut und 50 ng Plasmid dazugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 50 Sek. bei 42°C erhitzt und anschließend wieder für 2 Min. auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 1 ml warmes SOC Medium (Kapitel 3.1.6) gegeben und für 1 h unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden auf Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert und für die weitere Verwendung über Nacht bei 37°C kultiviert.

##### b) Elektrotransformation

Die elektrokompenten Zellen wurden 5 Min. auf Eis aufgetaut. Zu einem 50 µl Aliquot wurden 50 ng des zu transformierenden Plasmids gegeben, das Gemisch in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Kapitel 3.1.2) überführt und für 1 Min. inkubiert. Der Elektroporator (Kapitel 3.1.2) wurde auf 25 µF, 200 Ω und 180 V eingestellt und die Küvette unter diesen Einstellungen unter Strom gesetzt. Sofort im Anschluss wurde warmes SOC-Medium (Kapitel 3.1.6) zu den Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden auf Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert und für die weitere Verwendung über Nacht bei 37°C kultiviert.

#### 3.2.1.11. *In-vitro*-Transkription

Die *In-vitro*-Transkription diente der Synthese von RNA. Dazu wurde ein Template kloniert, das den T7-Promotor, die zu transkribierende Sequenz, sowie eine Restriktionsschnittstelle am Ende der Sequenz enthielt. Das Template wurde anhand dieser Schnittstelle linearisiert (Kapitel 3.2.1.7) und im Anschluss in der *In-vitro*-Transkription eingesetzt. Dazu wurde das HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (Kapitel 3.1.5) wie folgt verwendet.

**Tabelle 23:** Reaktionsansatz *In-vitro-Transkription*.

Reagenz	Volumen / Menge
Linearisiertes Template	2 µg
10x T7 Reaktionspuffer	2 µl
T7 RNA Polymerase Mix	2 µl
ATP (100 mM)	2 µl
GTP (100 mM)	2 µl
UTP (100 mM)	2 µl
CTP (100 mM)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl

Die Reaktion wurde für 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Größenausschlusschromatographie (Superdex 75 10 / 300 GL) (Kapitel 3.1.3) in 1x RNA Puffer (Kapitel 3.1.6) analysiert und gereinigt.

### 3.2.2. Biochemische Methoden

#### 3.2.2.1. Genexpression in *E. coli*

Die Genexpression in *E. coli* wurde zur Überexpression von Proteinen verwendet. Dazu wurde zunächst das gewünschte Plasmid in BL21(DE3) *E. coli* Zellen transformiert und anschließend in 100 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Das Plasmid kodierte dabei das zu produzierende Protein und eine Antibiotikaresistenz zur Selektion. Am nächsten Tag wurden 2 l Medium (LB oder TB) mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 (LB) oder 1,2 (TB) bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Die Expression wurde anschließend durch Zugabe von 0,1 mM IPTG in die auf 14°C abgekühlte Kultur induziert und erfolgte über Nacht bei 20°C und 160 rpm.

#### 3.2.2.2. *E. coli* Zellernte

Nach erfolgter Expression des Zielproteins wurden die *E. coli* BL21(DE3) Zellen bei 3500 g für 30 Min. sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert. Die Zusammensetzungen der Lysepuffer sind Tabelle 24 zu entnehmen.

**Tabelle 24:** Zusammensetzung der verwendeten Lysepuffer.

Tag des überexprimierten Proteins	Zusammensetzung des Lysepuffers
GST	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 14 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH = 7,5
His <sub>6</sub>	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 15 mM Imidazol, pH = 7,5

Die resuspendierten Zellen wurden bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2.3. *E. coli* Zellaufschluss

Das resuspendierte Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut, mit je einer Spatelspitze DnaseI, Lysozym und 0,1 mM PMSF versetzt, für ca. 1 h gerührt und die Zellen mit dem Microfluidizer (Kapitel 3.1.2) dreimal aufgeschlossen. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 24000 rpm für 1 h abgetrennt und aus dem Überstand das Protein gereinigt (Kapitel 3.2.2.5 und Kapitel 3.2.2.6).

### 3.2.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Reinigung von Proteinen wurde mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verfolgt und analysiert. Dazu wurden die Proben mit 5x SDS Probenpuffer (Kapitel 3.1.6) versetzt und bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 10 Min. denaturiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  der Probe und ein Protein Standard auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine bei 150 V für ca. 80 Min. der Größe nach aufgetrennt. Die Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels ist in Tabelle 25 zu finden.

**Tabelle 25:** Zusammensetzung der Sammel- und Trenngel für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)
30 % Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	0,425 ml	2,0 ml	2,5 ml
Sammel- / Trenngelpuffer	1,25 ml	1,875 ml	1,875 ml
ddH <sub>2</sub> O	0,8 ml	1,125 ml	0,625 ml
20 % (w/v) SDS	12,5 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$

Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  10 % (w/v) APS und 5  $\mu\text{l}$  TEMED induziert. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und anschließend mit 2-Propanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisierung wurde das 2-Propanol verworfen. Zu dem Sammelgel wurden ebenfalls 50  $\mu\text{l}$  10 % (w/v) APS und 5  $\mu\text{l}$  TEMED gegeben. Ein Kamm mit 10 oder 15 Taschen wurde auf das Sammelgel gesetzt und dieses ebenfalls polymerisiert. Für Proteine bis 30 kDa wurde ein 15 %iges und für größere Proteine ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel verwendet.

### 3.2.2.5. Reinigung von Glutathion-S-Transferase markierten Proteinen

Soweit nicht anders erwähnt fanden alle Arbeiten bei 4°C statt.

Geklärte Lysate, die ein mit einer Glutathion-S-Transferase (GST-Tag) modifiziertes Protein enthielten, wurden mittels einer Peristaltikpumpe (Kapitel 3.1.2) bei einer Flussrate von 1 ml/Min auf eine 25 ml Glutathion-Säule (Kapitel 3.1.3) geladen. Dann wurde mit 5 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer (Tabelle 26) gewaschen und anschließend eine His<sub>6</sub>-PreScission-Protease verdünnt in Lysepuffer auf die Säule gegeben, um den GST-Tag enzymatisch vom Zielprotein abzutrennen.

**Tabelle 26:** Zusammensetzung der für die Reinigung von GST-markiertem Protein verwendeten Puffer.

Name des Puffers	Zusammensetzung des Puffers
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 14 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH = 7,5
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 14 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10 mM GSH, pH = 7,5
Größenausschlusspuffer (1xRNA Puffer)	50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 300 mM KCl, 2 mM Spermidin

Das Puffergemisch wurde über Nacht bei einer Flussrate von 0,5 ml/Min zirkulierend über die Säule gepumpt. Am nächsten Morgen wurde das Zielprotein mit 1,5 SV Waschpuffer von der Säule gewaschen und dieses anschließend mit Hilfe eines Konzentrators mit 10 kDa oder 30 kDa *cutoff* bei 3000 g konzentriert. Zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung des Zielproteins von dem GST-Tag und zur Regenerierung der GSH-Säule wurde der auf der Säule verbliebene Tag mit 1,5 SV Elutionspuffer (Tabelle 26) von der Säule eluiert. Die

Konzentration des Zielproteins wurde mit dem NanoDrop (Kapitel 3.1.2) unter genauer Angabe der Proteineigenschaften (Extinktionskoeffizient und molare Masse) bestimmt. Im Anschluss wurden maximal 30 mg des Proteins mit 1x RNA Puffer (Tabelle 26) gefiltert. Dieser Größenausschluss erfolgte mit der HiLoad Superdex 75 pg oder HiLoad Superdex 200 pg (Kapitel 3.1.3), je nach Größe des zu reinigenden Proteins, bei einer Flussrate von 1 ml/Min. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, die anschließend über SDS-PAGE analysiert wurden. Fraktionen, die nur das Zielprotein enthielten, wurden vereint, abermals konzentriert, in Aliquotes mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Reinigung der PP7-Cysteinmutanten wurde von Sebastian Kollenda im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt<sup>102</sup>.

### 3.2.2.6. Reinigung von His<sub>6</sub>-markierten Proteinen

His<sub>6</sub>-markierte Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/Min. an eine 1 ml Nickelsäule (Kapitel 3.1.3) gebunden und anschließend wurde mit 100 SV Waschpuffer (Tabelle 27) gewaschen.

**Tabelle 27:** Zusammensetzung der für die Reinigung von His<sub>6</sub>-markierten Protein verwendeten Puffer.

Name des Puffers	Zusammensetzung des Puffers
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 15 mM Imidazol, pH = 7,5
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH = 7,5
Größenausschlusspuffer (1xRNA Puffer)	50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 300 mM KCl, 2 mM Spermidin

Das Protein wurde mit 5 SV Elutionspuffer (Tabelle 27) eluiert und über einen Konzentrator mit 10 kDa oder 30 kDa *cutoff* konzentriert. Danach wurde das konzentrierte Protein auf eine HiLoad Superdex 75 pg oder HiLoad Superdex 200 pg (Kapitel 3.1.3) geladen und bei 1 ml/Min über Nacht mit 1xRNA Puffer (Tabelle 27) gefiltert. Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen gelelektrophoretisch analysiert und Fraktionen, die das Zielprotein rein einhielten, vereint. Nach Konzentration dieser Fraktionen wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2.7. Chemische Markierung von PP7-Cystein-Mutanten

Die PP7-Cystein Mutanten A22C, A62C und N93C wurden wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben gereinigt, wobei die Größenausschlusschromatographie ohne thiolhaltigen Puffer durchgeführt wurde. Anschließend wurden 2 mg des jeweiligen Proteins mit 1,5 äq. TF3-Maleimid (Kapitel 3.1.4) in 1 ml Volumen gemischt und für 1 h auf Eis inkubiert. Das Maleimid bildet mit der Thiolgruppe des Cysteins im Protein eine Thioetherbindung aus und somit ist die TF3 Markierung kovalent mit der jeweiligen Mutante verknüpft. Um überschüssigen Farbstoff von markiertem Protein zu trennen, wurde im Anschluss eine weitere Größenausschlusschromatographie mit der Superdex 75 10 / 300 GL (Kapitel 3.1.3) in 1x RNA Puffer (Kapitel 3.1.6) durchgeführt. Die Fraktionen, die markiertes Protein enthielten, wurden vereint, konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die chemische Markierung der PP7-Cystein-Mutanten mit TF3-Maleimid wurde im Rahmen seiner Masterarbeit von Sebastian Kollenda durchgeführt<sup>102</sup>.

### 3.2.2.8. Reinigung von *in vitro* transkribierter RNA über Größenausschlusschromatographie

Die RNA Konstrukte wurden wie in Kapitel 3.2.1.11 beschrieben *in vitro* transkribiert. Zur Abtrennung von freien Nukleotiden und überschüssigem Template wurde im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie mit der Superdex 200 10 / 300 GL mit einer Flussrate von 0,4 ml/Min. durchgeführt. Fraktionen, die das gewünschte Transkript enthielten, wurden identifiziert, vereint und konzentriert (10 kDa *cutoff*). Die Identifikation der Transkript-enthaltenden Fraktionen erfolgte über Referenzläufe, die ausschließlich NTPs oder Template enthielten und über die Zugabe von DFHBI mit anschließender Fluoreszenzbestimmung mit dem Safire<sup>2</sup>. Die Konzentration wurde per NanoDrop (Kapitel 3.1.2) bestimmt und die RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 3.2.3. Fluoreszenzbasierte und spektroskopische Methoden

### 3.2.3.1. Messung der Fluoreszenzspektren der Fluorophore

Zur Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren von *Spinach*-DFHBI, 5-Carboxytetramethylrhodamin (TMR), *Rhodamine Red* (RHO), 6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein (JOE), Cyanin 3 (Cy3), *Pacific Blue* (PB), TideFluor3 (TF3) und *mCherry* wurden diese auf 500 nM mit 1xRNA Puffer verdünnt. Das Gesamtvolumen pro Messung betrug 20  $\mu\text{l}$ . Für das jeweilige Anregungsspektrum wurde je 10 nm blauverschoben

zum Emissionsmaximum ausgelesen und für das jeweilige Emissionsspektrum 10 nm rotverschoben vom Anregungsmaximum angeregt und das gesamte Spektrum in 1 nm Schritten mit dem Safire<sup>2</sup> (Kapitel 3.1.2) in Corning 4514 Mikrotiterplatten (Kapitel 3.1.1) aufgenommen.

### 3.2.3.2. Messung der Absorptionsspektren der verschiedenen Fluorophore

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren von *Spinach*-DFHBI, 5-Carboxytetramethylrhodamin (TMR), *Rhodamine Red* (RHO), 6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein (JOE), Cyanin 3 (Cy3), *Pacific Blue* (PB), *TideFluor3* (TF3) und *mCherry* wurden diese auf 500 nM 1xRNA Puffer verdünnt. Das Gesamtvolumen pro Messung betrug 500  $\mu$ l. Das Absorptionsspektrum wurde anschließend in 1 nm Schritten mit dem NanoDrop (Kapitel 3.1.2) in Küvetten aufgenommen.

### 3.2.3.3. RNA Electromobility Shift Assay

Die Methode des *RNA Electromobility Shift Assays* (REMSAs) wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu angewandt, die Bindung von RNA Konstrukten an Proteine zu verifizieren. Dazu wurde ein 2 %iges Agarosegel unter RNase-freien Bedingungen gegossen und das Protein in verschiedenen Verdünnungen zu 250 nM RNA gegeben. Die Proteinkonzentration variierte dabei von 0–12,5  $\mu$ M in 1:2 Verdünnungen. Für die Bindung der Oligonukleotide an *Spinach* $\Delta$ 15 wurden diese in einer Konzentration von 750 nM zu 250 nM RNA gegeben. Das jeweilige Gemisch wurde ohne weitere Inkubation über das zuvor gegossene Agarosegel für 50 Min bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Agarosegel in einem Bad aus 5  $\mu$ M DFHBI in TAE Puffer gefärbt und unter Fluoreszenzanregung mit der ChemiDoc MP (Kapitel 3.1.2) ausgelesen. Dabei wurde, wenn das Protein rot markiert war, zusätzlich zu dem grünen Kanal der rote Kanal aufgenommen. Das Agarosegel wurde danach ebenfalls mit Ethidiumbromid gefärbt und mit dem AlphaImager (Kapitel 3.1.2) unter UV Anregung analysiert. Die REMSAs der PP7-Cysteinmutanten zu *Spinach-pp7* wurde im Rahmen seiner Masterarbeit von Sebastian Kollenda erstmals durchgeführt<sup>102</sup> und im Rahmen dieser Arbeit optimiert.

### 3.2.3.4. Titration von DFHBI und DFHBI-1T zu RNA-Konstrukten

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten sowie der Fluoreszenzsteigerung nach Bildung des RNA-Fluorophor Komplexes wurden Titrationsstudien durchgeführt. Dazu wurden zu 250 nM des jeweiligen RNA Konstrukts verschiedene Konzentrationen von DFHBI bzw.

DFHBI-1T gegeben. Der Konzentrationsbereich reichte dabei von 0–10  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Fluorophors. Die Messung fand in schwarzen 384er Mikrotiterplatten am Safire<sup>2</sup> (Kapitel 3.1.2) statt. Die Anregungswellenlänge betrug 462 nm für DFHBI und 472 nm für DFHBI-1T, die Emissionswellenlänge betrug für beide Fluorophore 506 nm. Die Auswertung der Messungen wurde mit Microsoft Excel und die Erstellung der Grafiken mit Graphpad Prism (Kapitel 3.1.12) vorgenommen.

### 3.2.3.5. Bestimmung der Faltungseffizienz von *Spinach-wt* und *Spinach-pp7*

Zur Bestimmung der Faltungseffizienzen von *Spinach-pp7* im Vergleich zu *Spinach-wt* wurde zunächst die Fluoreszenz von 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  der jeweiligen RNA mit 100 nM DFHBI gemessen. Da sich die Fluoreszenz von 10 und 20  $\mu\text{M}$  RNA mit 100 nM DFHBI gleich war, konnte davon ausgegangen werden, dass sich in allen drei Fällen 100 nM des *Spinach*-DFHBI-Komplexes ausgebildet hatten. Die Dreifachbestimmung wurde anschließend mit 10  $\mu\text{M}$  RNA und 100 nM DFHBI durchgeführt. Der erhaltene Fluoreszenzwert entsprach der Fluoreszenz von 100 nM RNA-DFHBI Komplex. Um die Faltungseffizienz zu bestimmen wurde ebenfalls die Fluoreszenz der RNA nach Zugabe eines Überschusses DFHBI vermessen. Zur Vereinfachung der Rechnung wurde hier 10  $\mu\text{M}$  DFHBI zu 100 nM RNA gegeben. Mit der folgenden Formel wurde anschließend die Faltungseffizienz der unterschiedlichen RNA-Konstrukte berechnet.

$$\text{Faltungseffizienz [\%]} = \frac{F_{\text{Überschuss Fluorophor}}}{F_{\text{Überschuss RNA}}} \times 100 \quad \text{Formel 14}$$

### 3.2.3.6. Titration von DNA-Oligonukleotiden zu *Spinach $\Delta$ 15*-RNA

Die lyophilisiert vorliegenden DNA-Oligonukleotide wurde nach Herstellerangaben zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  in 1xRNA Puffer (Kapitel 3.1.6) aufgenommen. Die Konzentration wurde mit dem NanoDrop überprüft. Die Oligonukleotide wurden zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  weiter verdünnt und anschließend eine 1:2 Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden 250 nM *Spinach $\Delta$ 15* und 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI gegeben. Das Volumen pro Kavität in der Corning 384 Platte (Kapitel 3.1.1) betrug 20  $\mu\text{l}$ . Die Fluoreszenz wurde mit dem Safire<sup>2</sup> unter Anregung bei 462 nm und Emission von 506 nm detektiert. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und die Grafiken wurden mit Graphpad Prism (Kapitel 3.1.12) erstellt.

### 3.2.3.7. Reversibilität des Oligonukleotid-*Spinach* $\Delta$ 15 Quenchingkomplexes

Mit Hilfe eines Verdrängungsexperiments wurde auf die Reversibilität des in Kapitel 3.2.3.6 beschriebenen Experiments getestet. Dazu wurden 100 nM am 5'-Ende mit TAMRA markiertes Oligonukleotid mit steigenden Konzentrationen des komplementären nicht markierten Oligonukleotid inkubiert und anschließend durch Zugabe von 250 nM *Spinach* $\Delta$ 15 der Quenchingkomplex gebildet. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und die Grafiken wurden mit Graphpad Prism (Kapitel 3.1.12) erstellt.

### 3.2.3.8. Fluoreszenzlöschung von *Pacific Blue*

Die Messungen zur Verifikation, ob *Spinach* $\Delta$ 15 als Akzeptor in der Lage ist die Fluoreszenz eines Donors spezifisch zu vermindern, wurden mit 350 nM einer DNA-Sonde durchgeführt, die am 5'- oder 3'-Ende mit *Pacific Blue* (PB) markiert war. Zu der DNA-Sonde wurden Verdünnungen von *Spinach* $\Delta$ 15 titriert (2 mM in 1:2 Verdünnungen). Die Messung wurde in 1x RNA Puffer durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 350 nm und es wurden die Emissionsspektren von 420–650 nm in 1nm Schritten mit dem Safire<sup>2</sup> aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und die Grafiken wurden mit Graphpad Prism (Kapitel 3.1.12) erstellt.

### 3.2.3.9. Titration von TF3-markierten PP7-Proteinmutanten zu *Spinach-pp7*-RNA

Die PP7-Cysteinmutanten A22C, A62C und N93C wurden wie in Kapitel 3.2.2.7 beschrieben mit TF3 markiert und anschließend chromatographisch gereinigt. Es wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe von 25–0  $\mu$ M Protein in 1xRNA Puffer erstellt und danach mit einer Endkonzentration von 250 nM *Spinach-pp7* und 2,5  $\mu$ M DFHBI hinzugefügt. Die Messung erfolgte in schwarzen 384er Mikrotiterplatten in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l mit dem Safire<sup>2</sup> bei einer Anregungswellenlänge von 462 nm und einer Emissionswellenlänge von 506 nm. Die Titration der TF3-markierten PP7-Cysteinmutanten zu *Spinach-pp7* wurde von Sebastian Kollenda im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt<sup>102</sup>. Die Fluoreszenzlöschungseffizienz wurde relativ zur *Spinach-pp7* Fluoreszenz ohne Zugabe von markiertem Protein mit Microsoft Excel berechnet und anschließend die Graphiken mit GraphPad Prism (Kapitel 3.1.12) erstellt.

### 3.2.3.10. Bestimmung der Reversibilität des PP7-TF3:*Spinach-pp7* Quenchingkomplexes

Die Reversibilität des in Kapitel 3.2.3.9 beschriebenen Experiments wurde mit einem Verdrängungstest gezeigt. Dafür wurde der Quenchingkomplex bestehend aus 12,5  $\mu\text{M}$  PP7-N93C-TF3 und 250 nM *Spinach-pp7* präformiert und anschließend unmarkiertes PP7 $\Delta$ FG Protein zu titriert. Hier variierte die Konzentration von PP7 $\Delta$ FG von 0–25  $\mu\text{M}$ . Die Fluoreszenzlöschungseffizienz wurde relativ zur *Spinach-pp7* Fluoreszenz ohne Zugabe von markiertem Protein mit Microsoft Excel berechnet und anschließend die Graphiken mit GraphPad Prism (Kapitel 3.1.12) erstellt.

### 3.2.3.11. Titration von *mCherry*-markiertem PP7 $\Delta$ FG-Protein zu *Spinach-pp7*-RNA

Die Reinigung der N- und C-terminal mit *mCherry* markierten PP7-Proteine, sowie PP7 $\Delta$ FG erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.5 und Kapitel 3.2.2.6 beschrieben. Mit den gereinigten Proteinen wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in 1xRNA Puffer mit 250 nM NaCl von 0–25  $\mu$ M erstellt und zu 250 nM *Spinach-pp7*-RNA und 2,5  $\mu$ M DFHBI gegeben. Die Fluoreszenzlöschungseffizienz wurde relativ zur *Spinach-pp7* Fluoreszenz ohne Zugabe von markiertem Protein mit Microsoft Excel berechnet und anschließend die Graphiken mit GraphPad Prism (Kapitel 3.1.12) erstellt.

### 3.2.3.12. Bestimmung der Reversibilität des *mCherry*-PP7:*Spinach-pp7*-Quenchingkomplexes

Die Reversibilität des in Kapitel 3.2.3.11 beschriebenen Experiments wurde mit einem Verdrängungstest gezeigt. Dafür wurde der Quenchingkomplex bestehend aus 700 nM (N)-*mCherry*-PP7 und 250 nM *Spinach-pp7* präformiert und anschließend unmarkiertes PP7 $\Delta$ FG Protein hinzu titriert. Die Konzentration von PP7 $\Delta$ FG variierte von 0–25  $\mu$ M. Es wurde in 1xRNA Puffer, der 250 nM NaCl enthielt, gemessen. Die Fluoreszenzlöschungseffizienz wurde relativ zur *Spinach-pp7* Fluoreszenz ohne Zugabe von markiertem Protein mit Microsoft Excel berechnet und anschließend die Graphiken mit GraphPad Prism (Kapitel 3.1.12) erstellt.

### 3.2.3.13. Expression von *Spinach-pp7* in *E. coli* BL21(DE3) und anschließende Titration von *mCherry*-PP7 zu dem *Spinach-pp7* enthaltenen Lysat

Ein pET28 Vektor, der für *Spinach-pp7* unter der Kontrolle eines T7-Promotors kodiert, wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Zellen auf Selektionsagar (50  $\mu$ g/ml Kanamycin) ausplattiert. Über Nacht wurde eine Vorkultur kultiviert, die zum Inokulieren einer 2 l LB Kultur (50  $\mu$ g/ml Kanamycin) mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 genutzt wurde. Anschließend wurde die Kultur bei 37°C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 geschüttelt und die RNA-Transkription durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach Expression für 4 h bei 37°C und 160 rpm wurden die Zellen für 30 Min. bei 3500 g geerntet und in der gleichen Menge 2xRNA-Puffer (Kapitel 3.1.6) resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mit dem Microfluidizer vorgenommen und das Lysat durch Zentrifugation für 1 h bei 20000 rpm geklärt. Danach wurde das Lysat mit 1xRNA Puffer auf eine OD<sub>260</sub> von 1,5 verdünnt. DFHBI wurde zu einer finalen Konzentration von 1,3  $\mu$ M zugegeben. Es wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe mit 5  $\mu$ L des jeweiligen gereinigten Proteins (*mCherry* oder *mCherry*-PP7)

hergestellt und 10  $\mu\text{L}$  des Lysatmixes hinzugefügt. Die finalen Konzentrationen der Proteine lagen bei 66  $\mu\text{M}$ . Die Emissionsspektren wurden von 470–720 nm in 1 nm Schritten nach Anregung bei 425 nm mit dem Safire<sup>2</sup> (Tecan) detektiert.

#### 3.2.3.14. *High Throughput Screening* der LOPAC<sup>1280</sup> zur Identifikation von Inhibitoren der PP7-pp7 Interaktion

Zunächst wurden die Bedingungen für das spätere *High Throughput Screening (HTS)* optimiert. Dazu wurde die DMSO Toleranz, das minimale Volumen pro Kavität und der Z-Faktor anhand des in Kapitel 3.2.3.9 und Kapitel 3.2.3.10 beschriebenen Experiments bestimmt. Die LOPAC<sup>1280</sup> wurde vom COMAS (*Compound Management and Screening Center*, Dortmund) bereitgestellt. Der Quenchingkomplex bestehend aus 12,5  $\mu\text{M}$  PP7-N93C-TF3 und 250 nM *Spinach-pp7*, sowie 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI-1T wurde formiert und so zu der Substanzbibliothek gegeben, dass die Endkonzentrationen der Substanzen bei 15  $\mu\text{M}$  lag. Nach einer Inkubation von 3 h im Kühlschrank wurde die *Spinach-pp7* Fluoreszenz mit dem Paradigm Mikroplattenleser (Kapitel 3.1.2) und passenden Filtereinstellungen (Fluorescein-Filterset, Ex = 490 nm, Em = 525 nm) ausgelesen. Als Negativkontrolle wurde auf jeder Platte nur der Quenchingkomplex und als Positivkontrolle der Quenchingkomplex mit 25  $\mu\text{M}$  PP7 $\Delta$ FG mehrfach mit ausgelesen.

### 3.2.4. Computerbasierte Methoden

#### 3.2.4.1. Bestimmung des Abstandes zwischen DFHBI und dem jeweiligen roten Fluorophor mittels PyMOL<sup>105</sup>

Zur Bestimmung des Abstandes zwischen DFHBI und dem jeweiligen roten, organischen Fluorophor für das RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment wurde die *Spinach*-DFHBI Struktur (pdb: 4ts2) in PyMOL<sup>105</sup> geladen. Anschließend wurde der Abstand zwischen DFHBI und dem 3'-Ende oder A71 von *Spinach* gemessen.

Zur Bestimmung des Abstandes zwischen DFHBI und TF3 für das RNA-Protein Interaktionsexperiment wurde mittels PyMOL<sup>105</sup> eine Hybridstruktur aus den Strukturen von *Spinach*-DFHBI (pdb: 4ts2) und PP7-pp7 (pdb: 2qux) erstellt und anschließend der Abstand von DFHBI zu A22C, A62C und N93C gemessen.

#### 3.2.4.2. Bestimmung des Überlappungsintegrals von Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektren mittels *ale*<sup>103</sup>

Das Überlappungsintegral  $J(\lambda)$  von dem Akzeptorabsorptionsspektrum und dem Donoremissionsspektrum wurde mit der Software *ale*<sup>103</sup> nach Formel 9 (Kapitel 1.2.3) berechnet. Dazu wurden die jeweiligen Spektren in das Programm geladen und die Akzeptorabsorptionsspektren auf den Extinktionskoeffizienten normalisiert. Das Donoremissionsspektrum wurde für die anschließende Berechnung von  $J(\lambda)$  auf 1 normalisiert.

#### 3.2.4.3. Berechnung des Försterabstandes mittels des *Förster Distance Calculators*<sup>104</sup>

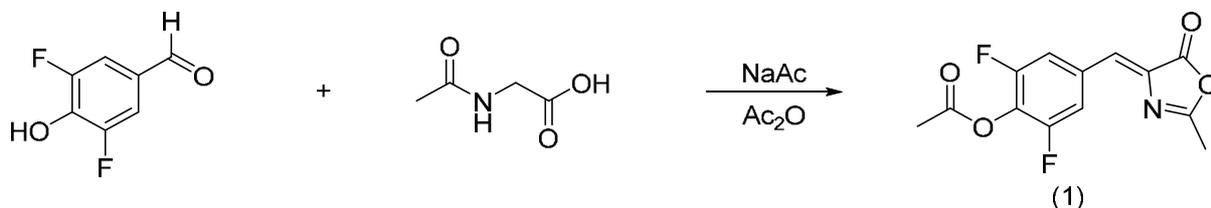
Der Försterabstand  $R_0$  wurde mit Hilfe des *Förster Distance Calculators*<sup>104</sup> (Kapitel 3.1.12) berechnet. Dazu wurden das zuvor gemessene Akzeptorabsorptionsspektrum (Kapitel 3.2.3.2) und Donoremissionsspektrum (Kapitel 3.2.3.1) in das Programm geladen und die Orientierung der Fluorophore zueinander ( $\kappa^2 = 2/3$ ), der Brechungsindex für wässrige Lösungen ( $n = 1.33$ ), die Donorquantenausbeute sowie der Extinktionskoeffizient des Akzeptors angegeben. Daraufhin konnte das Programm  $R_0$  nach Formel 11 (Kapitel 1.2.3) berechnen.

#### 3.2.4.4. Berechnung des Abstandes zwischen DFHBI und dem jeweiligen roten Fluorophor mittels des *FRET Distance Calculators*<sup>106</sup>

Für die Berechnung des Abstandes zwischen DFHBI und dem jeweiligen Fluorophor wurde das *Onlinetool FRET Distance Calculator*<sup>106</sup> (Kapitel 3.2.4.4) verwendet. Dazu wurden Angaben zu der jeweiligen gemessenen Quencheffizienz und des  $R_0$  (Kapitel 3.2.4.3) gemacht.

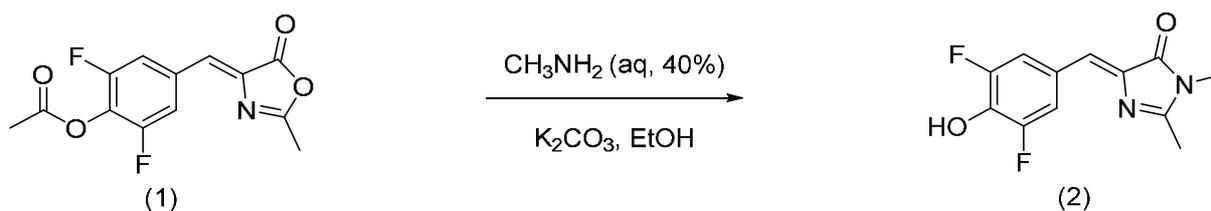
### 3.2.5. Chemisch-synthetische Methoden

#### 3.2.5.1. Synthese von (Z)-2,6-Difluoro-4-((2-Methyl-5-Oxooxazol-4(5H)-yliden)methyl)Phenylacetat (1)



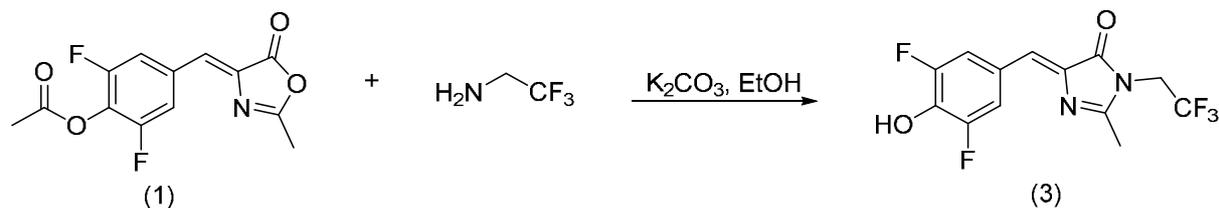
Je 1 äq. 4-Hydroxy-3,5-difluorobenzaldehyd (667 mg, 5,7 mmol), N-Acetylglycin (467 mg, 5,7 mmol) und trockenes Natriumacetat (900 mg, 5,7 mmol) wurden in 2,1 ml Essigsäureanhydrid gelöst und für 2 h bei 110°C unter Rückfluss gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt war, wurden 20 ml eiskalter Ethanol zugegeben und die Reaktion über Nacht bei 4°C gerührt. Der resultierende gelbe Feststoff wurde anschließend nacheinander mit kaltem Ethanol, heißem Wasser und Petrolether gewaschen. Die Ausbeute lag mit 909 mg bei 17 % (282,3 g/mol [M+H]<sup>+</sup>).

#### 3.2.5.2. Synthese von (Z)-5-(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden)-2,3-Dimethyl-3,5-Dihydro-4H-Imidazol-4-on (2)



(Z)-2,6-difluoro-4-((2-methyl-5-oxooxazol-4(5H)-yliden)methyl)phenylacetat (1) (500 mg, 1,78 mmol) wurde mit Ethanol (7,5 ml), 40 %igem wässrigen Methylamin (0,5 ml) und Kaliumcarbonat (350 mg) unter Rückfluss für 3 h erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf RT abgekühlt und der erhaltene orangene Feststoff in einem 1:1 Gemisch aus Ethylacetat und Natriumacetat (500 mM, pH = 3) gelöst. Nach Abtrennung und Trocknung der organischen Phase wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck verdampft, der Feststoff in Dichlormethan gelöst und chromatographisch über Silica gereinigt. DFHBI (2) wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 51,3 % (253,08 g/mol [M+H]<sup>+</sup>) erhalten. Für die weitere Verwendung wurde eine 20 mM Stocklösung in DMSO hergestellt.

3.2.5.3. Synthese von (*Z*)-5-(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden)-2-Methyl-3-(2,2,2-Trifluorethyl)-3,5-Dihydro-4*H*-Imidazol-4-on (DFHBI-1T) (3)



(*Z*)-2,6-difluoro-4-((2-methyl-5-oxooxazol-4(5*H*)-ylidene)methyl)phenylacetat (1) (305 mg, 1 mmol) wurde in Ethanol (1 ml) gelöst und Kaliumcarbonat (223 mg, 1,5 mmol) sowie weitere 1,6 ml Ethanol wurden unter Rühren hinzugegeben. 2,2,2-Trifluoroethylamin (130  $\mu$ l, 1,5 mmol) wurden unter ständigem Rühren sukzessive zum Gemisch gegeben. Die Reaktion wurde für 10 Min. bei RT gerührt und anschließend für 4 h bei 85°C unter Rückfluss erhitzt. Der entstandene orangene Feststoff wurde getrocknet, in Dichlormethan aufgenommen und chromatographisch über Silica gereinigt. Die Ausbeute betrug mit 29,64 mg 9,26 % (321 g/mol [M+H]<sup>+</sup>, 343 g/mol [M+Na]<sup>+</sup>). Für die weitere Verwendung wurde eine 20 mM Stocklösung in DMSO hergestellt.

## 4. Ergebnisse

Die *Spinach*-RNA wird bereits als Fluoreszenzmarkierung von RNA verwendet, wobei ihr Einsatz im Rahmen eines FRET-Systems noch nicht untersucht wurde. FRET stellt eine gängige Methode für die Analyse z. B. von Protein-Protein-Interaktionen dar.<sup>56,57</sup> Ziel dieser Arbeit ist es, dieses System für RNA-Protein-Interaktionen (RPIs) unter Einbeziehung der *Spinach*-RNA zu etablieren. Es handelt sich bei der *Spinach*-RNA um ein Aptamer, welches spezifisch das kleine Molekül DFHBI bindet und daraufhin dessen Fluoreszenz signifikant steigert. DFHBI ist dabei nicht-toxisch und zellpermeabel.<sup>98</sup> Die entwickelten Fluoreszenzeigenschaften des *Spinach*-DFHBI-Komplexes (im Folgenden weiter als „*Spinach*“ bezeichnet) sind ähnlich zu denen von GFP (Kapitel 1.3.1). Das Emissionsmaximum wurde mit 506 nm und das Anregungsmaximum mit 462 nm bestimmt. Für die Entwicklung dieses FRET-Systems ist es notwendig, dass die *Spinach*-RNA in näherer Umgebung eines weiteren Fluorophors ihre Fluoreszenzintensität signifikant ändert. Im Folgenden wurden die Eigenschaften der gereinigten *Spinach*-RNA und die Fluoreszenz dieser in unmittelbarer Nähe eines weiteren Fluorophors *in vitro* charakterisiert.

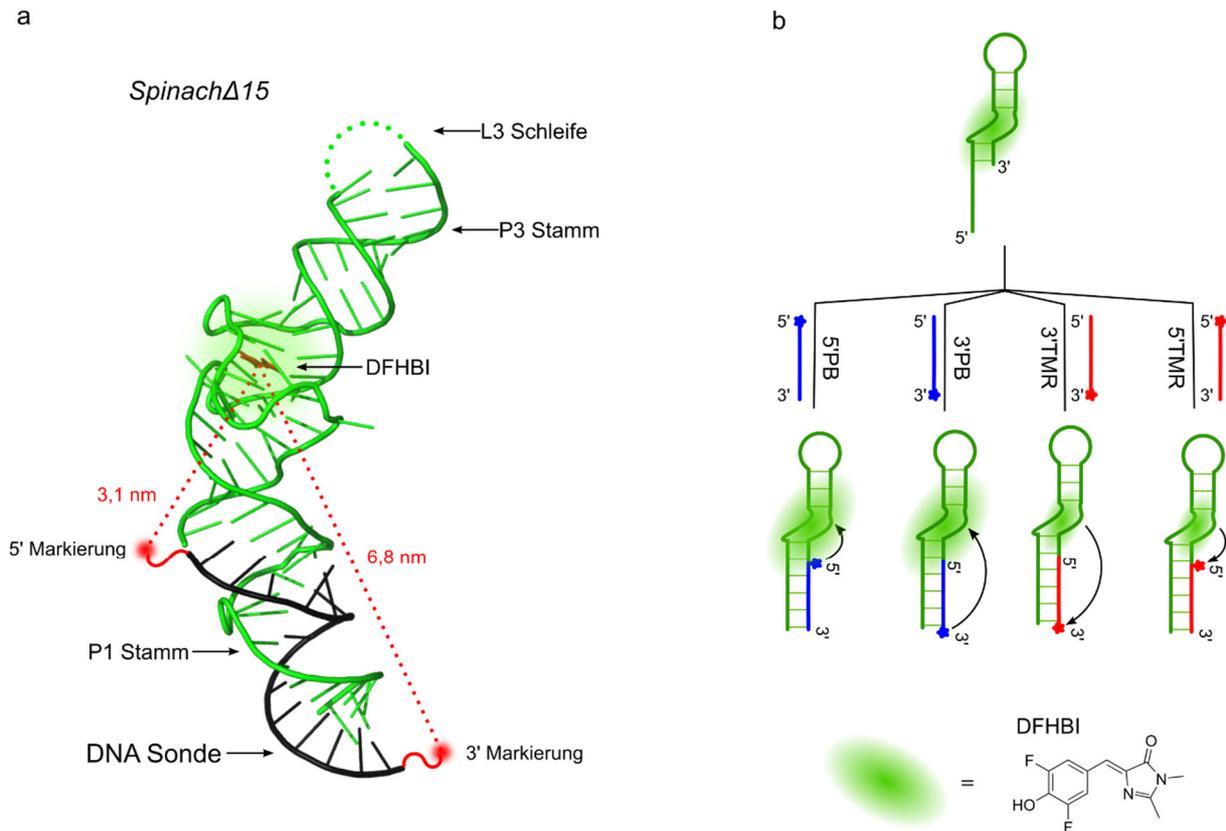
### 4.1. Die *Spinach*-RNA als FRET-Donor und FRET-Akzeptor

Zunächst wurde untersucht, wie sich die *Spinach*-Fluoreszenz unter FRET-Bedingungen in der Nähe geeigneter Fluorophore ändert. Dazu wurde ein Experiment aufgebaut, das über eine RNA-DNA-Hybridisierung spezifisch einen roten oder blauen Fluorophor in die Nähe der *Spinach*-RNA brachte.

#### 4.1.1. Aufbau des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments

Für das RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment wurde der P1 Stamm der initial veröffentlichten *Spinach*-Sequenz<sup>65</sup> am 3'-Ende um 15 Nukleotide (nt) verkürzt; um dadurch ein zugängliches 5'-Ende der RNA zu erzeugen (Abbildung 13 a). Die Verkürzung des P1-Stammes der *Spinach*-RNA wurde bereits zuvor vorgenommen und zeigte keine Veränderung der Fluoreszenz der *Spinach*-RNA Komplexes.<sup>83</sup> Das RNA-Konstrukt wurde *Spinach* $\Delta$ 15 genannt. Im Anschluss wurde eine DNA-Sonde designt, die komplementär zu dem einzelsträngigen 5'-Ende der *Spinach* $\Delta$ 15-RNA ist. Dadurch sollte eine spezifische Bindung an *Spinach* $\Delta$ 15 gewährleistet werden. Diese komplementären DNA-Sonden wurden am 5'- bzw. am 3'-Ende mit verschiedenen Fluorophoren markiert. Durch die verschiedenen

Markierungsstellen wurden unterschiedliche Abstände zum *Spinach*-Chromophor DFHBI erzeugt. Anhand des in PyMOL<sup>105</sup> erstellten Modells konnte der Abstand im Fall der 5'-markierten Sonde mit 3,1 nm und im Fall der 3'-markierten Sonde mit 6,8 nm gemessen werden (Abbildung 13 a).



**Abbildung 13:** Der Aufbau des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments. (a) Strukturelle Darstellung des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments. *Spinach-wt* wurde am 3'-Ende um 15 Nukleotide verkürzt, sodass ein freies 5'-Ende der *Spinach*-RNA generiert wurde (*Spinach* $\Delta$ 15, grün). Eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde (schwarz), komplementär zum verbleibenden freien 5'-Ende der RNA, wurde anschließend entworfen. Je nachdem, ob sich die Fluoreszenzmarkierung dieser Sonde am 5'- oder 3'-Ende befindet wurden verschiedene Distanzen (rot) zu DFHBI generiert. Diese Distanzen wurden mit Hilfe von PyMOL<sup>105</sup> gemessen. (b) Die DNA-Sonden wurden mit verschiedenen Fluorophoren markiert, um die Eigenschaften der *Spinach*-RNA als FRET-Donor und FRET-Akzeptor zu untersuchen. Als Akzeptor dienten rote Fluorophore wie z. B. 5-Carboxytetramethylrhodamin (TMR, rot) und als Donor das blaue Fluorophor *Pacific Blue* (PB, blau). Der schwarze Pfeil indiziert die Richtung des Energietransfers.

Durch die Fluoreszenzmarkierung der DNA-Sonde mit den verschiedenen roten Fluorophoren 5-Carboxytetramethylrhodamin (TMR), 6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein (JOE), *Rhodamine Red* (RHO), Cyanin 3 (Cy3) oder dem blauen Fluorophor *Pacific Blue* (PB) wurde die Rolle der *Spinach*-RNA als FRET-Donor und FRET-Akzeptor untersucht. In dem Fall, dass das eingebrachte Fluorophor als Akzeptors dient, wird die Energie von *Spinach* $\Delta$ 15 auf diesen übertragen. In der Folge sollte die Fluoreszenz von *Spinach* $\Delta$ 15 abnehmen und die Fluoreszenz des roten Akzeptors, z. B. TMR zunehmen (Abbildung 13 b). *Spinach* $\Delta$ 15 fungiert dagegen in der Nähe eines energiereicheren Donors, z. B. PB, selber als

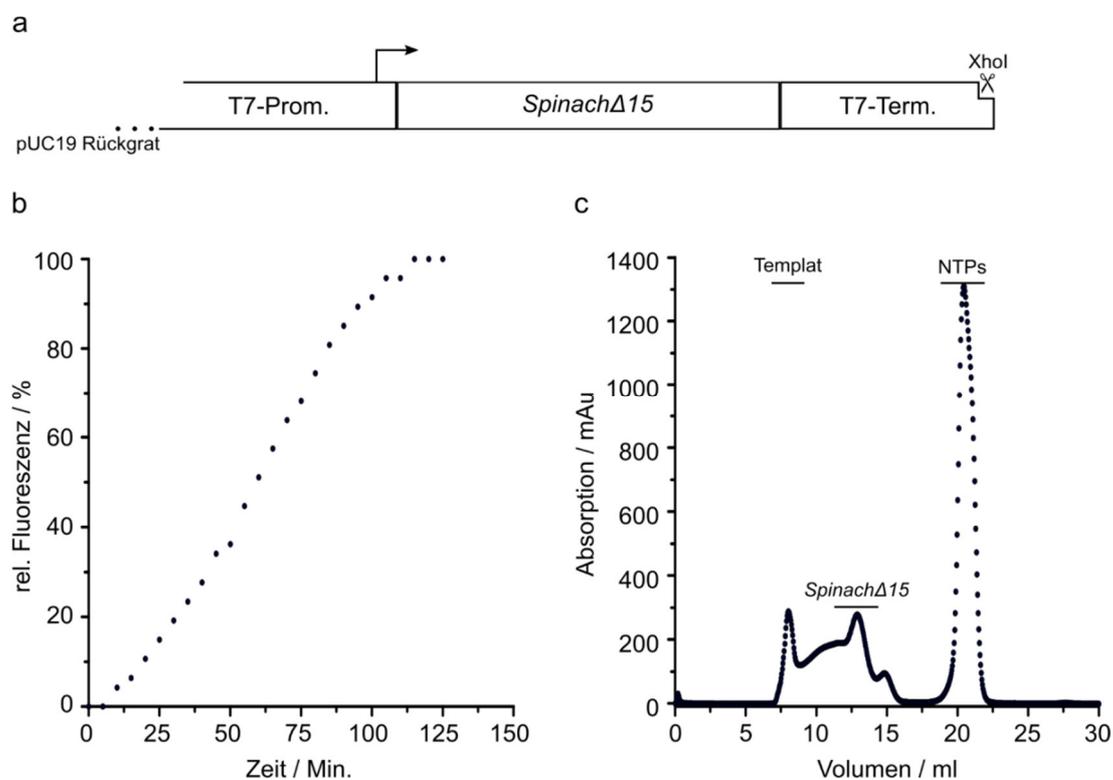
Akzeptor. Dadurch sollte die Fluoreszenz des organischen Fluorophors PB abnehmen und die Fluoreszenz von *Spinach* $\Delta$ 15 durch FRET zunehmen.

#### 4.1.2. Vorbereitungen für das RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment

Um das zuvor beschriebene RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment experimentell durchführen zu können, wurde zunächst *Spinach* $\Delta$ 15 kloniert, *in vitro* transkribiert und gereinigt. Anschließend konnte *Spinach* $\Delta$ 15 hinsichtlich der Fluoreszenzentwicklung im Komplex mit DFHBI und DFHBI-1T charakterisiert und die Bindungseigenschaften zu dem jeweiligen Chromophor analysiert werden. Die Fluorophore, die als FRET-Partner in diesem Experiment dienten, wurden zudem zuvor hinsichtlich der Erfüllung der Eigenschaften für einen effizienten FRET untersucht.

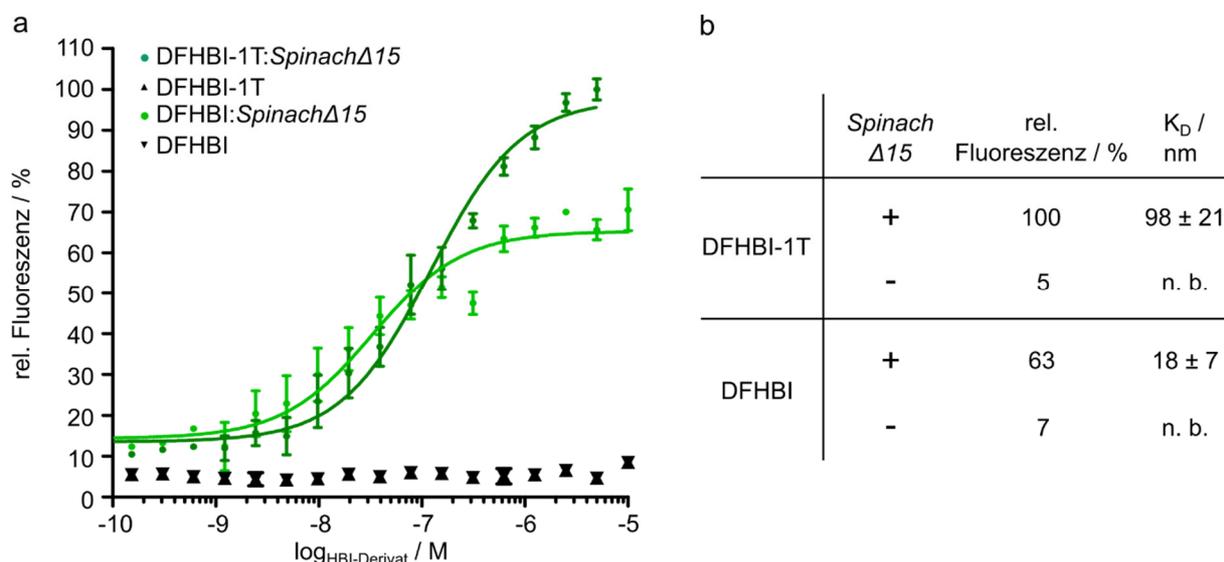
##### 4.1.2.1. Charakterisierung von *Spinach* $\Delta$ 15

Zunächst sollte die *Spinach* $\Delta$ 15-RNA über eine *In-vitro*-Transkription synthetisiert werden. Dazu wurde ein Template benötigt, welches von dem T7-Promotor und dem T7-Terminator flankiert ist (Abbildung 14 a).



**Abbildung 14:** *In-vitro*-Transkription und Reinigung von *Spinach* $\Delta$ 15. (a) Schematische Darstellung des Templates, das für die *In-vitro*-Transkription von *Spinach* $\Delta$ 15 genutzt wurde. Der schwarze Pfeil deutet den Start der Transkription an. (b) Zeitabhängige Messung der Fluoreszenzentwicklung von *Spinach* $\Delta$ 15 während der *In-vitro*-Transkription in Anwesenheit von 50  $\mu$ M DFHBI bei 37°C. Die Fluoreszenz wurde bei 462 nm angeregt und bei 506 nm Emissionswellenlänge ausgelesen. (c) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von *Spinach* $\Delta$ 15 über eine S75 10 / 300 Sepharose Matrix.

Das Konstrukt wurde in einen pUC19 Vektor kloniert, da es sich dabei um ein *high copy* Plasmid handelt, sodass für die *In-vitro-Transkription* schnell und effektiv Template generiert werden konnte. Da der T7-Terminator die Transkription nur zu ca. 80 % tatsächlich beendet<sup>108</sup>, wurde das pUC19-Rückgrat direkt hinter dem Terminator mit dem Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert. Dadurch wird die RNA-Synthese gestoppt, da die T7-RNA-Polymerase spätestens an dieser Stelle von dem Template dissoziiert. Die *In-vitro-Transkription* wurde wie in Kapitel 3.2.1.11 beschrieben durchgeführt und über die Fluoreszenzentwicklung von *Spinach* $\Delta$ 15 mit 50  $\mu$ M DFHBI verfolgt (Abbildung 14 b). Diese zeigte einen stetigen Anstieg der Fluoreszenz von *Spinach* $\Delta$ 15 bis zu 115 Min. Reaktionszeit und erreicht im weiteren zeitlichen Verlauf eine Sättigung. Das Transkriptionsgemisch wurde zur Reinigung des RNA-Produktes über eine Größenausschlusschromatographie getrennt (Abbildung 14 c). Dabei konnte mit Hilfe von Referenzläufen das Retentionsvolumen des DNA-Templates mit 8,0 ml, das von *Spinach* $\Delta$ 15 mit 12,8 ml und das Retentionsvolumen der freien NTPs mit 20,4 ml identifiziert werden. Die Ausbeute relativ zur eingesetzten Menge NTPs betrug 17,4 %. Im Anschluss wurde die gereinigte RNA *Spinach* $\Delta$ 15 mit ansteigenden Konzentrationen DFHBI bzw. DFHBI-1T titriert. Hier zeigten 50  $\mu$ M DFHBI-1T eine höhere Fluoreszenz im Komplex mit *Spinach* $\Delta$ 15 als mit DFHBI (Abbildung 15 a).



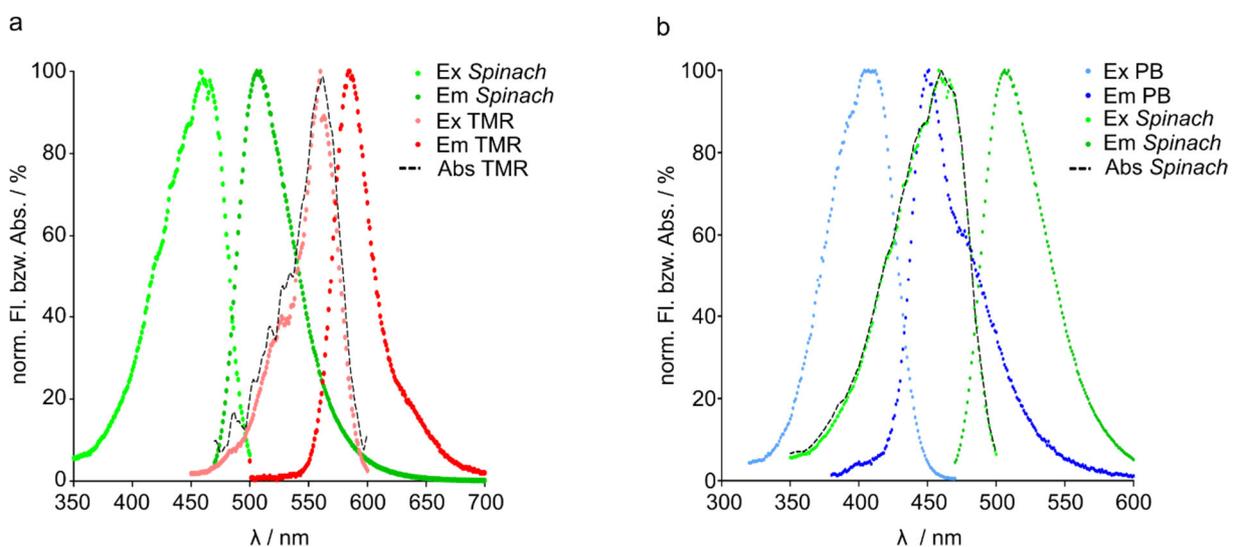
**Abbildung 15:** Charakterisierung von *Spinach* $\Delta$ 15. (a) Titration von *Spinach* $\Delta$ 15 RNA mit steigenden Konzentrationen DFHBI bzw. DFHBI-1T. Die Fluoreszenz wurde bei 462 nm Anregungswellenlänge und 506 nm Emissionswellenlänge bestimmt. Zur Kontrolle wurde DFHBI bzw. DFHBI-1T zu Puffer titriert. (b) Vergleichende Darstellung der relativen, normalisierten Fluoreszenz und der ermittelten K<sub>D</sub>-Werte von *Spinach* $\Delta$ 15 in Anwesenheit von 50  $\mu$ M DFHBI und DFHBI-1T.

Normalisiert auf die höchste Fluoreszenzintensität zeigte 1  $\mu$ M *Spinach* $\Delta$ 15 in Komplex mit 50  $\mu$ M DFHBI 63 % Fluoreszenzentwicklung im Vergleich zu DFHBI-1T. Im Vergleich zu *Spinach* $\Delta$ 15:DFHBI-1T weisen DFHBI und DFHBI-1T nur eine geringe Autofluoreszenz von

7 % und 5 % auf. Die Affinität von DFHBI zur RNA wurde mit 18 nM und die von DFHBI-1T mit 98 nM bestimmt (Abbildung 15 b).

#### 4.1.2.2. Wahl der FRET-Partner

Neben der Voraussetzung, dass beide Fluorophore einen maximalen Abstand von 10 nm haben und ihre Dipole nicht anti-parallel ausgerichtet sind, ist eine weitere Bedingung für strahlungslosen Energietransfer, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt.<sup>56,57</sup> Um sogenanntes *Crosstalk* bzw. *Bleedthrough* zu vermeiden, sollten die jeweiligen Anregungsspektren bzw. die Emissionsspektren beider Fluorophore nicht überlappen.<sup>109</sup> Zur Überprüfung dieser Eigenschaften wurden die Spektren von verschiedenen roten bzw. blauen Fluorophoren und der *Spinach*-RNA gemessen und überlagert. Als rote Fluorophore wurden TMR (Abbildung 16 a), JOE, RHO und Cy3 (Anhang Abbildung 40 a–c) gewählt. Diese fungierten als Akzeptor und sollten innerhalb einer FRET-basierten Analyse Energie auf *Spinach $\Delta$ 15 als Donor übertragen. Als blauer Fluorophor dagegen wurde PB hinsichtlich der Eigenschaften als Donor innerhalb eines FRET-Experiments mit *Spinach $\Delta$ 15 untersucht (Abbildung 16 b).**



**Abbildung 16:** Spektrale Eigenschaften von *Spinach*, TMR und PB. (a) Anregungs- (Ex)- und Emissionsspektren (Em) von *Spinach* und TMR. (b) Anregungs- und Emissionsspektrum von *Spinach* und PB. Zusätzlich wurden die Absorptionsspektren des jeweiligen Akzeptors dargestellt (Abs).

Das Anregungsmaximum von *Spinach* im Komplex mit DFHBI lag bei 462 nm und das Emissionsmaximum bei 506 nm. Die roten Fluorophore hatten Anregungsmaxima von 528 nm bis 574 nm und Emissionsmaxima von 558 nm bis 596 nm (Kapitel 11.5). Der blaue Fluorophor dagegen hatte ein Anregungsmaximum von 410 nm und ein Emissionsmaximum, das bei 455 nm lag. Die Überlappung des Emissionsspektrums von *Spinach* mit dem jeweiligen Absorptionsspektrum der roten Fluorophore wurde mit der Software ale<sup>103</sup> unter

Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Akzeptoren berechnet. Die Kalkulationen der Überlappungsintegrale lag für die roten Fluorophore zwischen  $2,3 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  und  $5,8 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Tabelle 28). Weiterhin wurde festgestellt, dass bei dem Anregungsmaximum 462 nm von *Spinach*-DFHBI nur ein geringer Prozentsatz des roten Fluorophors gleichzeitig angeregt wird. Ebenfalls wird bei 506 nm hauptsächlich die Emission von *Spinach*-DFHBI ausgelesen und nur ein geringer Teil der Emission des roten Fluorophors. Es war somit weder *Bleedthrough* noch *Crosstalk* zu erwarten. Die spektralen Eigenschaften von PB und *Spinach* erfüllen ebenfalls die Bedingungen für einen strahlungslosen Energietransfer. Das Emissionsspektrum des Donors PB überlappt mit  $6,8 \times 10^{14} \text{ nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors *Spinach* $\Delta 15$  (Abbildung 16 b, Tabelle 28).

**Tabelle 28:** Aus den Spektrenmessungen konnte das Überlappungsintegral des jeweiligen Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrum bestimmt werden. Zudem konnte daraus der Förster-Radius mit Hilfe des *Förster Distance Calculators*<sup>104</sup> (Kapitel 3.1.12) errechnet werden. Abkürzungen: D = Donor, A = Akzeptor,  $\epsilon_A$  = Extinktionskoeffizient des Akzeptors<sup>65,110-113</sup> in  $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $Q_A$  = Quantenausbeute des Akzeptors,  $Q_D$  = Quantenausbeute des Donors, E = ermittelte FRET Effizienz,  $J(\lambda)$  = Überlappung des Donoremissionsspektrums mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum in  $\text{nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (berechnet mit  $ale^{103}$ , Kapitel 3.1.12),  $R_0$  = Förster-Radius. Weitere zur Berechnung verwendete Parameter: Brechungsindex  $n = 1,33$  und Orientierungsfaktor  $\kappa^2 = 2/3$ .

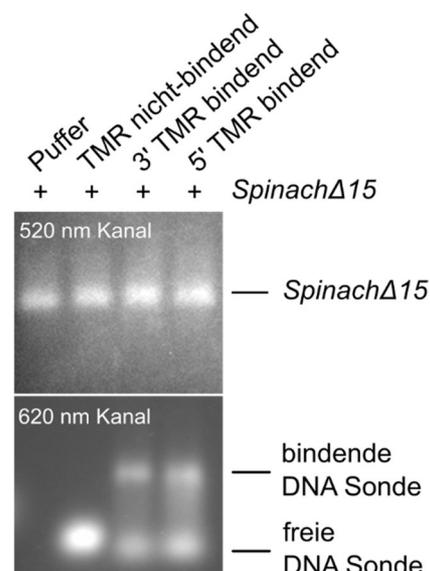
D	A	$\epsilon_A /$ $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$Q_D$	$J(\lambda) /$ $\text{nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$	$R_0 / \text{nm}$
<i>Spinach</i> $\Delta 15$	TMR	91000	0,72	$2,87 \times 10^{15}$	5,8
<i>Spinach</i> $\Delta 15$	JOE	73000	0,72	$2,82 \times 10^{15}$	5,8
<i>Spinach</i> $\Delta 15$	RHO	129000	0,72	$2,33 \times 10^{15}$	5,6
<i>Spinach</i> $\Delta 15$	Cy3	150000	0,72	$5,82 \times 10^{15}$	6,5
<i>Pacific Blue</i>	<i>Spinach</i> $\Delta 15$	24271	0,78	$6,80 \times 10^{14}$	4,6

Da ebenfalls beide Anregungsspektren überlappen, wurde für die Messung der Donor-Fluoreszenzlöschung bei 350 nm angeregt anstatt bei dem Anregungsmaximum von 405 nm, um *Spinach* $\Delta 15$  nicht unspezifisch mit anzuregen. Die Emissionsspektren überlappen bei dem Emissionsmaximum von PB nicht, sodass kein *Crosstalk* zu erwarten war. Aus den bestimmten Überlappungsintegralen des jeweiligen Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrums konnte zudem der Förster-Abstand ermittelt werden. Diese

Berechnung wurde mit dem *Förster Distance Calculator*<sup>104</sup> (Kapitel 3.1.12) durchgeführt. Der Förster-Abstand beschreibt den Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt.<sup>56,57</sup> Den größten Förster-Radius zeigt *SpinachΔ15* mit 6,5 nm in Kombination mit Cy3. Die Förster-Radien der anderen roten Fluorophore in Kombination mit *SpinachΔ15* liegen im Bereich von 5,6–5,8 nm. Der Förster-Radius von PB in Kombination mit *SpinachΔ15* dagegen ist geringer als die der roten Fluorophore und konnte mit 4,6 nm bestimmt werden.

#### 4.1.2.3. Verifizierung der Hybridisierung der DNA-Sonde an *SpinachΔ15* über einen *RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay* (REMSA)

Ein effizienter FRET findet in einem Bereich von maximal 10 nm statt.<sup>56,57</sup> Diese Bedingung ist während des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments gegeben (Abbildung 13), vorausgesetzt die Hybridisierung zwischen der DNA-Sonde und *SpinachΔ15* findet statt. Darum wurde die Hybridisierung der DNA-Sonden an *SpinachΔ15* über einen *RNA-Electrophoretic Mobility Shift Assay* (REMSA) überprüft. Dazu wurden RNA und die jeweilige Sonde unter nicht-denaturierenden Bedingungen inkubiert und anschließend über ein Agarosegel gelelektrophoretisch getrennt. Das Agarosegel wurde anschließend mit DFHBI gefärbt und im *Spinach*-Kanal (520 nm) bzw. im Kanal für die roten Fluorophore (620 nm) wurden RNA und Sonde visualisiert. Als Beispiel ist hier die Hybridisierung zwischen *SpinachΔ15* und der 3' und 5' mit TMR markierten Sonde gezeigt (Abbildung 17).

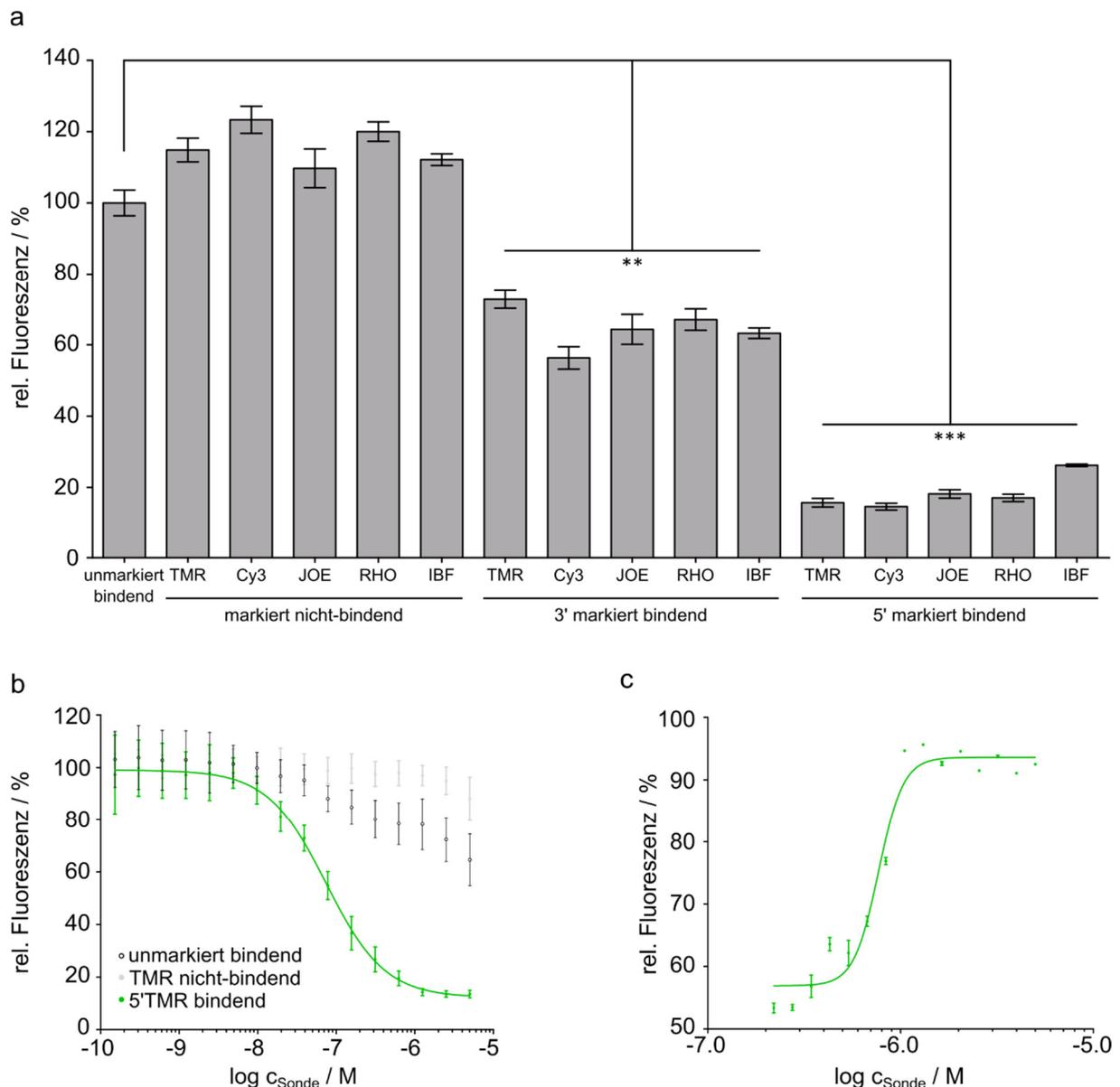


**Abbildung 17:** Verifizierung der Bindung von DNA-Sonde und *SpinachΔ15* mittels REMSA. Gelelektrophoretische Auftrennung von *SpinachΔ15* (250 nM) und der 5'- bzw. 3'-markierten DNA-Sonde (750 nM). Hier wurde die TMR-markierte DNA-Sonde als Beispiel gewählt. Das 2 %ige-Agarosegel wurde nach der Elektrophorese mit 5 μM DFHBI gefärbt und anschließend bei 520 nm (oben) und 620 nm (unten) aufgenommen.

Die Visualisierung der *Spinach* $\Delta 15$  RNA im 520 nm-Kanal zeigt jeweils eine einzelne Bande im Gel. Im 620 nm-Kanal können die mit TMR-markierten Sonden detektiert werden. Hierbei weist die nicht bindende Sonde eine Bande auf. Im Gegensatz dazu weisen die beiden Sonden, die am 5'- bzw. 3'-Ende TMR-markiert sind und an *Spinach* $\Delta 15$  binden, zwei Banden auf. Der Teil der Sonden, der langsamer durch das Gel migriert ist, erzeugt eine Bande auf Höhe von *Spinach* $\Delta 15$ , der Teil der schneller migriert ist, zeigt eine Bande auf Höhe der TMR nicht-bindend-Sonde. Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl 5'-TMR-bindend als auch 3'-TMR-bindend spezifisch mit *Spinach* $\Delta 15$  interagieren. Ähnliche Ergebnisse konnte mit den weiteren DNA-Sonden erzielt werden (Anhang Abbildung 41).

#### **4.1.3. Das FRET-basierte RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment unter Verwendung von *Spinach* $\Delta 15$**

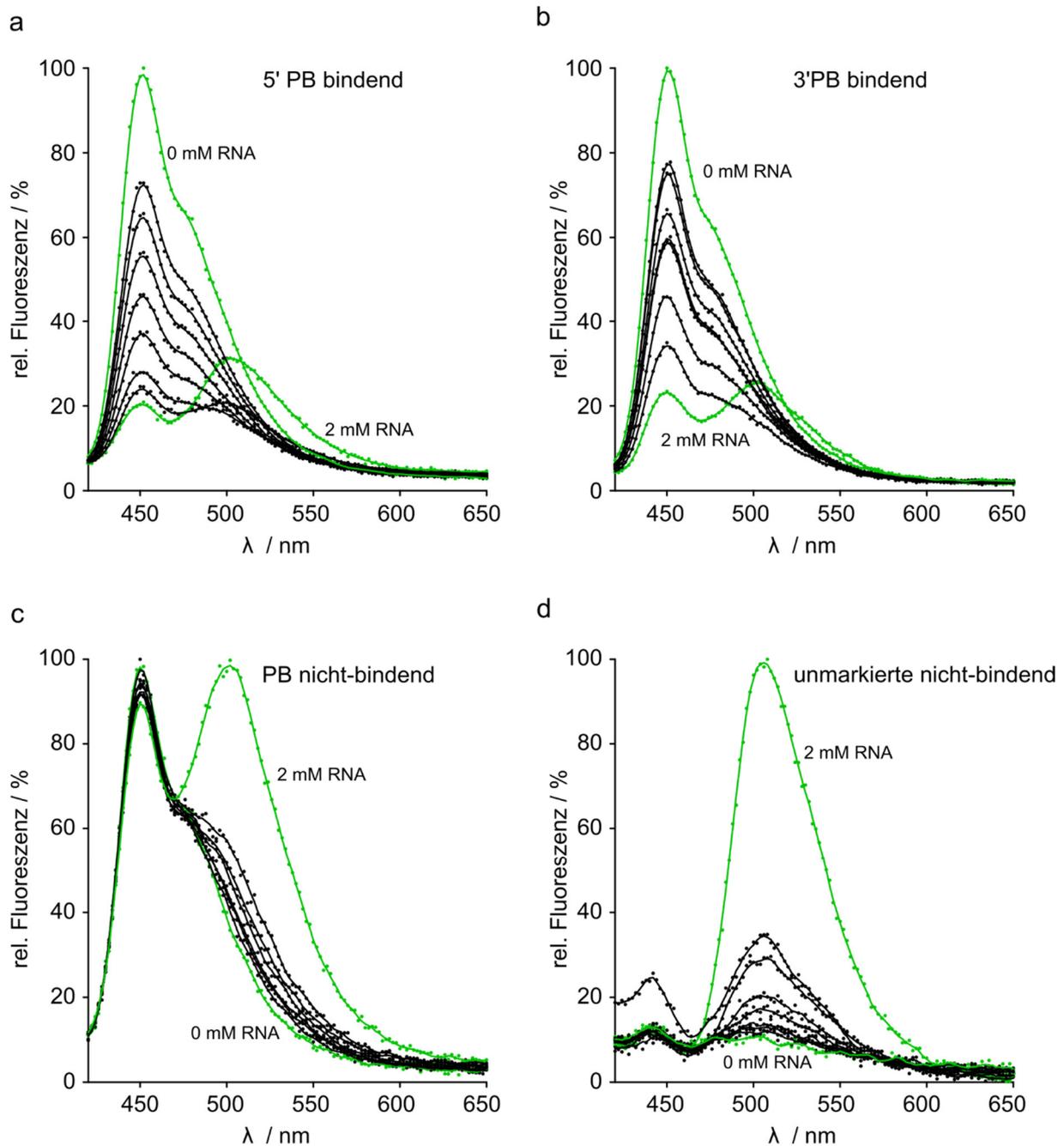
Es konnte gezeigt werden, dass über eine DNA-Sonde ein rot oder blau-fluoreszierender Farbstoff durch Hybridisierung an *Spinach* $\Delta 15$  in die Nähe des *Spinach*- Chromophors DFHBI gebracht werden kann. Die Fluorophore befinden sich gemessen an dem in PyMOL<sup>105</sup> erstellten Modell (Abbildung 13 a) in einem Abstand von <10 nm. Zunächst wurden die Fluoreszenzeigenschaften von *Spinach* $\Delta 15$  in der Nähe eines roten Fluorophors näher untersucht. Hier wurde *Spinach* $\Delta 15$  als Donor eingesetzt und das jeweilige rote Fluorophor der DNA-Sonden als Akzeptor. FRET äußert sich durch eine Abnahme der Donorfluoreszenz und einer Zunahme der Akzeptorfluoreszenz. Da eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz innerhalb dieses Experiments nicht detektiert werden konnte (Anhang Abbildung 43), wurde der Fokus auf die Abnahme der Donorfluoreszenz gelegt. Dazu wurde die *Spinach* $\Delta 15$  Fluoreszenz in Anwesenheit der verschieden markierten DNA-Sonden gemessen (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Quenching von *SpinachΔ15* über eine RNA-DNA-Hybridisierung. (a) Fluoreszenzlöschung von *SpinachΔ15* in Anwesenheit der 5'- oder 3'-fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden. Zum Vergleich wurde die *SpinachΔ15* Fluoreszenz nach Zugabe einer DNA-Sonde, die mit einem Quencher (*Iowa Black F* Quencher, IBFQ) modifiziert war, ebenfalls gemessen. Als Negativkontrollen dienten nicht bindende, fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden (grau), sowie eine bindende, nicht modifizierte DNA-Sonde. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . Daten sind als  $\pm$ SEM der Triplikate dargestellt. (b) Titration von *SpinachΔ15* mit steigenden Konzentrationen der 5'-markierten TMR-Sonde (hellgrün). Als Negativkontrollen dienten wiederum die nicht bindende, TMR modifizierte Sonde (grau), sowie die bindende, nicht fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde (schwarz). (c) Konkurrenz der TMR-Sonde mit einem komplementären, unmarkierten Oligonukleotid in steigender Konzentration.

Hier wurden zunächst die rot-fluoreszierend (TMR, JOE, RHO und Cy3) modifizierten Sonden näher untersucht (Abbildung 18 a). Zusätzlich zu diesen, wurden zum Vergleich ebenfalls Sonden mitgemessen, die nicht mit einem Fluorophor, sondern einem Quencher-molekül markiert waren (IBF-Sonden). Die *SpinachΔ15* Fluoreszenz, inkubiert in Anwesenheit der Negativkontrolle (bindende, nicht-markierten Sonde), wurde zur Normalisierung verwendet. Alle markierten, nicht-bindenden DNA-Sonden hatten eine

geringe Fluoreszenzsteigerung bei 506 nm zur Folge. Sowohl die 5'- als auch die 3'-markierten, bindenden DNA-Sonden konnten erfolgreich die *Spinach* $\Delta 15$  Fluoreszenz vermindern. Dabei zeigten die 3'-markierten bindenden DNA-Sonden einen Fluoreszenzlöschungseffekt von ca. 50 % und die 5'-markierten bindenden DNA-Sonden von ca. 85 % (Tabelle 29). Dieser war für alle bindenden, markierten Sonden signifikant. Zwischen den rot markierten DNA-Sonden und den IBF-Sonden war kein Unterschied in den Fluoreszenzlöschungseffekten auszumachen. Anschließend wurden die rot fluoreszierenden markierten DNA-Sonden zu *Spinach* $\Delta 15$  titriert. Es zeigte sich ein typischer, sigmoidaler Verlauf bei logarithmisch aufgetragenen Sondenkonzentrationen (Abbildung 18 b, Anhang Abbildung 41). Die nachfolgende Bestimmung der Affinitätskonstanten der DNA-Sonden an die *Spinach* $\Delta 15$  RNA ergaben eine ähnliche Affinität zu *Spinach* $\Delta 15$ , wobei die 3'-markierten Sonden eine leicht höhere Affinität aufwiesen (Tabelle 29). Die Reversibilität der Interaktion wurde durch Competition mit einer nicht-markierten DNA-Sonde überprüft, die komplementär zu der markierten-bindenden Sonde war. Diese konnte folgend nicht mehr an die *Spinach*-RNA binden und die initiale Fluoreszenz konnte bis zu 93 % regeneriert werden (Abbildung 18 c). Durch die spezifische Verminderung der Fluoreszenz von *Spinach* $\Delta 15$  in Anwesenheit von roten Fluorophoren konnte gezeigt werden, dass *Spinach* $\Delta 15$  als Donor innerhalb eines FRET-Systems genutzt werden kann. Daraus ergibt sich die Frage, ob *Spinach* $\Delta 15$  ebenfalls als Akzeptor in der Lage ist, die Fluoreszenz eines blauen Fluorophors zu vermindern. Dazu wurde das RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment und eine DNA-Sonde, die an ihrem 5'- bzw. 3'-Ende mit dem blauen Fluorophor PB modifiziert war, verwendet. Es wurden die Emissionsspektren von *Spinach* $\Delta 15$  und den PB markierten DNA-Sonden bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm aufgenommen (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Quenching von PB unter Verwendung des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments. (a–b) Emissionsspektren nach Zugabe von steigenden Konzentrationen *SpinachΔ15* RNA in Anwesenheit von 350 nM 5' (a) bzw. 3' (b) mit *Pacific Blue* modifizierten DNA-Sonden. (c–d) Als Negativkontrollen wurden die Emissionsspektren in Anwesenheit von 350 nM *Pacific Blue* markierter, nicht bindender DNA (c) und bindender, jedoch nicht markierter DNA (d) aufgenommen. Die jeweils höchste und niedrigste Konzentration von *SpinachΔ15* wurde markiert (grün). Die Anregungswellenlänge betrug 350 nm.

Die Fluoreszenz der 5'- bzw. 3'-PB DNA-Sonden wurden in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen *SpinachΔ15* spezifisch vermindert. Dabei war kein Unterschied zwischen der Fluoreszenzlöschungseffizienz der 5'- oder 3'-markierten Sonde zu erkennen. Die Fluoreszenz von *SpinachΔ15* lag für beide Sonden nach der Zugabe von 2 mM RNA bei ca. 20 % der initialen Fluoreszenz. Zur Kontrolle wurde *SpinachΔ15* zu einer nicht-bindenden,

jedoch PB markierten DNA-Sonde titriert, was keinen Einfluss auf die Fluoreszenz von PB hatte (Abbildung 19 c).

Die Abstände zwischen dem Chromophor DFHBI, das gebunden an *SpinachΔ15* vorliegt und dem jeweiligen Fluorophor wurden einerseits mit PyMOL<sup>105</sup> bestimmt ( $r^+$ , Kapitel 3.1.12) und andererseits über die FRET-Effizienz und dem Förster-Abstand mit dem *FRET Distance Calculator*<sup>106</sup> ( $r^*$ , Kapitel 3.2.4.4) berechnet (Tabelle 29).

**Tabelle 29:** Bestimmte Abstände der verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen zu DFHBI, Fluoreszenzlöschungseffizienzen und ermittelte Affinitätskonstanten der DNA-Sonden an *SpinachΔ15*. Die Daten sind auf *SpinachΔ15* Fluoreszenz ohne Zugabe einer DNA-Sonde normalisiert.  $r^+$  = mit PyMOL<sup>105</sup> bestimmter Abstand beider Fluorophore zueinander,  $r^*$  = mit *FRET Distance Calculator*<sup>106</sup> bestimmter Abstand beider Fluorophore zueinander, E = FRET-Effizienz,  $K_D$  = Dissoziationskonstante.

Fluorophore	Position	$r^+$ / nm	E / %	$K_D$ / nM	$r^*$ / nm
TMR	3'	6,8	49 ± 5	54 ± 21	5,8
	5'	3,1	86 ± 2	74 ± 14	4,3
JOE	3'	6,8	46 ± 5	41 ± 17	5,9
	5'	3,1	84 ± 3	74 ± 19	4,4
RHO	3'	6,8	43 ± 7	35 ± 18	5,9
	5'	3,1	86 ± 2	74 ± 21	4,1
Cy3	3'	6,8	60 ± 2	38 ± 25	6,1
	5'	3,1	87 ± 4	62 ± 15	4,8
PB	3'	6,8	77	n. b.	3,8
	5'	3,1	81	n. b.	3,6

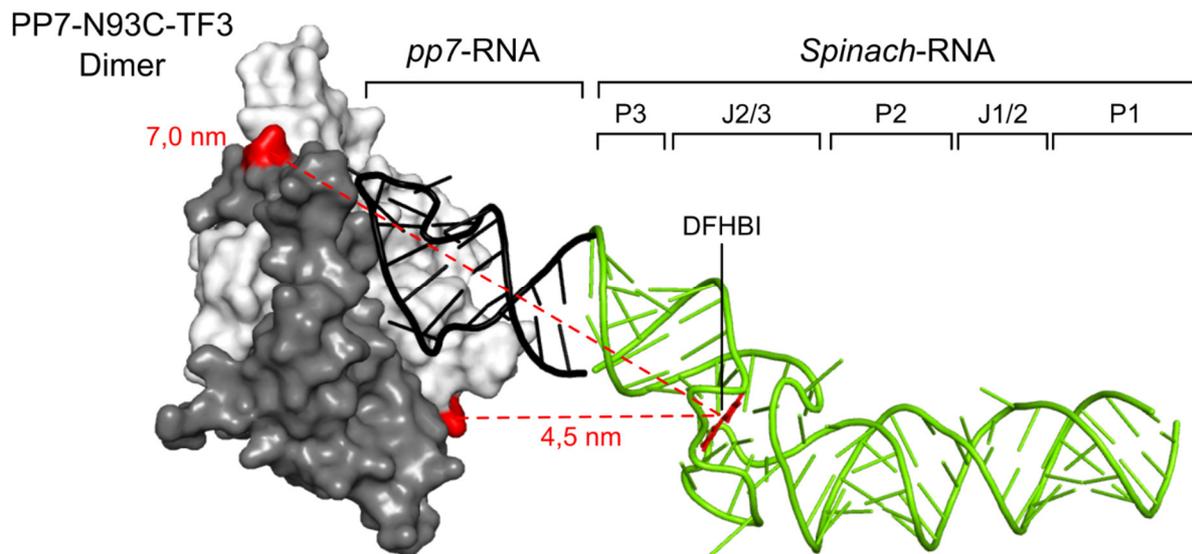
Wie erwartet, zeigten die roten Fluorophore, die am 5'-Ende der DNA-Sonden angeknüpft waren, konsistent einen geringeren Abstand zu DFHBI, als die Fluorophore, die am 3'-Ende der DNA-Sonden kovalent gebunden waren. Die PB markierten DNA-Sonden dagegen suggerierten einen ähnlichen Abstand zwischen beiden Fluorophoren, unabhängig von der Position der PB-Markierung.

## 4.2. Fluoreszenzlöschung der *Spinach*-RNA vermittelt über eine RNA-Protein-Interaktion

Das FRET-basierte RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment hat gezeigt, dass *Spinach* als Donor und Akzeptor fungieren kann. Im Anschluss wurde untersucht, ob ein FRET-Signal unter Verwendung von *Spinach* über eine RNA-Protein-Interaktion (RPI) detektiert werden kann. Dazu war es notwendig, eine RPI als Modellsystem zu wählen, die den Kriterien für FRET gerecht wird. Da zudem die Fluoreszenzlöschung des FRET-Donors *Spinach* durch FRET gut quantifizierbar war, wurde für diese Analyse ein roter Fluorophor als FRET-Akzeptor ausgewählt und *Spinach* diente als Donor (Kapitel 4.1.3).

### 4.2.1. Aufbau der RNA-Protein-Interaktionsanalyse

Für das FRET-basierte RPI-Experiment wurde die Interaktion zwischen dem *Pseudomonas Phage 7* Protein Dimer (PP7) mit der *pp7*-RNA Haarnadelschleife (*pp7*) als Modellsystem genutzt. Um zu verhindern, dass das PP7-Protein Dimer höhere Oligomere ausbildet, wurde die Mutante PP7 $\Delta$ FG verwendet (Kapitel 1.1.2). Der FG Bereich des Proteins enthält die Cysteine, die verantwortlich für die Oligomerisierung sind und ist in PP7 $\Delta$ FG deletiert.<sup>55</sup> Diese Interaktion eignet sich als Modellsystem, da die Dissoziationskonstante der Bindung von PP7 $\Delta$ FG (Anhang Abbildung 39) und der 25 nt langen *pp7*-Haarnadelschleife im unteren nanomolaren Bereich liegt. Liegen beide Biomoleküle fluoreszenzmarkiert vor, kann durch die Bindung ein FRET-Signal erzeugt werden. Dazu wurde PP7 $\Delta$ FG mit dem roten Fluorophor TF3 und die *pp7*-RNA mit *Spinach* markiert. Zur Einführung der TF3 Markierung wurden drei Punktmutanten kloniert. Diese enthielten an je einer Stelle ein Cystein, das wiederum nicht zu einer Oligomerisierung von PP7 $\Delta$ FG führt. Die resultierenden Mutanten PP7-A22C, PP7-A62C und PP7-N93C konnten anschließend über eine Michael-Addition mit einem TF3-Maleimid markiert werden (Kapitel 3.2.2). Dabei enthält jede der drei Mutanten durch die dimere Struktur von PP7 $\Delta$ FG zwei Fluoreszenzmarkierungen (Abbildung 20).



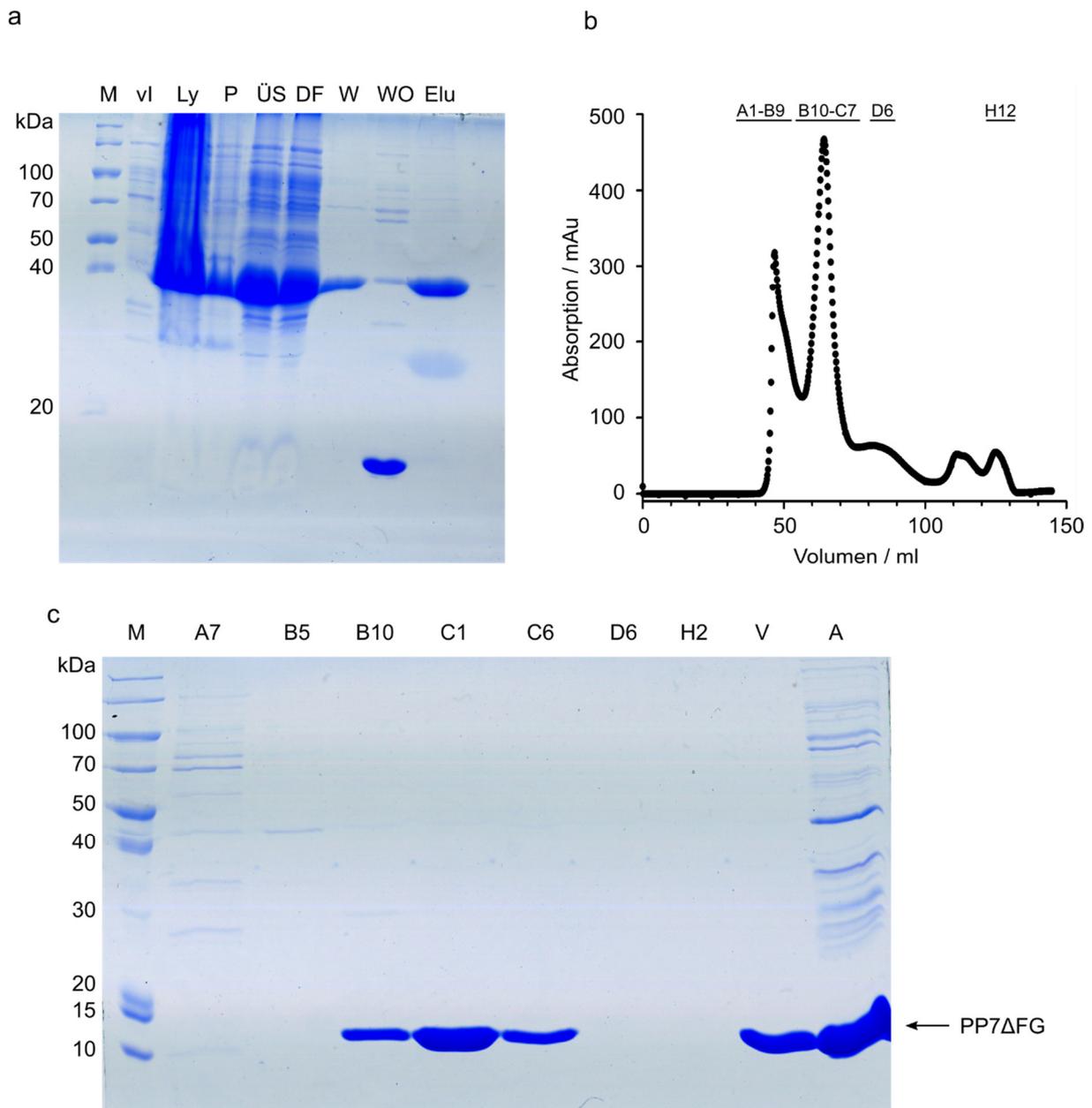
**Abbildung 20:** Schematische Darstellung des designten Quenching-Komplexes für die Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* über die PP7-*pp7*-Interaktion. Beispielhaft wurde hier die Interaktion von *Spinach-pp7* mit der Mutante PP7-N93C gezeigt. Das RNA-Konstrukt besteht aus der *pp7*-RNA (schwarz), die auf den P3 Stamm von *Spinach-wt* (grün) fusioniert wurde. Die Positionen 93 (rot) des PP7-Protein Dimers (weiß und grau) befinden sich in einem theoretischen Abstand von 4,5 nm bzw. 7,0 nm zu DFHBI. Die hier gezeigten Interaktionen wurden mit Hilfe der PDB Codes 2qux (*pp7*:PP7 $\Delta$ FG) und 4ts2 (*Spinach*-DFHBI) dargestellt. Die Distanzmessung wurde mit PyMOL<sup>105</sup> durchgeführt.

Die *pp7*-RNA ist fluoreszent mit *Spinach* markiert, indem die *pp7*-RNA in den P3 Stamm von *Spinach* integriert vorliegt. Dieses Konstrukt wurde *Spinach-pp7* genannt. Durch die Bindung von RNA und Protein, die beide fluoreszent markiert vorliegen, werden beide Fluorophore in unmittelbare Nähe zueinander gebracht. Dadurch sollte eine Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* erreicht werden. Es wurden innerhalb eines Proteindimers durch beide TF3-Moleküle unterschiedliche Abstände zu DFHBI erzeugt. Im Falle von PP7-N93C wurde der Abstand des näher liegenden TF3-Fluorophors mit Hilfe von PyMOL<sup>105</sup> mit 4,5 nm bestimmt, während der weiter entfernte Fluorophor einen Abstand von 7,0 nm hat. Zudem wurden die verschiedenen Proteinmutanten PP7-A22C, PP7-A62C und PP7-N93C getestet, die untereinander verschiedene Abstände zu DFHBI aufweisen (Anhang Abbildung 42).

#### 4.2.2. Vorbereitungen für die RNA-Protein-Interaktionsanalyse

##### 4.2.2.1. Expression, Reinigung und Markierung der PP7 $\Delta$ FG-Proteine

Für die Untersuchung der Fluoreszenzlöschungseigenschaften der *Spinach*-RNA, erzeugt über die bekannte PP7 $\Delta$ FG-*pp7* Interaktion, wurden verschiedene, gereinigte Varianten des PP7 $\Delta$ FG Proteindimers benötigt. Beispielhaft wird hier die Expression und Reinigung von PP7 $\Delta$ FG gezeigt (Abbildung 21).



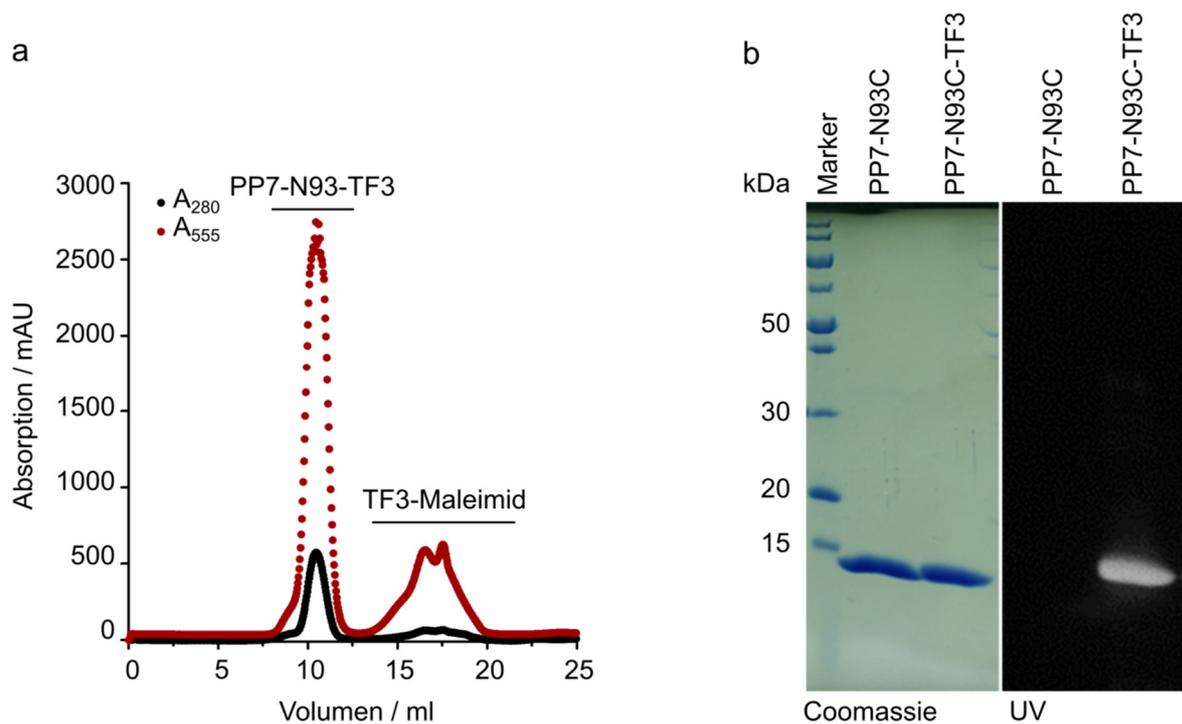
**Abbildung 21:** Reinigung von PP7 $\Delta$ FG über GST-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie. a) 15 %iges SDS-Gel der Expression und GST-Affinitätschromatographie von PP7 $\Delta$ FG. M = Marker, vI = vor Induktion, Ly = Lysat, P = Pellet, ÜS = Überstand, DF = Durchfluss, W = Waschfraktion, WO = Elution von der GSH-Matrix nach vorherigem *PreScission* Verdau, Elu = Elution mit freiem GSH. b) Größenausschlusschromatographie von PP7 $\Delta$ FG über eine Sepharose 16 / 60 S75 Matrix. c) 15 %ige SDS-Gelelektrophorese der Größenausschlusschromatographie-Fractionen. A7–H2 = Fractionen der Größenausschlusschromatographie, V = vereinte, reine Fractionen, A = Auftrag auf die Sepharose-Matrix.

Das Protein wurde als GST-Fusion in *E. coli* BL21(DE3) Bakterien wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben exprimiert. Dabei wurde im Konstruktdesign zwischen GST und PP7 $\Delta$ FG eine *PreScission*-Protease Erkennungsstelle berücksichtigt. Die Expression des GST-PP7 $\Delta$ FG wurde durch die Probenahme vor der Induktion (vI) und nach der Lyse (Ly) mittels SDS-Gel verfolgt (Abbildung 21 a). Hierbei konnte eine Überexpression des Fusionsproteins anhand der Bande bei 40 kDa beobachtet werden. Nach dem Zellaufschluss

enthielten sowohl die löslichen (Überstand, ÜS) als auch die festen (Pellet, P) Bestandteile GST-PP7 $\Delta$ FG. Für die Reinigung wurden anschließend die löslichen Bestandteile über eine GSH-Sepharosematrix gegeben, sodass das GST-PP7 $\Delta$ FG spezifisch an diese Matrix binden konnte. Da sowohl der Durchfluss der Säule (DF) als auch die Waschfraktion (W) GST-PP7 $\Delta$ FG enthielten, war die GSH-Sepharose vollständig mit dem Fusionsprotein gesättigt. Nachfolgend wurde die His-PreScission-Protease für 16 h zirkuliert, um das Fusionsprotein an der integrierten Erkennungsstelle zu spalten. Anschließend wurde das abgespaltene PP7 $\Delta$ FG Protein mit Puffer von der Säule eluiert. Die SDS-Gelelektrophorese-Analyse zeigt eine erfolgreiche Spaltung des Fusionsproteins anhand der Bande bei 16,6 kDa (WO). Zur Überprüfung, ob die enzymatische Abspaltung des GST-Tags vollständig verlief, wurde auf der Säule verbliebenes Protein mit GSH enthaltenem Puffer eluiert. Die gelelektrophoretische Analyse des Eluats (Elu) zeigte noch enthaltenes Fusionsprotein auf der Höhe von ca. 40 kDa und GST auf der Höhe von ca. 30 kDa. Somit konnte nicht das gesamte Fusionsprotein erfolgreich geschnitten und vollständig gereinigt werden. Das erfolgreich abgespaltene PP7 $\Delta$ FG wurde zur weiteren Reinigung auf eine Größenausschluss-Matrix gegeben (Abbildung 21 b). Die Analyse des Chromatogramms zeigt zwei Hauptpeaks bei den Retentionsvolumina 46,7 ml und 64,0 ml. Der zweite Hauptpeak zeigt des Weiteren eine kleine Schulter bei ca. 84 ml. Zudem wurden zwei kleine Peaks bei den Retentionsvolumina 111,8 ml und 124,2 ml detektiert. Es wurden von verschiedenen Fraktionen SDS-Proben genommen und gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 21 c). Dabei ist zu erkennen, dass der zweite Hauptpeak mit einem Retentionsvolumen von 64 ml das gewünschte PP7 $\Delta$ FG Protein mit einer Größe von 14,8 kDa enthält. Da diese Fraktionen keine Verunreinigungen aufwiesen, wurden die Fraktionen B10–C6 vereinigt, konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Genauso wurden PP7 $\Delta$ FGA22C, PP7 $\Delta$ FGA62C, PP7 $\Delta$ FGN93C, PP7 $\Delta$ FG-*mCherry* und *mCherry* erfolgreich gereinigt. Das Protein *mCherry*-PP7 $\Delta$ FG wurde über eine Nickel-Affinitätschromatographie mit anschließender Größenausschlusschromatographie erfolgreich gereinigt (Kapitel 3.2.2.6, Kapitel 11.3 und Anhang Abbildung 38).

Um PP7 $\Delta$ FG chemisch fluoreszent markieren zu können, wurde an je einer Stelle im Protein ein Cystein genetisch eingebracht (Kapitel 3.2.1.1). Die entstandenen Mutanten A22C, A62C und N93C konnten nach erfolgter Reinigung über eine Michael-Addition mit dem roten Fluorophor TF3 markiert werden (Kapitel 3.2.2.7). Dabei ist der Fluorophor mit einer Maleimid-Funktion versehen, die spezifisch mit dem Cystein reagiert.<sup>114,115</sup>

Anschließend wurde das markierte Protein, hier exemplarisch für PP7-N93C-TF3 gezeigt, von überschüssigem TF3-Maleimid über eine Größenausschlusschromatographie-Matrix getrennt (Abbildung 22 a). Dabei wurde zusätzlich zur Absorption bei 280 nm ebenfalls die bei 555 nm Fluorophor spezifische Absorption gemessen. Die Klonierung, Expression, Reinigung und Fluoreszenzmarkierung der PP7-Cysteinmutanten wurden im Rahmen seiner Masterarbeit von Sebastian Kollenda durchgeführt<sup>102</sup>.

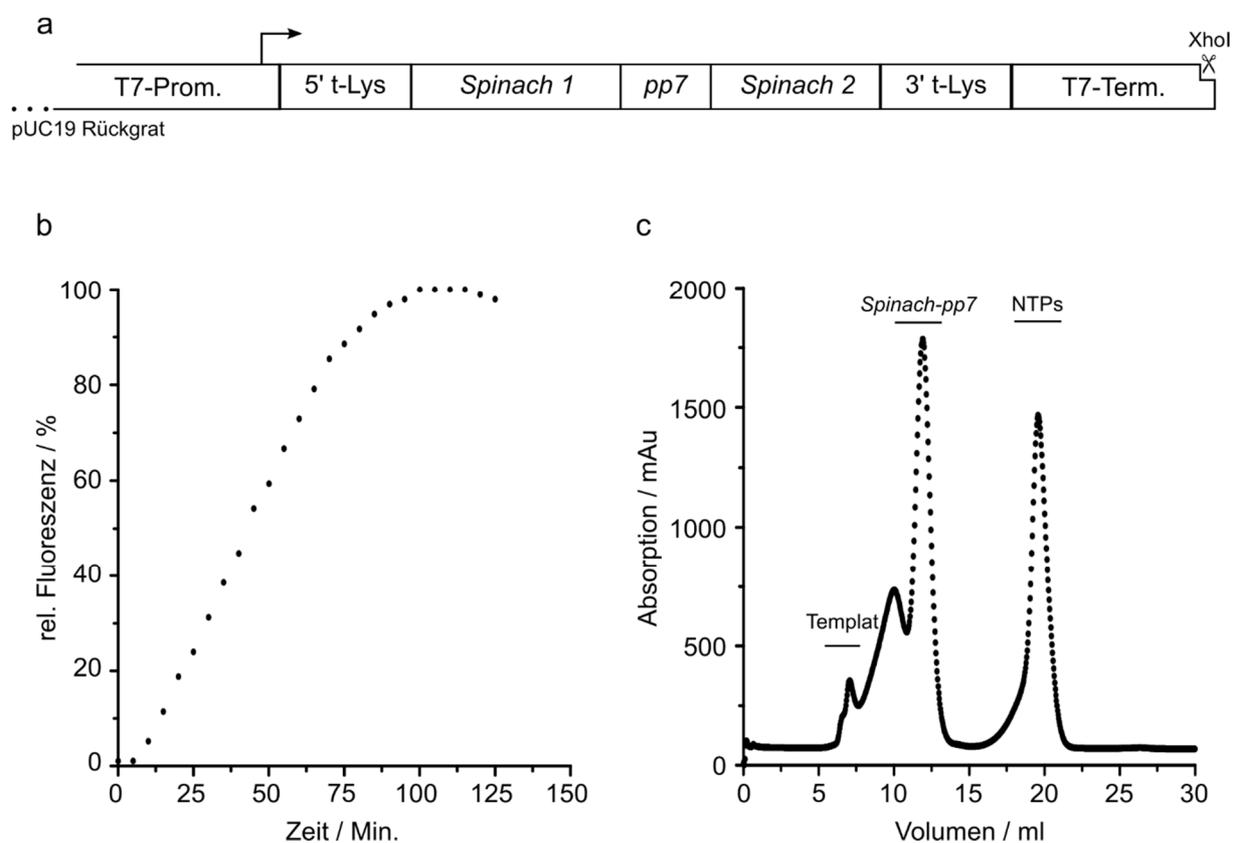


**Abbildung 22:** Fluoreszenzmarkierung über eine Michael-Addition von PP7-N93C. (a) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie (S75 10 / 300 GL) von PP7-N93C nach der Michael-Addition an TF3-Maleimid. Die Absorption wurde bei 280 nm und 555 nm verfolgt. (b) 15 %iges SDS-Gel von PP7-N93C vor und nach der Addition an TF3-Maleimid. Das SDS-Gel wurde vor der Färbung mit Coomassie (links) unter UV-Licht angeregt (rechts).

Das markierte Protein hat ein Retentionsvolumen von 10,4 ml, während das freie TF3-Maleimid bei 16,9 ml eluiert wurde. Die Reinheit des markierten Proteins wurde über die SDS-PAGE verfolgt. Dabei wurde vor der Coomassie-Färbung, zusätzlich ein UV-Bild des Polyacrylamidgels aufgenommen. Hierbei konnte eine UV-sensitive Bande auf Höhe der spezifischen Größe von 14,8 kDa detektiert werden. Die Fluoreszenzmarkierung von PP7-N93C mit TF3 über eine Michaeladdition mit anschließender Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie verlief erfolgreich. Jedoch ist aufgrund des geringen Molekularen Gewichts von TF3 (~600 Da) markiertes von dem unmarkierten Protein im SDS-Gel nicht zu unterscheiden ist. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Proteinmutante nicht vollständig markiert ist. Mit den Mutanten PP7-A22C und PP7-A62C wurde ebenso verfahren.

4.2.2.2. Charakterisierung von *Spinach-pp7*

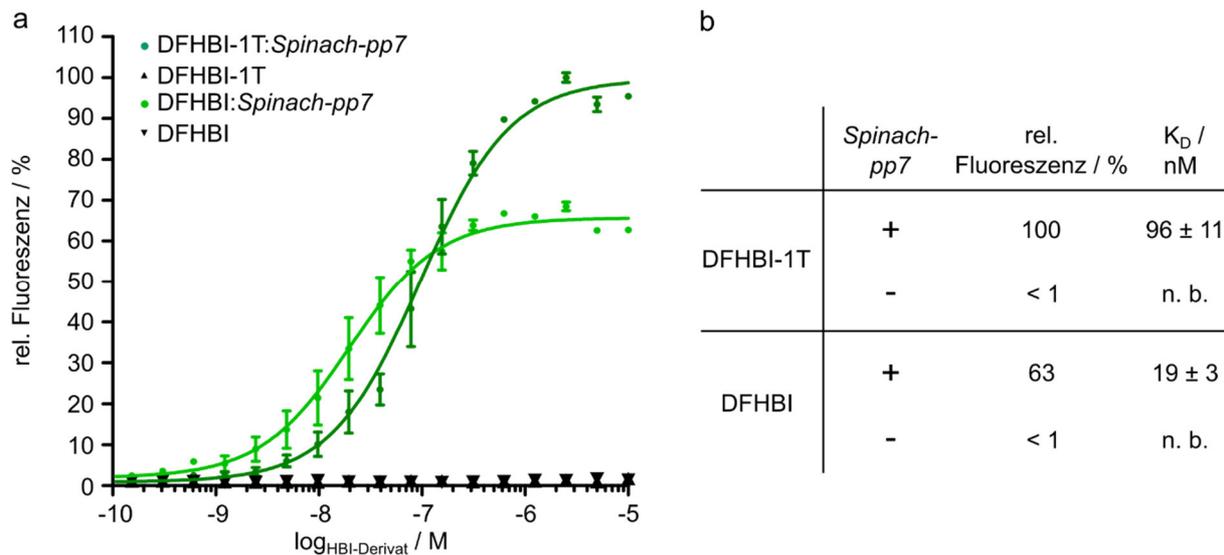
Die *pp7*-RNA wurde mit dem *Spinach*-DFHBI-Komplex (hier: *Spinach*) fluoreszenzmarkiert, indem die gesamte *pp7*-Haarnadelschleife in den Stamm 3 von *Spinach-wt* integriert wurde (*Spinach-pp7*). Zur Stabilisierung war diese Sequenz in ein t-RNA Gerüst integriert.<sup>116</sup> Hier wurde die t-RNA von Lysin verwendet (t-Lys). Anstelle des Antikodons von Lysin wurde die *Spinach-pp7*-RNA positioniert (Abbildung 23 a). Zur Klonierung wurde als Template ein pUC19 Vektor verwendet, der direkt nach der zu transkribierenden Sequenz mit dem Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert wurde. Die *In-vitro*-Transkription wurde in Anwesenheit von DFHBI verfolgt (Abbildung 23 b).



**Abbildung 23:** *In-vitro*-Transkription und Reinigung von *Spinach-pp7*. (a) Darstellung des DNA-Konstrukts für die *In-vitro*-Transkription von *Spinach-pp7*. *Spinach-pp7* ist zur Stabilisierung von dem t-Lys Gerüst flankiert. Die *pp7*-RNA wiederum wurde in den Stamm 3 von *Spinach-wt* integriert. Der Pfeil indiziert den Start der Transkription. Die *In-vitro*-Transkription wird durch den T7-Terminator nur teilweise beendet. Zusätzlich wurde darum das Template mit *XhoI* linearisiert, sodass die RNA-Polymerase an der *XhoI* Schnittstelle von dem linearisierten Vektor dissoziiert. (b) Fluoreszenz von *Spinach-pp7* während der *In-vitro*-Transkription in Anwesenheit von 50  $\mu$ M DFHBI. Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 462 nm und die Emissionswellenlänge 506 nm. (c) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie (S200 10 / 300 GL) von der *In-vitro*-Transkription von *Spinach-pp7*.

Die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* stieg bis 90 Min. Reaktionszeit nach Zugabe der RNA-Polymerase an und stagnierte anschließend. Um die transkribierte RNA von verbliebenen NTPs und Template zu trennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt

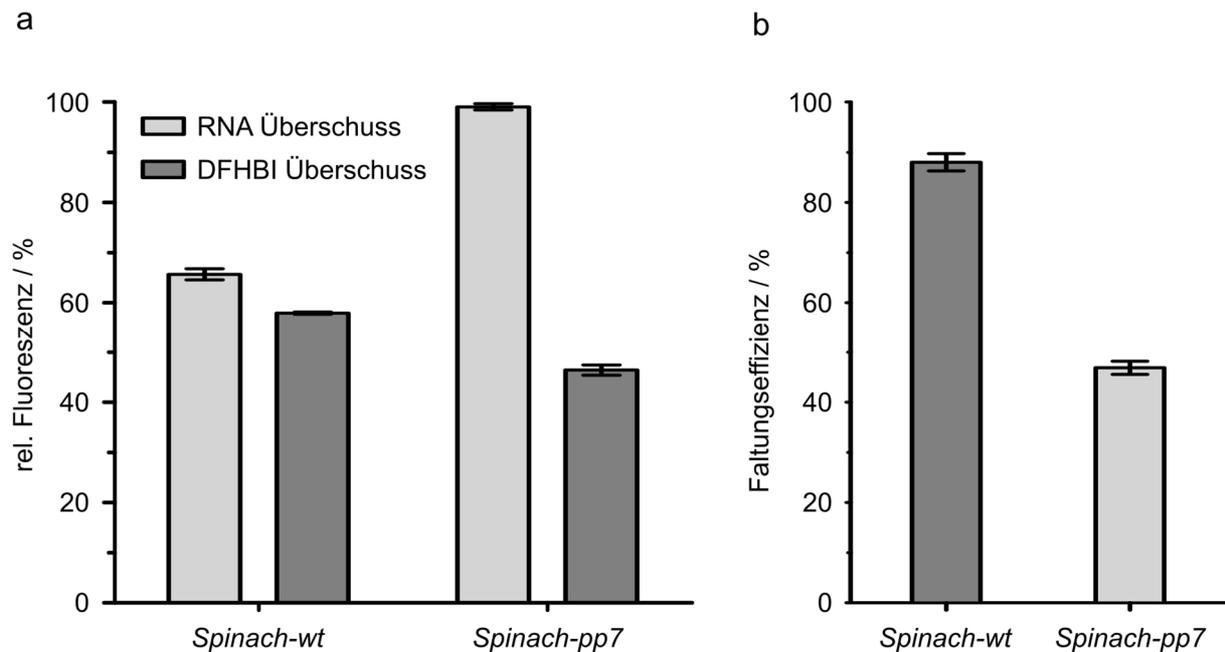
(Abbildung 23 c). Das Retentionsvolumen des Templates betrug 6,9 ml, das Produkt *Spinach-pp7* eluierte bei 11,9 ml und die freien NTPs bei 19,6 ml. Die Ausbeute relativ zur eingesetzten Menge NTPs betrug 55,1 %. Des Weiteren wurde das gereinigte RNA-Produkt im Hinblick auf die Fluoreszenzentwicklung nach Zugabe von DFHBI bzw. DFHBI-1T untersucht (Abbildung 24 a). Die Titrations von DFHBI und DFHBI-1T zeigte einen Fluoreszenzanstieg mit sigmoidalem Verlauf.



**Abbildung 24:** Charakterisierung von *Spinach-pp7*. (a) Titration von 1 µM *Spinach-pp7* mit steigenden Konzentrationen DFHBI (hellgrün) bzw. DFHBI-1T (dunkelgrün). (b) Vergleichende Darstellung der normalisierten Floreszenzen und ermittelten K<sub>D</sub>-Werte von *Spinach-pp7* in Komplex mit DFHBI und DFHBI-1T.

Die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* im Komplex mit DFHBI relativ zu *Spinach-pp7* im Komplex mit DFHBI-1T betrug 63 %. Die Affinität von *Spinach-pp7* zu DFHBI betrug 19 nM und die von *Spinach-pp7* zu DFHBI-1T 96 nM (Abbildung 24 b). Beide Chromophore zeigten ohne RNA-Zugabe eine vernachlässigbare Hintergrundfluoreszenz.

Nur die korrekt gefaltete *Spinach*-Struktur ist in der Lage DFHBI zu binden und damit Fluoreszenz zu erzeugen. Im Folgenden wurde darum zur näheren Charakterisierung von *Spinach-pp7* dessen Faltungseffizienz im Vergleich zu *Spinach-wt* untersucht (Abbildung 25). Dazu wurde *Spinach-wt* ebenfalls *in vitro* transkribiert, gereinigt und charakterisiert (Anhang Abbildung 36 und Abbildung 37). Anschließend wurde die Fluoreszenzentwicklung beider RNA-Konstrukte unter zwei verschiedenen Bedingungen bestimmt. Zunächst wurde verifiziert, dass 5 µM, 10 µM oder 20 µM RNA nach Zugabe von 0,1 µM DFHBI keine Fluoreszenzsteigerung mehr erzeugt, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass definitiv mindestens 0,1 µM RNA korrekt gefaltet vorliegt.

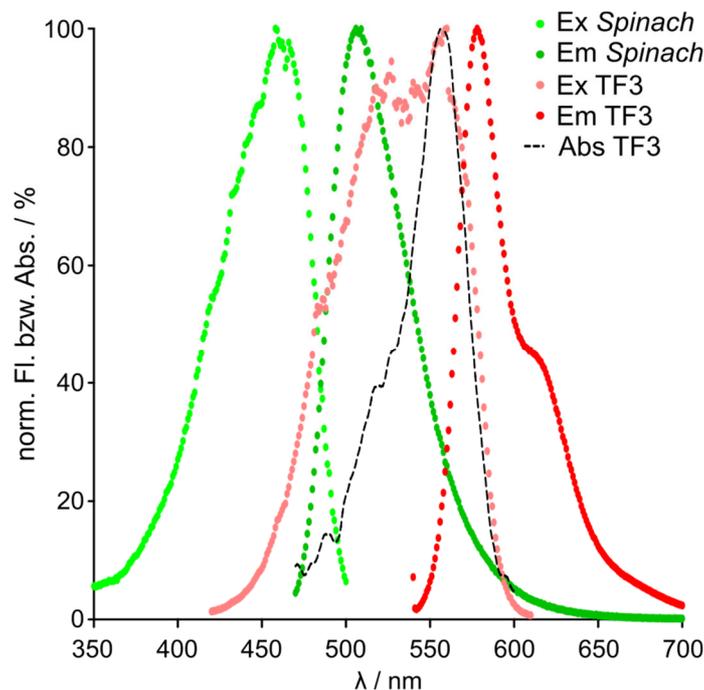


**Abbildung 25:** Bestimmung der Faltungseffizienz von *Spinach-pp7* im Vergleich zu *Spinach-wt*. (a) Relative Fluoreszenzen von *Spinach-wt* und *Spinach-pp7* unter Zugabe von einem Überschuss (hellgrau, 0,1  $\mu\text{M}$  DFHBI, 10  $\mu\text{M}$  RNA) und einem Überschuss (dunkelgrau, 10  $\mu\text{M}$  DFHBI, 0,1  $\mu\text{M}$  RNA) von DFHBI (N = 3). (b) Vergleichende Darstellung der berechneten Faltungseffizienzen von *Spinach-wt* und *Spinach-pp7*.

Da die *Spinach*-RNA mit DFHBI einen 1:1 Komplex eingeht, entsprach die erhaltene Fluoreszenz der absoluten Fluoreszenz von 0,1  $\mu\text{M}$  *Spinach*-DFHBI-Komplex. Im Vergleich zu 0,1  $\mu\text{M}$  *Spinach-wt* fällt auf, dass *Spinach-pp7* um ca. 35 % mehr fluoresziert. (Abbildung 25 a, hellgraue Balken). In einem weiteren Experiment wurde DFHBI im Überschuss zu der RNA gegeben (0,1  $\mu\text{M}$  RNA, 10  $\mu\text{M}$  DFHBI) und die entstehende Fluoreszenz gemessen (Abbildung 25 a, dunkelgraue Balken). In diesem Fall konnte nur bei einer vollständigen Faltung der gleiche Fluoreszenzwert erhalten werden, wie bei der vorherigen Messung mit RNA im Überschuss. Bei der Betrachtung beider Messungen fällt auf, dass *Spinach-wt* nur einen geringen Fluoreszenzverlust zu verzeichnen hatte, während die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* deutlich abnahm. Anhand dieser Daten konnte anschließend die Fraktion ermittelt werden, die tatsächlich gefaltet vorliegt (Abbildung 25 b). Die Faltungseffizienz von *Spinach-wt* lag bei  $88 \pm 3$  % und die von *Spinach-pp7* bei  $47 \pm 2$  %. Die Faltung von *Spinach-pp7* ist demnach durch die Integration der *pp7*-RNA reduziert worden, die maximale Fluoreszenzausbeute wurde jedoch um ca. 35 % gesteigert.

## 4.2.2.3. Spektrale Analyse von TF3 als Akzeptor

Die drei Mutanten von PP7 $\Delta$ FG PP7-A22C, PP7-A62C und PP7-N93C wurden über die Micheal-Addition erfolgreich mit TF3 fluoreszenzmarkiert (Kapitel 4.2.2.1). Da Cy3 innerhalb des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments das effizienteste Donorquenching hervorrief, wurde die verbesserte Form von Cy3, TideFluor3 (TF3) verwendet. TF3 stellt eine bessere Alternative zu Cy3 dar, da es bei ähnlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen eine erhöhte Fluoreszenzintensität und pH-Stabilität aufweist.<sup>117</sup> Die spektralen Eigenschaften von TF3 für FRET mit der *Spinach*-RNA wurden untersucht (Abbildung 26). Dabei wurde das Anregungsmaximum von TF3 mit 558 nm und das Emissionsmaximum mit 577 nm bestimmt.



**Abbildung 26:** Normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren von *Spinach*-RNA und TF3, sowie das normalisierte Absorptionsspektrum von TF3 als Akzeptor.

Das Emissionsspektrum von *Spinach* und das Absorptionsspektrum von TF3 überlappen zu  $4,8 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Dabei wird bei dem Anregungsmaximum von *Spinach* nur ein geringer Teil TF3 mit angeregt, sodass nur ein geringer *Crosstalk* zu erwarten ist. Ebenso wird bei dem Emissionsmaximum von *Spinach* nicht TF3 mit ausgelesen, sodass zusätzlich kein *Bleedthrough* zu erwarten ist.

**Tabelle 30:** Aus den Spektrenmessungen von TF3 und *Spinach-pp7* konnte das Überlappungsintegral des jeweiligen Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrum bestimmt werden. Zudem konnte daraus der Förster-Radius mit Hilfe des *Förster Distance Calculator*<sup>104</sup> (Kapitel 3.1.12) errechnet werden. Abkürzungen: D = Donor, A = Akzeptor,  $\epsilon_A$  = Extinktionskoeffizient des Akzeptors<sup>117</sup> in  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ,  $Q_A$  = Quantenausbeute des Akzeptors,  $Q_D$  = Quantenausbeute des Donors, E = ermittelte FRET Effizienz,  $J(\lambda)$  = Überlappung des Donoremissionsspektrums mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum in  $\text{nm}^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$  (berechnet mit  $\text{ale}$ <sup>103</sup>, Kapitel 3.1.12),  $R_0$  = Förster-Abstand (berechnet mit *Förster Distance Calculator*<sup>104</sup>, Kapitel 3.1.12)

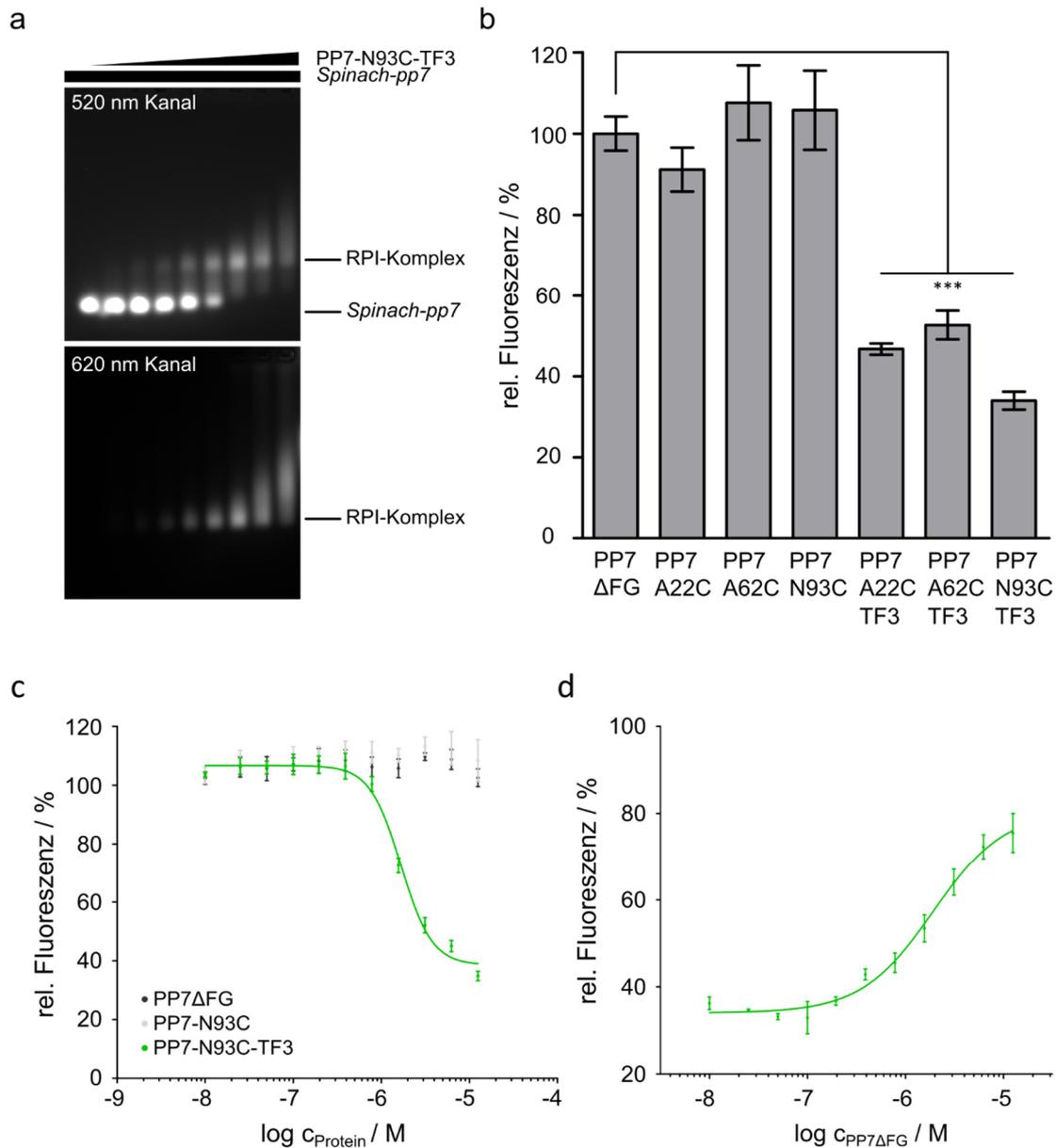
D	A	$\epsilon_A /$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$Q_D$	$J(\lambda) /$ $\text{nm}^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$	$R_0 / \text{nm}$
<i>Spinach</i>	TF3	150000	0,72	$4,79 \times 10^{15}$	6,3

Für die RNA-Protein-Interaktionsanalyse wurde der Förster-Abstand für TF3 zu *Spinach* mit dem Extinktionskoeffizienten von TF3 sowie dem Überlappungsintegral über den *Förster Distance Calculator*<sup>104</sup> bestimmt (Tabelle 30). Der Förster-Abstand betrug 6,3 nm.

#### 4.2.3. Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* über die PP7-pp7-Interaktion

Zur Verifizierung des oben gezeigten Experiments (Abbildung 20) wurde zunächst die Bindung der *Spinach-pp7*-RNA an die verschiedenen PP7 $\Delta$ FG Mutanten mit Hilfe von REMSAs ermittelt. Die REMSAs wurden von Sebastian Kollenda im Rahmen seiner Masterarbeit<sup>102</sup> erstmals durchgeführt und im Zuge dieser Arbeit optimiert. Dazu wurden steigende Mengen des fluoreszenzmarkierten PP7 $\Delta$ FG-N93C-Proteins zu der RNA gegeben und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit DFHBI wurde die RNA bei 520 nm und das Protein bei 620 nm detektiert. Dabei ist zu erkennen, dass *Spinach-pp7* eine geringere Mobilität im Vergleich zu dem RNA-Protein-Komplex (RPI-Komplex) aufweist. Der RPI-Komplex konnte sowohl im 520 nm Kanal als auch im 620 nm Kanal detektiert werden (Abbildung 27 a). Dadurch konnte verifiziert werden, dass *Spinach-pp7* spezifisch das fluoreszenzmarkierte Protein bindet. Gleiches konnte für die anderen beiden Proteinmutanten PP7 $\Delta$ FG-A22C-TF3 und PP7 $\Delta$ FG-A62C-TF3 und der Bindung an *Spinach-pp7* gezeigt werden (Anhang Abbildung 42). Anschließend wurde die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* nach Zugabe von PP7 $\Delta$ FG, den unmarkierten PP7 $\Delta$ FG-Mutanten und den markierten PP7 $\Delta$ FG-Mutanten detektiert, da bei dieser Analyse die Zunahme der Akzeptorfluorophore ebenfalls nicht zu detektieren war (Anhang Abbildung 44). Im Vergleich zur Zugabe von PP7 $\Delta$ FG haben die markierten PP7 $\Delta$ FG-Mutanten einen signifikanten Fluoreszenzverlust von *Spinach-pp7* auf 34–53 % der initialen Fluoreszenz zur Folge (Tabelle 31). Die unmarkierten

PP7 $\Delta$ FG-Mutanten haben dagegen keinen Einfluss auf die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* (Abbildung 27 b).



**Abbildung 27:** Quenching von *Spinach-pp7* über die RPI-Analyse. (a) 2%iges REMSA-Agarosegel von *Spinach-pp7* (250 nM) mit steigenden Konzentrationen von PP7-N93C-TF3 (0–12,5  $\mu\text{M}$  in einer 1:1 Verdünnung). Das Gel wurde nach Färbung mit 5  $\mu\text{M}$  DFHBI mit Fluorescein- (Ex = 490 nm, Em = 525 nm, oben) sowie Cy3- (Ex = 558 nm, Em = 576 nm, unten) Filtereinstellungen aufgenommen. (b) Fluoreszenz von *Spinach-pp7* mit 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI in Anwesenheit von 12,5  $\mu\text{M}$  der jeweiligen TF3-markierten PP7-Mutante (grün). Als Negativkontrollen wurden 12,5  $\mu\text{M}$  der nicht markierten PP7-Mutante (hellgrau), sowie PP7 $\Delta$ FG (dunkelgrau) zu *Spinach-pp7* gegeben. Die Anregungswellenlänge betrug 462 nm und die Emissionswellenlänge 506 nm. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$  (N = 3). (c) Titration von *Spinach-pp7* mit steigenden Konzentrationen von PP7-N93C-TF3. Als Negativkontrollen wurden PP7-N93C und PP7 $\Delta$ FG ebenfalls titriert. Detektiert wurde die *Spinach-pp7* Fluoreszenz bei 506 nm nach Anregung bei 462 nm (N = 3). (d) Konkurrenz von PP7-N93C-TF3 aus dem Komplex mit *Spinach-pp7* durch steigende Konzentrationen PP7 $\Delta$ FG (N = 3). Die Daten sind als  $\pm$ SEM der Triplikate dargestellt.

Durch den signifikanten Fluoreszenzverlust von *Spinach-pp7* konnte gezeigt werden, dass durch eine RPI, die Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* möglich ist.

Die Titration von PP7 $\Delta$ FG, PP7-N93C und PP7-N93C-TF3 zu *Spinach-pp7* zeigt allein für die Zugabe von PP7-N93C-TF3 einen sigmoidalen Verlauf des Fluoreszenzverlusts (Abbildung 27 c). Die Mutanten PP7-A22C und PP7-A62C zeigen ähnliche Verläufe nach Zugabe des fluoreszenzmarkierten Proteins zu *Spinach-pp7* (Anhang Abbildung 42). Die daraus ermittelten Affinitäten liegen für alle drei Mutanten im unteren mikromolaren Bereich (Tabelle 31). Die Titration der fluoreszenzmarkierten PP7-Cysteinmutanten zu *Spinach-pp7* wurde im Rahmen seiner Masterarbeit von Sebastian Kollenda durchgeführt<sup>102</sup>.

**Tabelle 31:** Die FRET-Effizienzen E und Dissoziationskonstanten  $K_D$  konnten über die RPI-Interaktionsanalyse ermittelt werden. Zudem konnte der Abstand beider Fluorophore mit PyMOL<sup>105</sup> graphisch bestimmt werden ( $r^+$ ) und über die gewonnenen FRET Effizienzen mit dem *FRET Distance Calculator*<sup>106</sup> berechnet werden ( $r^*$ ). Dabei konnten auf Grund der Anwesenheit von zwei Fluorophoren pro Proteindimer bei der graphischen Auswertung zwei Abstände ermittelt werden.

Fluorophor	Position	$r^+$ / nm	E / %	$K_D$ / $\mu$ M	$r^*$ / nm
	A22C	5,2 / 5,9	52 $\pm$ 1	1,8 $\pm$ 0,2	6,2
TF3	A62C	4,9 / 6,8	46 $\pm$ 4	2,9 $\pm$ 0,3	6,5
	N93C	4,5 / 7,0	65 $\pm$ 2	1,9 $\pm$ 0,2	5,7

Die FRET-Effizienzen konnten aus dem signifikanten Fluoreszenzverlust des Donors bestimmt werden. Hier zeigte *Spinach-pp7* in Kombination mit PP7-N93C-TF3 mit 65 % die höchste FRET-Effizienz. PP7-A22C-TF3 und PP7-A62C-TF3 lagen mit 52 % und 46 % deutlich darunter. Anschließend konnte aus den gewonnenen FRET-Effizienzen der Abstand  $r^*$  beider Fluorophore unter Berücksichtigung des Förster-Abstands mit Hilfe des *FRET Distance Calculator*<sup>106</sup> bestimmt werden und mit dem zuvor über PyMOL<sup>105</sup> grafisch ausgewerteten Abständen  $r^+$  verglichen werden. Der geringste Abstand  $r^+$  zwischen DFHBI als *Hotspot* der Fluoreszenz in *Spinach* und TF3 war mit 4,5 nm innerhalb der PP7-N93C-Mutante zu finden. Die weitere Markierung in dieser Mutante hatte allerdings mit 7 nm den größten Abstand zu DFHBI. Die Abstände  $r^+$  in den weiteren Mutanten A22C und A62C befanden sich zwischen diesen Werten. Der berechnete Abstand  $r^*$  bezog sich auf die ermittelte FRET-Effizienz. Dadurch handelte es sich bei dem berechneten Abstand  $r^*$  um einen mittleren Abstand beider roten Fluorophore zu DFHBI. Hier ergab sich ebenfalls zwischen TF3 in der PP7-N93C-Mutante und DFHBI der geringste Abstand mit 5,7 nm. Die Abstände der Markierungspositionen in den anderen Mutanten zu DFHBI betrug 6,2 nm und 6,5 nm.

Zur Untersuchung der Reversibilität des Systems wurde zu dem Fluoreszenzlöschungskomplex, bestehend aus 12,5  $\mu$ M PP7-N93C-TF3, 250 nM *Spinach-pp7*

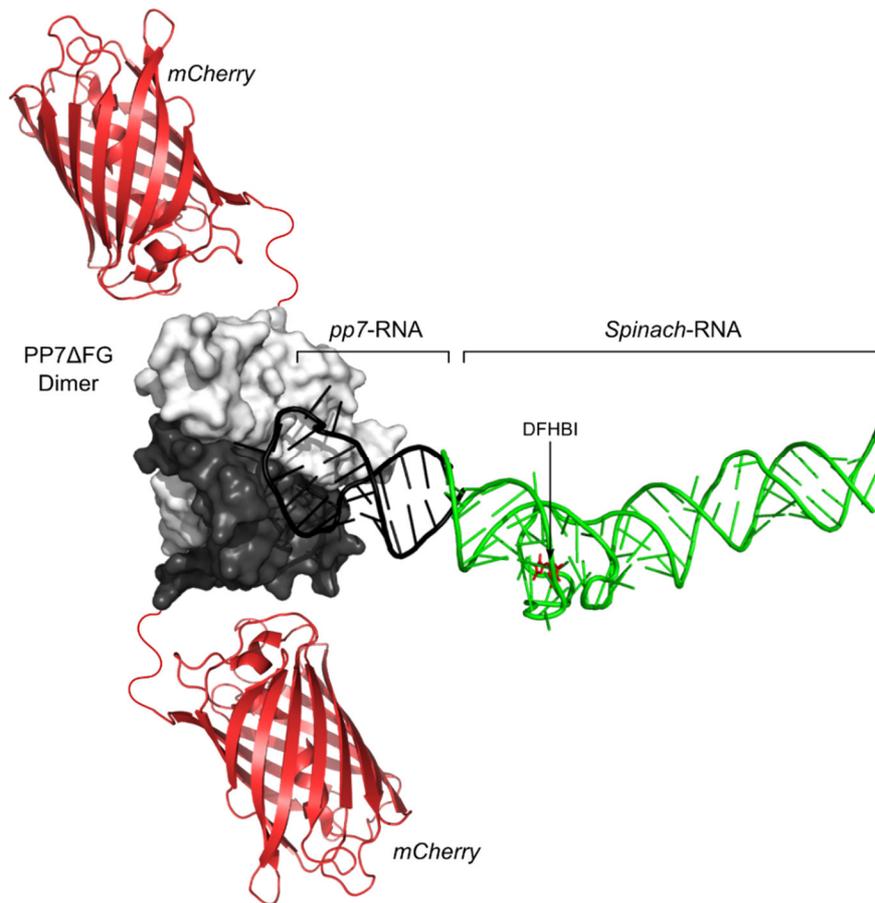
und 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI, steigende Konzentrationen von unmarkiertem PP7 $\Delta$ FG titriert. Dadurch konnte die initiale Fluoreszenz von *Spinach-pp7* zu 75 % wiederhergestellt werden (Abbildung 27 d). Durch diesen Versuch konnte ausgeschlossen werden, dass die RNA aus anderen Gründen gequencht wird, wie z. B. ein Verlust der Tertiärstruktur durch die Zugabe des fluoreszenzmarkierten Proteins.

### 4.3. Genetisch kodiertes System für *Spinach-pp7* Fluoreszenzlöschung

Ein besonderes Interesse lag darin, eine Untersuchungsmethode für die Detektion und Analyse von RPIs zu etablieren, die genetisch kodierbar ist. Der Vorteil einer solchen Analyse besteht darin, dass sie sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Studien verwendet werden kann. Die *Spinach*-RNA als Fluoreszenzmarkierung für RNA kann als genetisch kodierbar angesehen werden, da sie direkt an die RNA von Interesse auf DNA-Ebene kodiert werden kann. Anschließend ist die Zugabe von DFHBI nötig, welches durch die spezifische Bindung an *Spinach* die Fluoreszenz signifikant steigert. Das Chromophor DFHBI ist dabei zellgängig und nicht-toxisch.<sup>65</sup>

#### 4.3.1. Aufbau der genetisch kodierten RNA-Protein-Interaktionsuntersuchungsmethode

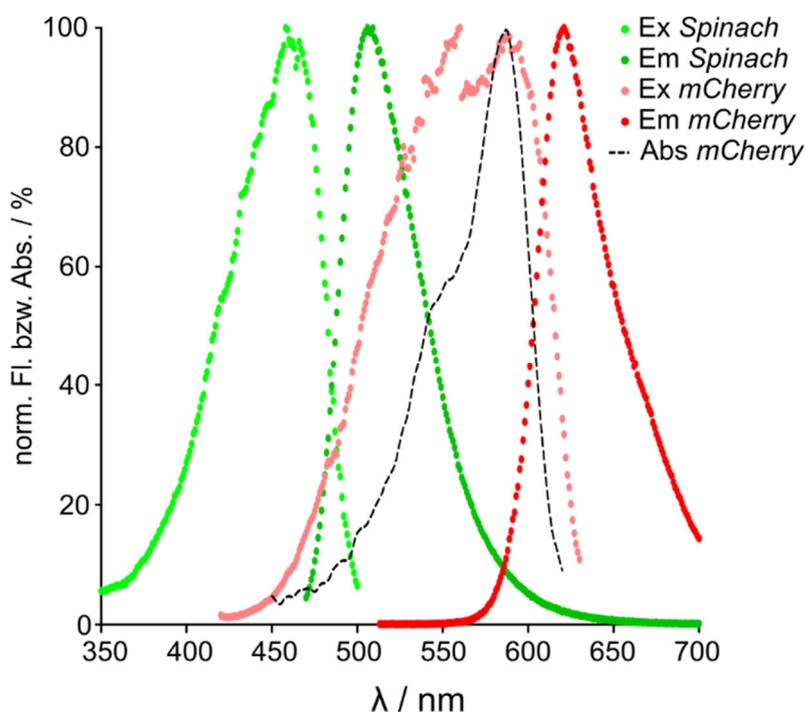
Im nächsten Schritt wurde eine genetisch kodierbare RPI-Untersuchungsmethode etabliert. Für Proteine sind genetisch kodierbare Fluoreszenzmarkierungen seit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Jahr 1961 bekannt.<sup>66,67,69,118</sup> In der Zeit danach wurden durch Mutationen von GFP, sowie die Entdeckung weiterer fluoreszierender Proteine das Farbspektrum dieser vergrößert.<sup>119</sup> So eignet sich das rot fluoreszierende Protein *monomeric Cherry (mCherry)*<sup>120</sup> als Akzeptor innerhalb einer genetisch kodierbaren und auf FRET basierende RPI-Untersuchungsmethode, bei der *Spinach* als Donor fungiert. Bei dieser RPI-Untersuchungsmethode wurde das Proteindimer PP7 $\Delta$ FG mit *mCherry* versehen. Dazu wurde ein N- bzw. C-terminal mit *mCherry* fusioniertes PP7 $\Delta$ FG Dimer kloniert, exprimiert und gereinigt (Kapitel 3.2.1.8, 3.2.2.1, 3.2.2.5 und 3.2.2.6). Auf Grund der dimeren Struktur sind zwei *mCherry*-Proteine an PP7 $\Delta$ FG fusioniert. PP7 $\Delta$ FG bindet spezifisch an die RNA-Haarnadelschleife *pp7* (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Schematische Darstellung des designten genetisch kodierbaren Quenching-Komplexes für die Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* über die PP7-pp7-Interaktion. Das PP7ΔFG Dimer wurde N- bzw. C-terminal mit *mCherry* (rot) markiert. Hier ist das N-terminal markierte PP7ΔFG Dimer gezeigt, das spezifisch das RNA-Konstrukt bindet. Das RNA-Konstrukt besteht aus der *pp7*-RNA (schwarz), die auf den P3 Stamm von *Spinach* (grün) fusioniert wurde.

Diese wiederum ist mit der *Spinach*-RNA fluoreszenzmarkiert, indem sie auf den Stamm 3 von *Spinach* integriert wurde. Nach erfolgter Bindung befinden sich, je nach Ausrichtung der *mCherry*-Proteine, beide Fluorophore in unmittelbarer Nähe zueinander und ein FRET sollte detektierbar sein.

Wie die Analyse der Spektren verdeutlicht, eignet sich *mCherry* auf Grund seiner spektralen Eigenschaften als Akzeptor in einem FRET-basierten Experiment, indem *Spinach* als Donor dient (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren von *Spinach-wt* RNA und *mCherry* Protein.

Das Anregungsmaximum von *mCherry* liegt bei 588 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 621 nm. Das normalisierte Emissionsspektrum von *Spinach* überlappt mit  $1,9 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  mit dem Absorptionsspektrum von *mCherry*. Beide Anregungsspektren, sowie beide Emissionsspektren können in Anwesenheit beider Fluorophore an den Maxima ausgelesen werden, ohne dass *Crosstalk* oder *Bleedthrough* zu erwarten waren. Aus dem Überlappungsintegral des Emissionsspektrums von *Spinach* und des Absorptionsspektrums von *mCherry* konnte mit Hilfe des *Förster Distance Calculators*<sup>104</sup> der Förster-Abstand bestimmt werden (Tabelle 32).

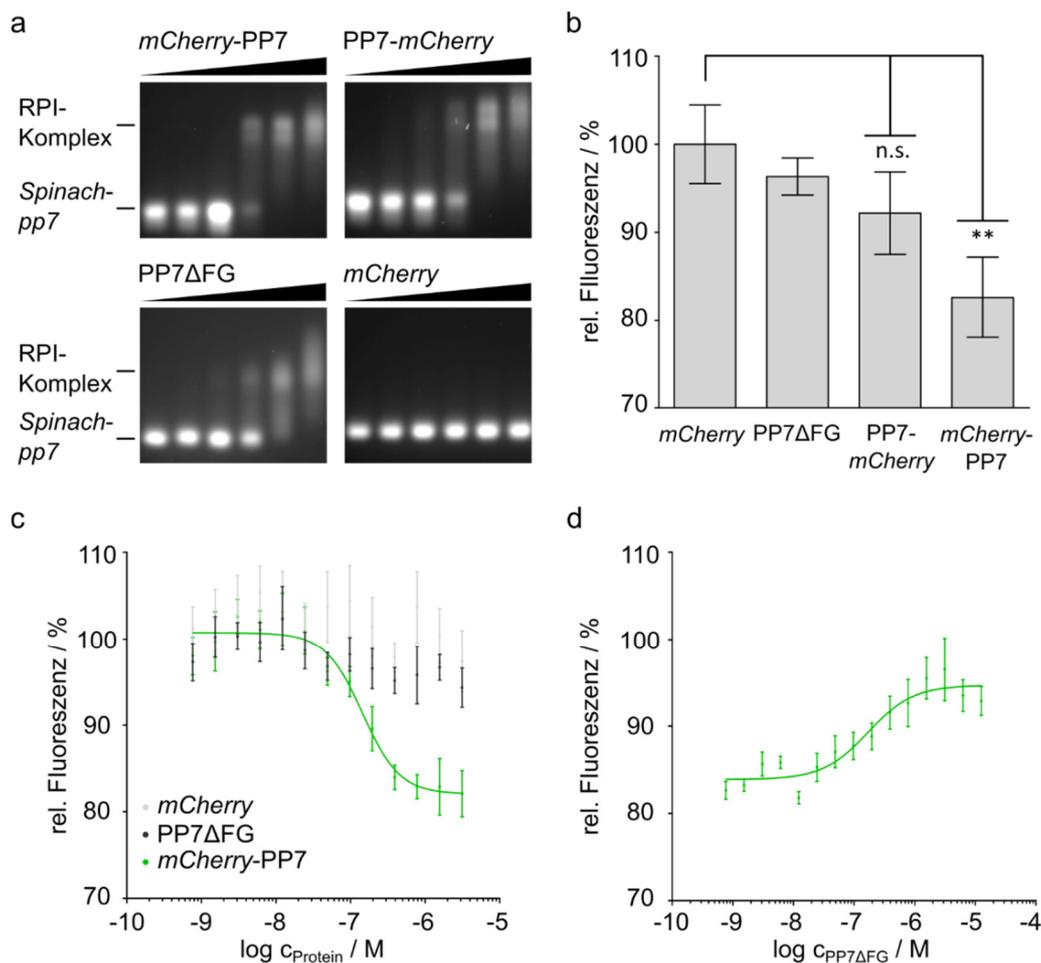
**Tabelle 32:** Aus den Spektrenmessungen von *mCherry* und *Spinach-pp7* konnte das Überlappungsintegral des jeweiligen Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrum bestimmt werden. Zudem konnte daraus der Förster-Radius mit Hilfe des *Förster Distance Calculators*<sup>104</sup> (Kapitel 3.1.12) errechnet werden. Abkürzungen: D = Donor, A = Akzeptor,  $\epsilon_A$  = Extinktionskoeffizient des Akzeptors<sup>121</sup> in  $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $Q_A$  = Quantenausbeute des Akzeptors,  $Q_D$  = Quantenausbeute des Donors, E = ermittelte FRET Effizienz,  $J(\lambda)$  = Überlappung des Donoremissionsspektrums mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum in  $\text{nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (berechnet mit  $\text{ale}$ <sup>103</sup>, Kapitel 3.1.12),  $R_0$  = Förster-Abstand (berechnet mit *Förster Distance Calculator*<sup>104</sup>, Kapitel 3.1.12)

D	A	$\frac{\epsilon_A}{\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}}$	$Q_D$	$\frac{J(\lambda)}{\text{nm}^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}}$	$R_0 / \text{nm}$
<i>Spinach</i>	<i>mCherry</i>	72000	0,72	$1,92 \times 10^{15}$	5,4

Der Förster-Abstand wurde mit 5,4 nm berechnet. Im Folgenden sollte das zuvor etablierte Fluoreszenzlöschungssystem mit Hilfe von *mCherry* als Proteinmarkierung anstelle von TF3 getestet werden.

#### 4.3.2. Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* über die genetisch kodierte RNA-Protein-Untersuchungsmethode

PP7 $\Delta$ FG wurde N- bzw. C-terminal mit *mCherry* markiert exprimiert und gereinigt. Ebenso wurde *Spinach-pp7* wie zuvor beschreiben *in vitro* transkribiert und gereinigt. Anschließend wurde die Bindung der Fusionsproteine an *Spinach-pp7* über REMSAs verifiziert (Abbildung 30 a).



**Abbildung 30:** Quenching von *Spinach-pp7* über eine genetisch kodierte RPI-Analyse. (a) 2%ige REMSA-Agarosegele von *Spinach-pp7* (250 nM) mit *mCherry-PP7*, *PP7-mCherry*, *PP7 $\Delta$ FG* und *mCherry* (0–1,6  $\mu$ M in einer 1:1 Verdünnung). Nach Färbung der Gele mit 5  $\mu$ M DFHBI wurden diese durch einen Fluorescein-Filterset aufgenommen (Ex = 490 nm, Em = 525 nm). (b) Fluoreszenzlöschung von 250 nM *Spinach-pp7* mit 2,5  $\mu$ M DFHBI nach Zugabe von 12,5  $\mu$ M *mCherry-PP7*, *PP7-mCherry*, *PP7 $\Delta$ FG* und *mCherry*. Es wurde auf die *Spinach-pp7* Fluoreszenz ohne Zugabe von Protein normalisiert (\*\* = p  $\leq$  0,01, n.s. = nicht signifikant, N = 3). (c) 2,5  $\mu$ M *Spinach-pp7* wurden mit steigenden Konzentrationen von *mCherry-PP7* titriert und die Fluoreszenz bei 506 nm detektiert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls *mCherry* und *PP7 $\Delta$ FG* zu *Spinach-pp7* titriert (N = 3). (d) Konkurrenz von 12,5  $\mu$ M *mCherry-PP7* mit steigenden Konzentrationen *PP7 $\Delta$ FG* (N = 3). Die Daten sind als  $\pm$ SEM der Triplikate dargestellt.

Dazu wurden zu *Spinach-pp7* steigende Konzentrationen von *mCherry*-PP7, PP7-*mCherry*, PP7 $\Delta$ FG und *mCherry* titriert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung der Agarosegele mit DFHBI wurde bei 520 nm die RNA detektiert. Es ist zu erkennen, dass PP7 $\Delta$ FG sowie die mit *mCherry* fusionierten PP7 $\Delta$ FG-Proteine mit steigender Zugabe von Protein eine geringere Mobilität von *Spinach-pp7* erzeugen. Das deutet auf eine spezifische RNA-Protein-Komplexbildung hin. Die Negativkontrolle *mCherry* zeigt dagegen keine verringerte Mobilität durch das Gel im Vergleich zu *Spinach-pp7* ohne Zugabe von Protein. Eine unspezifische Bindung von *mCherry* an *Spinach-pp7* kann somit ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* in Gegenwart der verschiedenen Proteine detektiert. Hier wurde auf die Zugabe von *mCherry* normalisiert, da das REMSA gezeigt hat, dass kein RNA-Protein-Komplex gebildet wird. Im Vergleich dazu zeigen PP7 $\Delta$ FG und PP7-*mCherry* keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenz von *Spinach-pp7*. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Zugabe von *mCherry*-PP7 zu einer Verminderung der Fluoreszenz auf  $83 \pm 5$  % (Abbildung 30 b). Daraus kann geschlossen werden, dass *Spinach-pp7* durch biologische Fluorophore wie *mCherry* gequenchet werden kann. Eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz konnte hier wiederum nicht detektiert werden (Anhang Abbildung 45). Die ermittelte Dissoziationskonstante von *mCherry*-PP7 zu *Spinach-pp7* betrug  $140 \pm 40$  nM. Die Titration der Kontrollen zeigte keine spezifische Abnahme der *Spinach-pp7* Fluoreszenz (Abbildung 30 c).

**Tabelle 33:** Zusammenstellung der Daten, die aus der genetisch kodierbaren RPI-Analyse gewonnen wurden. Abkürzungen:  $r^+$  = mit Hilfe von PyMOL<sup>105</sup> bestimmter Abstand zwischen Donor und Akzeptor, E = FRET-Effizienz,  $K_D$  = Dissoziationskonstante,  $r^*$  = mit Hilfe von *FRET Distance Calculator*<sup>106</sup> berechneter Abstand zwischen Donor und Akzeptor, n.s. = nicht signifikant, n. b. = nicht bestimmt.

Fluorophor	Position	$r^+$ / nm	E / %	$K_D$ / nM	$r^*$ / nm
<i>mCherry</i>	N-terminal	n. b.	$17 \pm 5$	$140 \pm 40$	6,8
	C-terminal	n. b.	n. s.	n. b.	n. b.

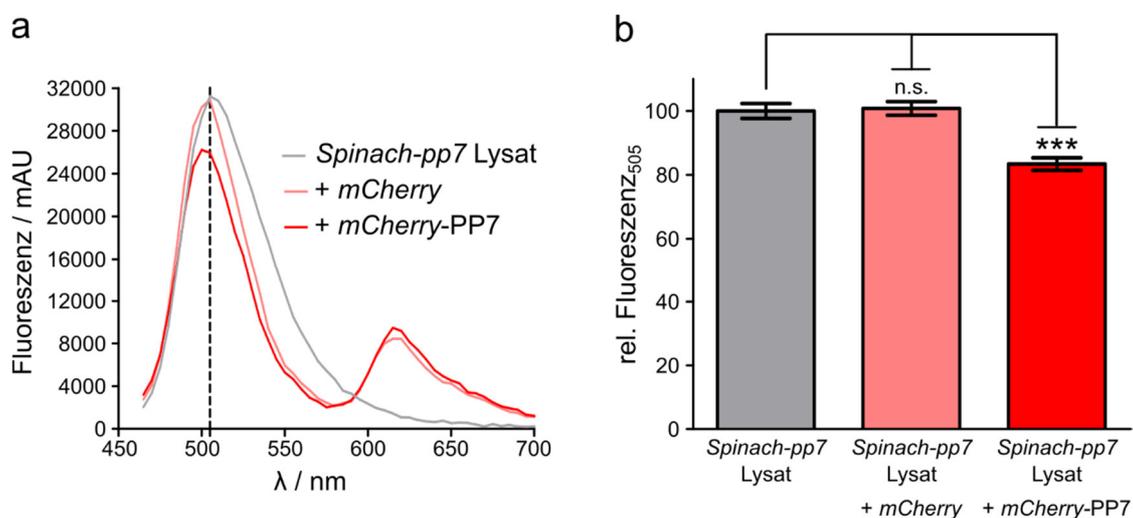
Mit Hilfe der gemessenen FRET Effizienz unter Verwendung des N-terminal markierten PP7 $\Delta$ FG Proteindimers konnte über den *FRET Distance Calculator*<sup>106</sup> der Abstand beider Fluorophore  $r^*$  zueinander mit 6,8 nm berechnet werden (Tabelle 33).

Die Reversibilität des Systems wurde getestet, indem *mCherry*-PP7 mit PP7 $\Delta$ FG verdrängt wurde und so die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* auf 95 % regeneriert werden konnte (Abbildung 30 c). Hierdurch wurde sichergestellt, dass die Fluoreszenz der RNA durch die Zugabe des Proteins nicht irreversibel beeinflusst wurde. Da es sich hierbei um ein genetisch

kodierbares System handelt, stellt sich besonders die Frage, wie sich die *Spinach-pp7:mCherry*-PP7 Interaktion bei Lysatmessungen verhält.

#### 4.3.3. Fluoreszenzlöschung von exprimierter *Spinach-pp7*-RNA über eine genetisch kodierbare RNA-Protein-Interaktion

Zur weiteren Charakterisierung dieses vollständig kodierbaren FRET-Systems zur Analyse von RPIs wurde *Spinach-pp7* in *E. coli* BL21(DE3) Zellen überexprimiert und das Lysat anschließend für FRET-Messungen verwendet (Kapitel 3.2.3.13). Zur Verminderung des *Bleedthrough*-Effektes wurde hier zunächst die optimale Anregungswellenlänge mit 425 nm und die Anregungs- und Emissionsbandweite mit jeweils 5 nm bestimmt (Anhang Abbildung 45). Anschließend wurden *mCherry* oder *mCherry*-PP7 mit dem *Spinach-pp7*-Lysat unter Zugabe von 1,3  $\mu$ M DFHBI gemischt und die Emissionsspektren ausgelesen (Abbildung 31 a). Das Lysat zeigt ein deutliches Emissionsmaximum bei der für *Spinach-pp7* spezifischen Wellenlänge von 505 nm. Nach Zugabe von *mCherry*-PP7 (66  $\mu$ M) konnte eine signifikante Fluoreszenzlöschung von ca. 20 % detektiert werden (Abbildung 31 b). Die Zugabe von der Kontrolle *mCherry* führte zu keinem Fluoreszenzverlust.



**Abbildung 31:** Anwendung des genetisch kodierbaren RNA-Protein-Interaktionsexperiments in *E. coli* BL21(DE3) Zellen. (a) Emissionsspektrum von *E. coli* BL21(DE3) Lysat, welches *Spinach-pp7* überexprimiert hat (grau), im Vergleich zu den Emissionsspektren des Lysats in Anwesenheit von 1,3  $\mu$ M DFHBI nach Zugabe von 66  $\mu$ M *mCherry* (hellrot) oder *mCherry*-PP7 (dunkelrot). Die gestrichelte, schwarze Linie gibt die Wellenlänge wieder, an der die Signifikanzanalyse vorgenommen wurde (505 nm) (b) Signifikanzanalyse bei 505 nm zur Darstellung der spezifischen Fluoreszenzlöschung nach Zugabe von *mCherry*-PP7 (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ , n.s. = nicht signifikant).

Eine signifikante Zunahme der Akzeptorfluoreszenz konnte jedoch bei diesen Messungen ebenfalls nicht detektiert werden. Es ist zwar ein Peak spezifisch für *mCherry* (615 nm) detektierbar, der allerdings im Vergleich von *mCherry*-PP7 und *mCherry* gleichermaßen

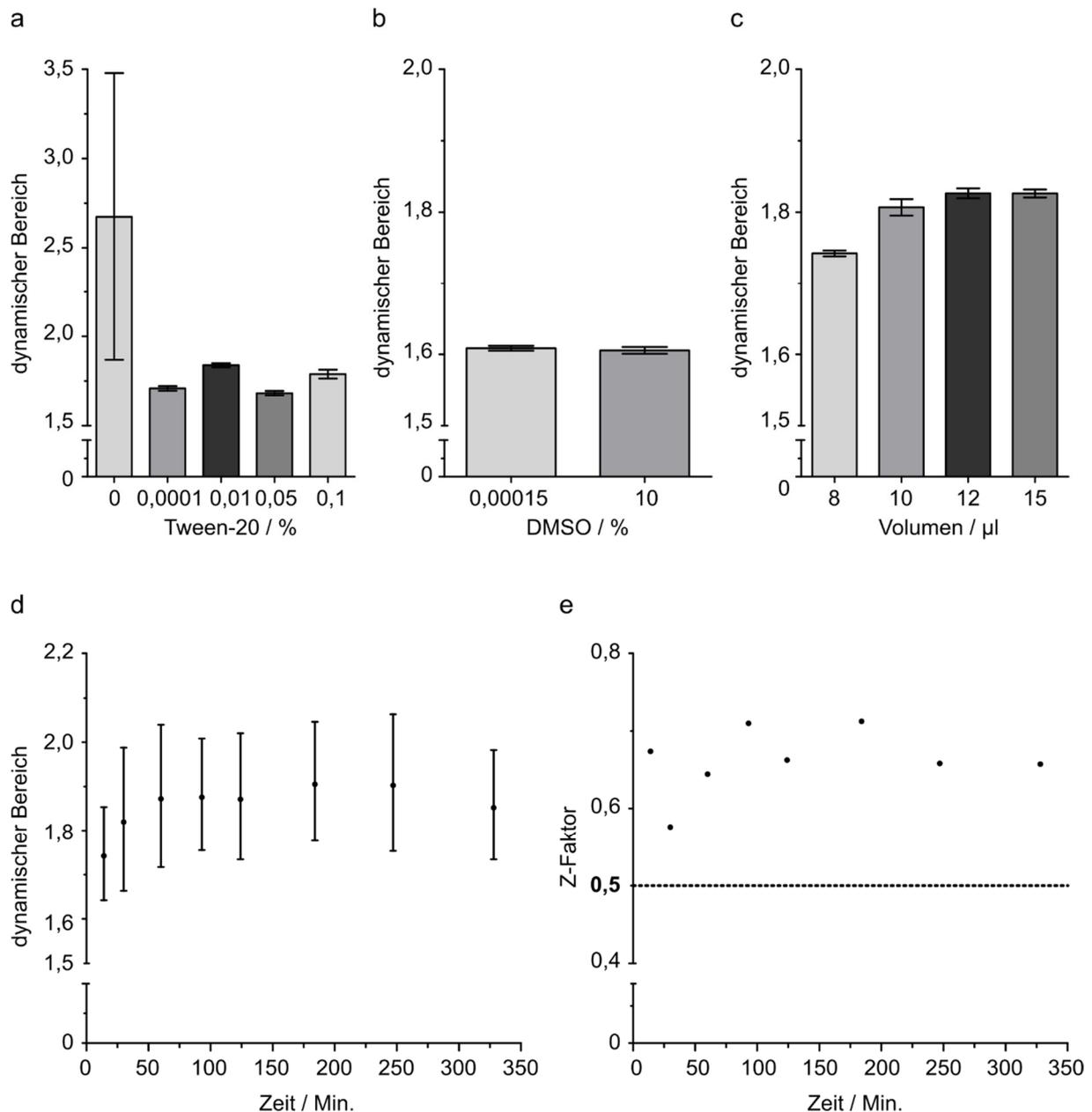
auftritt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* sowohl *in vitro*, als auch bei Messung innerhalb eines Lysats, spezifisch durch die Bindung von *mCherry-PP7* vermindert werden kann.

#### 4.4. Entwicklung eines Hochdurchsatzformats mit Hilfe der *Spinach*-RNA

RPIs spielen eine große Rolle in Signalwegen der Zelle. Fehler innerhalb dieser Interaktionen können zu Krankheiten führen.<sup>122</sup> Darum ist es von großem Interesse, Inhibitoren oder Stabilisatoren dieser RPIs zu finden und als Wirkstoffe weiterzuentwickeln. Allerdings sind bis heute nur wenige Hochdurchsatzformate (*High Throughput Screening, HTS*) für die Suche nach RPIs bekannt.<sup>123</sup> Hier sollte untersucht werden, ob sich der zuvor in Kapitel 4.2 beschriebene Fluoreszenzlöschungskomplex, bestehend aus 12,5  $\mu\text{M}$  PP7-N93C-TF3, 250 nM *Spinach-pp7* und 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI, für einen *HTS* eignet. Die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* sollte bei Inhibition der PP7-*pp7* Interaktion ansteigen und nicht verringert werden. So kann ausgeschlossen werden, dass die RNA durch die Zugabe der Substanzen die Fluoreszenz unspezifisch verliert und ein falsch positives Signal erzeugt wird. Ein unspezifischer Anstieg der *Spinach* Fluoreszenz erscheint dagegen unwahrscheinlicher. Die verwendete Substanzbibliothek *Library of Pharmacologically Active Compounds* (LOPAC<sup>1280</sup>) wurde freundlicherweise von Dr. Sonja Sievers (COMAS) bereitgestellt.

##### 4.4.1. Optimierung des *High Throughput Screenings*

Zunächst wurde das zuvor beschriebene Experiment (Kapitel 4.2) auf die Möglichkeit eines *HTS* hinsichtlich der Detergens- und DMSO-Konzentration sowie des Kavitätenvolumens der verwendeten Platten optimiert (Abbildung 32). Als Negativkontrolle diente der Fluoreszenzlöschungskomplex, bestehend aus 12,5  $\mu\text{M}$  PP7-N93C-TF3, 250 nM *Spinach-pp7* und 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI.



**Abbildung 32:** Optimierung des HTS. (a–c) Dynamischer Bereich des Fluoreszenzlösungs-Komplexes bestehend aus 250 nM *Spinach-pp7*, 2,5 µM DFHBI-1T und 12,5 µM PP7-N93C-TF3 nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Tween-20 (a) und DMSO (b) bzw. verschiedener Befüllung der Kavitäten (c) (N = 15). (d) Messung des dynamischen Bereichs des Fluoreszenzlösungs-Komplexes über die Zeit (N = 15). (e) Berechnete Z-Faktoren über die Zeit (N = 15). Z-Faktor =  $3(\sigma_p + \sigma_n) / (|\mu_p - \mu_n|)$  ( $\sigma_p$  = Standardabweichung der Positivkontrolle,  $\sigma_n$  = Standardabweichung der Negativkontrolle,  $\mu_p$  = Mittelwert der Positivkontrolle,  $\mu_n$  = Mittelwert der Negativkontrolle).

Die Positivkontrolle war zusammengesetzt aus dem Fluoreszenzlösungskomplex nach Zugabe von 20 µM PP7ΔFG. PP7ΔFG verdrängt, wie in Kapitel 4.2.2.3 gezeigt, die fluoreszenzmarkierte Mutante PP7-N93C-TF3 und inhibiert den Fluoreszenzlösungskomplex. Dadurch nahm die Fluoreszenz von *Spinach* wieder zu und dieser Wert konnte als Positivkontrolle verwendet werden. Der dynamische Bereich wurde aus dem Verhältnis der resultierenden Fluoreszenzen von Positiv- und Negativkontrolle

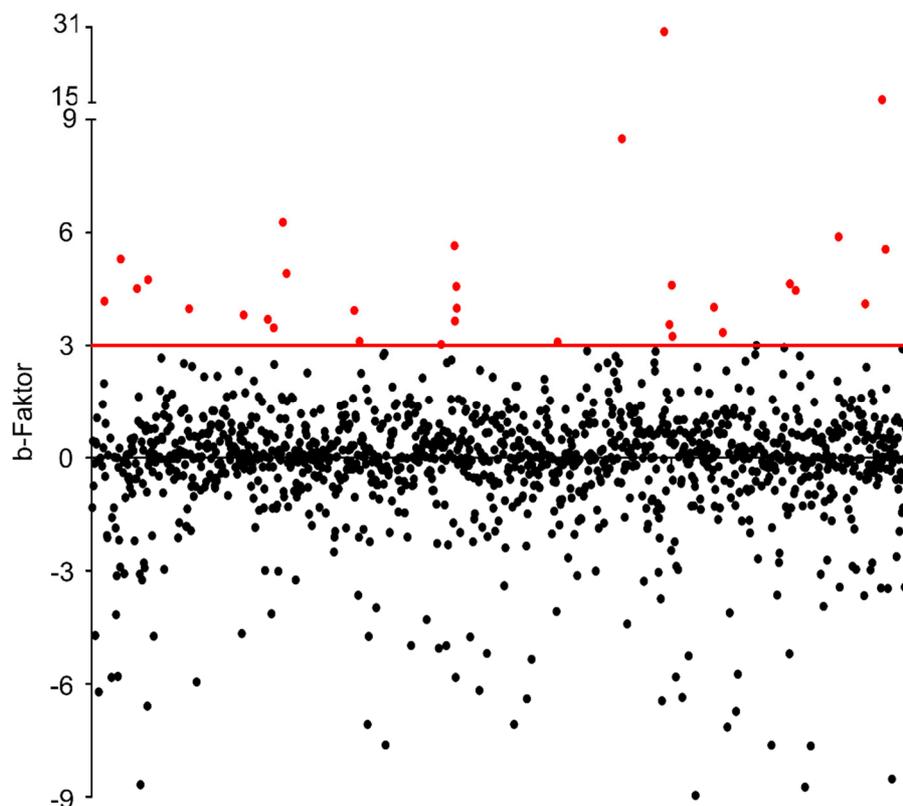
definiert. Zunächst wurde die Toleranz des Systems anhand der Änderung des dynamischen Bereichs nach Zugabe von Detergens oder DMSO bzw. die Messung von verschiedenen Volumina charakterisiert. Ein Detergens wird üblicherweise in einer Messung zugesetzt, um den Miniskus innerhalb der Kavitäten und somit den Fehler möglichst flach zu halten. Dabei muss beachtet werden, dass ein Übermaß an Detergens zu einer Inhibierung der eigentlichen Bindung der Biomoleküle führen kann. Darum wurde die optimale Zugabe von Detergens vor dem *HTS* untersucht. Ein übliches Detergens, welches in einem *HTS* verwendet wird ist Tween-20. Zur Positiv- sowie zur Negativkontrolle wurden verschiedene Konzentrationen von Tween-20 hinzugefügt. Ohne Zugabe von Tween-20 sind Schwankungen des dynamischen Bereichs von 1,8 bis 3,5 zu erkennen (Abbildung 32 a). Bereits eine Zugabe von 0,0001 % Tween-20 vermindert die Standardabweichung und höhere Tween-20 Konzentrationen von bis zu 0,1 % Tween-20 ändern den dynamischen Bereich von 1,8 nicht. Daraus resultierte für die weiteren Messungen eine Tween-20 Konzentration von 0,1 %.

Anschließend wurde die DMSO Zugabe untersucht. Da die Substanzen der LOPAC<sup>1280</sup> in DMSO gelöst sind, sollte der Assay stabil gegenüber 10 % DMSO sein, da dies die Endkonzentration an DMSO während des *HTS* ist. Es ist zu erkennen, dass eine Zugabe von 10 % DMSO den dynamischen Bereich nicht verändern (Abbildung 32 b). Die Anwesenheit von 10 % DMSO sollte darum keinen Effekt während des *HTS* haben.

Anschließend wurde das Minimalvolumen innerhalb der Kavitäten bestimmt, um möglichst geringe Mengen aller Substanzen einsetzen zu können. Untersucht wurden verschiedene Füllhöhen von 8  $\mu$ l bis 15  $\mu$ l. Hierbei zeigte sich ab einem Volumen von <12  $\mu$ l eine Verringerung des dynamischen Bereichs (Abbildung 32 c). Folglich wurde als minimales Volumen 12  $\mu$ l festgelegt. Der dynamische Bereich wurde unter den vorher optimierten Bedingungen über einen Zeitraum von 350 Min. gemessen und blieb über diesen Zeitraum stabil (Abbildung 32 d). Daraufhin wurde aus den ermittelten Daten der Z-Faktor über die Zeit errechnet. Der Z-Faktor ist ein statistisches Maß, das den dynamischen Bereich sowie die Fehler mit einberechnet und Information über die Anwendbarkeit eines Assays gibt. Liegt der Z-Faktor über 0,5, wird der Assay als verwendbar für ein *HTS* angesehen. Für den vorgenommen Assay lag der Z-Faktor stabil für mindestens 350 Min. bei ca. 0,65 (Abbildung 32 e). Somit konnte ein *HTS* mit der *Spinach*-RNA als Fluoreszenzmarkierung durchgeführt werden.

#### 4.4.2. High Throughput Screening der LOPAC<sup>1280</sup>

Die Optimierung des Assays führte zu einem stabil über 0,5 liegenden Z-Faktor, sodass im Anschluss die LOPAC<sup>1280</sup>-Substanzbibliothek zu dem Fluoreszenzlöschungskomplex, bestehend aus 12,5  $\mu\text{M}$  PP7-N93C-TF3, 250 nM *Spinach-pp7* und 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI, gegeben wurde. Das Fluoreszenzsignal sollte bei einer inhibierenden Substanz ansteigen, da die *Spinach-pp7* RNA durch einen Inhibitor verdrängt und sich nicht mehr in unmittelbarer Nähe zu der TF3-Markierung des PP7-Proteins befindet. Die erhaltenen Daten des HTS wurden von Dr. Philipp Thiel prozessiert. Ermittelt wurde der sogenannte b-Faktor, der die Abweichung der Fluoreszenz von dem Median der Gesamtheit aller Daten beschreibt. Ein b-Faktor von 3 oder größer wurde als potentieller Inhibitor der *pp7*-PP7-Interaktion angesehen.



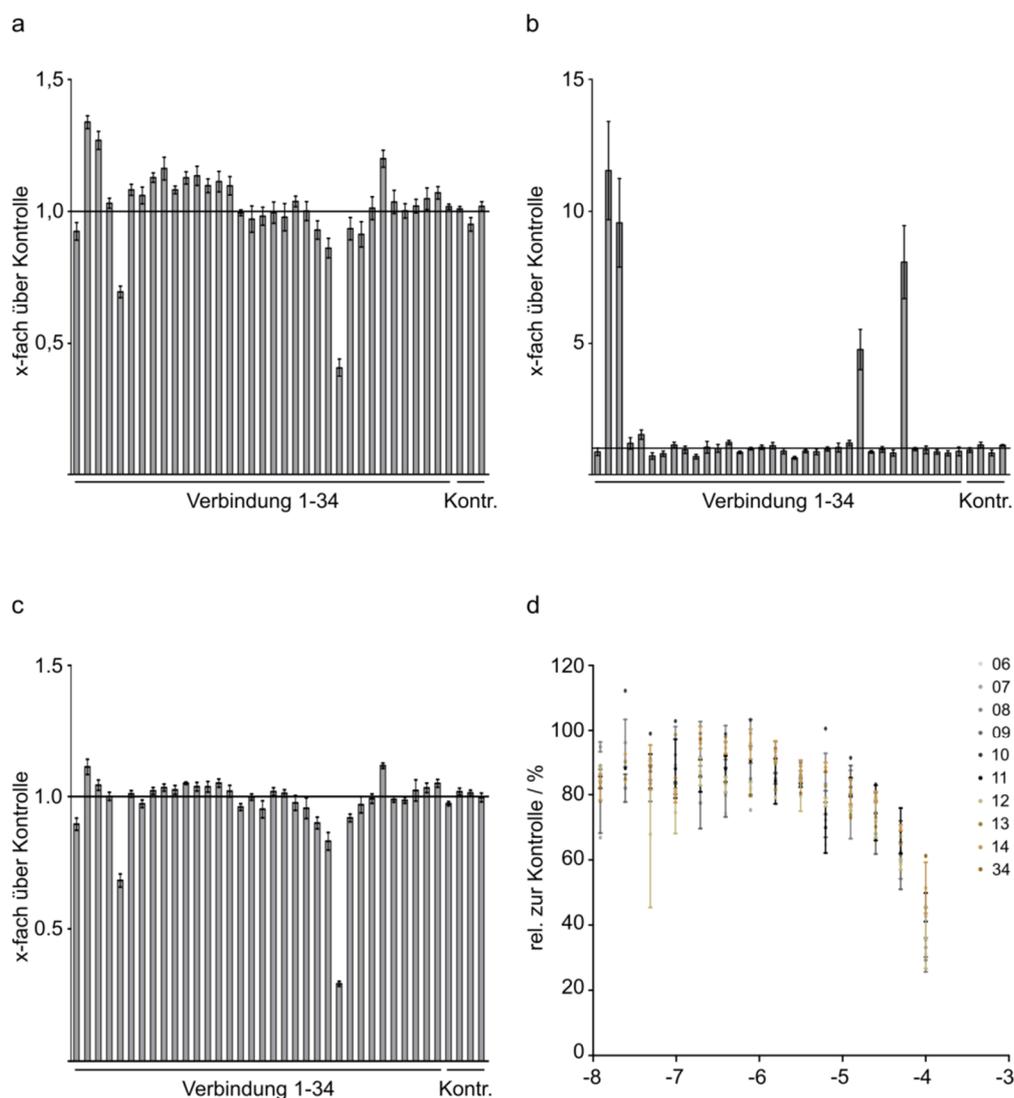
**Abbildung 33:** HTS-Screening der LOPAC<sup>1280</sup> auf dem Fluoreszenzlöschungs-Komplex bestehend aus 250 nM *Spinach-pp7*, 2,5  $\mu\text{M}$  DFHBI-1T und 12,5  $\mu\text{M}$  PP7-N93C-TF3. Die Messung fand mit dem Paradigm-Fluoreszenzmessgerät mit Fluorescein-Filtereinstellungen (Ex = 490 nm, Em = 525 nm) statt. Alle b-Faktoren über 3 wurden als potentielle Kandidaten der *pp7*-PP7 Interaktion angesehen (rot).

Mit diesem Vorgehen konnten 34 potentielle Kandidaten aus der 1416 Substanzen enthaltenen Bibliothek identifiziert werden (Abbildung 33). Das entspricht einer *Hit*-Rate von 2,4 %. Der Großteil von 86,2 % aller Substanzen hatte keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* und der b-Faktor lag zwischen -3 und 3. 157 Substanzen hatten

einen signifikanten Fluoreszenzverlust von *Spinach-pp7* zur Folge. Bei diesen 11,2 % der Substanzen lag der b-Faktor unter  $-3$ .

#### 4.4.3. Validierung des *High Throughput Screenings*

Zur Validierung der identifizierten 34 potentiellen Inhibitoren wurden diese erneut unter *HTS*-Bedingungen, am Safire<sup>2</sup>-Mikroplattenleser unter genauen Einstellungen der Anregungs- und Emissionswellenlängen, getestet (Abbildung 34 a).



**Abbildung 34:** Validierung der *Hits*. (a) Wiederholung des Screenings mit den 34 potentiellen Kandidaten für Inhibitoren der *pp7*-PP7 Interaktion. Die Messung wurde am Safire<sup>2</sup>-Mikroplattenleser vorgenommen und auf die Fluoreszenz des Fluoreszenzlöschungs-Komplexes ohne Zugabe einer Verbindung normalisiert. (Ex = 472 nm, Em = 506 nm, N = 15). (b) Autofluoreszenz der verschiedenen Verbindungen. Es wurde in Anwesenheit von 2,5  $\mu$ M DFHBI und 12,5  $\mu$ M PP7-N93C-TF3 gemessen. (Ex = 472 nm, Em = 506 nm, N = 15). (c) Kontrollmessung der Verbindungen in Abwesenheit von PP7-N93C-TF3 (Ex = 472 nm, Em = 506 nm, N = 15). (d) Titrations der verbliebenen Verbindungen zu dem Fluoreszenzlöschungs-Komplex (Ex = 472 nm, Em = 506 nm, N = 3).

Dabei führen 20 Kandidaten reproduzierbar zu einer höheren Fluoreszenz als der Fluoreszenzlöschungskomplex. Im Anschluss wurden die *Hits* auf Autofluoreszenz untersucht, indem dem Gemisch keine *Spinach-pp7* RNA hinzugefügt wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass 4 der *Hits* eine eindeutige Autofluoreszenz aufwiesen, die ein falsch positives Signal hervorgerufen haben (Abbildung 34 b). Zur weiteren Kontrolle wurden die Substanzen zu der *Spinach-pp7* RNA gegeben, ohne die Zugabe des fluoreszenzmarkierten PP7-Proteins. Hiermit konnten 6 Substanzen ausgeschlossen werden, die eine fluoreszenzsteigernde Wirkung auf die RNA hatten und ein falsch positives Ergebnis geliefert haben (Abbildung 34 c). Dies war bei keinem der getesteten Substanzen der Fall. Die verbliebenen 10 potentiellen Kandidaten wurden zu dem Fluoreszenzlöschungskomplex gegeben, um zu überprüfen, ob sich ein sigmoidal steigender Verlauf der logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenz einstellt. Das konnte für keine der 10 verbliebenen potentiellen Inhibitoren festgestellt werden (Abbildung 34 d). Das *HTS* lieferte somit keinen Inhibitor für die PP7-*pp7* Interaktion.

## 5. Diskussion und Ausblick

### 5.1. Die verschiedenen *Spinach*-RNA-Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene RNA-Konstrukte für die auf FRET basierenden Analysen designt. Die RNA-Konstrukte sollten von unterschiedlichen Biomolekülen wie DNA-Oligonukleotiden oder Proteinen gebunden werden und zugleich mit der *Spinach*-RNA fluoreszent markiert sein. Bei Bindung der konstruierten RNA an die ebenfalls fluoreszent markierten Biomoleküle wurde eine spezifische Fluoreszenzlöschung der *Spinach*-RNA auf Grund von FRET hervorgerufen. Dazu wurden zunächst die verschiedenen *Spinach*-RNA-Konstrukte *Spinach* $\Delta$ 15 und *Spinach-pp7* kloniert, *in vitro* transkribiert und gereinigt (Kapitel 4.1.2.1 und Kapitel 4.2.2.2). Diese beiden Konstrukte, sowie das Konstrukt *Spinach-wt* zum Vergleich (Anhang Kapitel 11.2) wurden auf DNA-Ebene in ein pUC19 Vektorrückgrat kloniert. Das zugrundeliegende Transkriptionssystem unterliegt bei allen Konstrukten dem T7-Promotor und die Transkription wurde mit der T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Da der T7-Terminator die Transkription nur zu ca. 80 % erfolgreich beendet<sup>108</sup>, wurde am Ende des jeweiligen Konstrukts eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle integriert. Durch die Linearisierung des Vektors an der *Xho*I-Restriktionsschnittstelle wurde spätestens an dieser Stelle die Transkription durch die Dissoziation der T7-RNA-Polymerase beendet. Es bestand hier ebenfalls die Möglichkeit, keinen T7-Terminator einzubauen und die Transkription direkt durch die Linearisierung des Vektors an Restriktionsschnittstelle zu beenden. Jedoch ist bei einer zukünftigen *in vivo* Anwendung, bei der der Vektor als Template nicht linear vorliegen kann, ein definiertes Transkriptionseende nötig. Eine Alternative zu dem Einbau eines Terminators besteht hier z. B. in der Verwendung von sogenannten *Hammerhead* Ribozymen. Diese besitzen eine Erkennungsstelle, an der sie enzymatisch schneiden und so kann ein exakt definiertes Transkriptionseende erstellt werden.

Der strukturelle Aufbau der Konstrukte unterschied sich in einigen wesentlichen Punkten. *Spinach-pp7* wurde genauso wie *Spinach-wt* in das t-Lys Gerüst integriert, um die strukturelle Stabilität zu begünstigen<sup>124</sup>. Die Flankierung mit dieser tRNA war bei *Spinach* $\Delta$ 15 nicht möglich, da hier durch Deletion der letzten 15 nt des 3'-Endes der RNA ein freiliegendes 5'-Ende für die DNA-Sonden Hybridisierung generiert wurde (Kapitel 4.1.2.1). Eine Integration in das t-Lys-Gerüst würde eine Hybridisierung der DNA-Sonde behindern.

*Spinach-wt* wurde, um das Konstrukt *Spinach-pp7* zu generieren, in zwei Hälften unterteilt. Die pp7-DNA wurde anstelle der L3-Haarnadelschleife auf den Stamm 3 von *Spinach-wt* positioniert. So konnte gewährleistet werden, dass die transkribierte *Spinach-pp7* RNA an das PP7-Proteindimer binden konnte und fluoreszent markiert vorlag (Kapitel 4.2.2.2). Durch die Unterschiede im Aufbau der RNA-Konstrukte kam es zu verschiedenen Resultaten während der *In-vitro*-Transkription, Reinigung und Fluoreszenzentwicklung im Komplex mit DFHBI oder DFHBI-1T (Tabelle 34).

**Tabelle 34:** Vergleich der verschiedenen Resultate bezüglich der *In-vitro*-Transkription, Reinigung und Fluoreszenzentwicklung von *Spinach-wt*, *SpinachΔ15* und *Spinach-pp7* im Komplex mit DFHBI oder DFHBI-1T.  
n. b. = nicht bestimmt.

	<i>Spinach-wt</i>	<i>SpinachΔ15</i>	<i>Spinach-pp7</i>
<i>In-vitro</i> -Transkription / Min.	100	115	90
Ausbeute der IVT / %	52,2	17,4	55,1
Kalkulierte Masse / g mol <sup>-1</sup>	66841	46293	77963
Retentionsvolumen Gelfiltration / ml	12,93	12,84	11,86
Fluoreszenzintensität in Komplex mit 10 μM DFHBI / %	65 ± 7	6,5 ± 0,7	48,6 ± 0,4
Fluoreszenzintensität im Komplex mit 10 μM DFHBI-1T / %	100 ± 3	11,0 ± 0,8	73,9 ± 0,4
Affinität zu DFHBI / nM	27 ± 4	18 ± 7	19 ± 3
Affinität zu DFHBI-1T / nM	81 ± 14	98±21	96 ± 11
Faltungseffizienz / %	88 ± 3	n. b.	47 ± 2

Die *In-vitro*-Transkription wurde für alle drei Konstrukte identisch durchgeführt und war nach spätestens 115 Min. Reaktionszeit abgeschlossen (Kapitel 4.1.2.1). Die DNA-Template waren alle in den pUC19 Vektor eingebettet und die Transkription startete mit der gleichen Anzahl von Guaninen, was einen Einfluss auf die Transkriptionsausbeute haben kann, da die T7-RNA-Polymerase Guanine am Transkriptionsstart bevorzugt.<sup>125</sup> Dennoch waren Unterschiede in den Ausbeuten der drei RNA-Konstrukte auszumachen. In Relation zur eingesetzten dNTP Menge war für *Spinach-pp7* mit 55,1 % die höchste und für *SpinachΔ15* mit 17,4 % die geringste Ausbeute zu beobachten. Diese, verglichen mit *Spinach-wt* und *Spinach-pp7*, deutlich geringere Ausbeute kann mit dem Fehlen der t-Lys-Struktur zusammenhängen.

Dadurch kann sich eine Fehlfaltung der RNA während der *In-vitro*-Transkription einstellen, was wiederum zu Transkriptionsabbrüchen führen kann. Diese fehlgefalteten Transkripte wurden anschließend durch die chromatographische Reinigung abgetrennt, wodurch die Ausbeute des korrekt gefalteten Konstrukts geringer war. Das verwendete *In-vitro*-Transkriptionssystem beruhte auf einem T7-Promotor und der T7-RNA-Polymerase. Ein anderes System wie z. B. das SP6- oder T3-System könnte die Ausbeuten für das jeweilige RNA-Konstrukt optimieren. Dabei werden andere RNA-Polymerasen mit den passenden Promotoren genutzt, deren Verwendung eventuell zu weniger Transkriptionsabbrüchen führt. Die Optimierung der Menge von den verwendeten Ausgangsreagenzien wie Edukte, Template oder dNTPs können ebenfalls zu einer höheren Ausbeute führen. Jedoch kann hier eine zu große Menge zu einer Substratinhibition führen.

Die verschiedenen RNAs wurden nach der *In-vitro*-Transkription mit der Methode der Größenausschlusschromatographie gereinigt. Je nach molekularem Gewicht und Kompaktheit eluieren die RNA-Moleküle mit unterschiedlichen Retentionsvolumina von dem Größenausschlussmaterial. Dabei eluiert das größere Molekül zuerst, da kleinere Moleküle stärker von den Poren des Säulenmaterials zurückgehalten werden. *Spinach $\Delta$ 15* eluiert dagegen mit einem berechneten Molekulargewicht von 46,3 kDa zu einem ähnlichen Retentionsvolumen von der gleichen Größenausschlussmatrix wie *Spinach-wt* mit einer molekularen Masse von 67 kDa (Tabelle 34). Dies könnte daran liegen, dass *Spinach $\Delta$ 15* vermehrt mit dem Terminator transkribiert wurde und die Polymerase erst an der *Xho*I-Restriktionsschnittstelle abfiel. Der Terminator hinter *Spinach-wt* dagegen scheint effektiver gewesen zu sein und die RNA-Polymerase fiel schon durch die T7-Terminator Haarnadelschleife ab. Ein Vergleich der Retentionsvolumina von *Spinach-wt* und *Spinach $\Delta$ 15* mit *Spinach-pp7* mit einem molekularen Gewicht von 78 kDa ist nicht möglich, da auf Grund der höheren molekularen Masse ein anderes Säulenmaterial gewählt wurde.

Die Fluoreszenzentwicklung bei Bindung an DFHBI bzw. DFHBI-1T war im Vergleich zu *Spinach-wt* bei den designten Konstrukten *Spinach-pp7* um 17–27 % und *Spinach $\Delta$ 15* um 49–89 % weniger hoch. Gerade bei *Spinach $\Delta$ 15* mit einer Fluoreszenzentwicklung von 6,5 % im Komplex mit DFHBI und 11 % im Komplex mit DFHBI-1T relativ zu *Spinach-wt* entwickelte weniger Fluoreszenz als erwartet. Im Zuge der Strukturaufklärung von *Spinach-wt* wurde von Warner *et al.* gezeigt, dass Verkürzungen in der Region des Stammes 1, der für die Bindung der DNA-Sonde um 15 nt gekürzt wurde, keinen Einfluss auf die Fluoreszenz haben. Hier wurden jedoch beide Enden der RNA parallel verkürzt.<sup>83</sup> Die einseitige Verkürzung des 3'-Endes der RNA scheint demnach eine inkorrekte Faltung zur

Folge zu haben. Die demnach nur teilweise gefaltete RNA ist dann nicht mehr in der Lage die richtige Umgebung für die Bindung und Fluoreszenzerhöhung des Chromophors zu bieten. Die Hybridisierung eines komplementären, unmarkierten DNA-Oligonukleotids führte ebenfalls nicht zu einer höheren Effizienz der Fluoreszenz, obwohl *Spinach* $\Delta$ 15 damit komplettiert wurde (Kapitel 4.1.3). Demnach muss am 3'-Ende des Konstrukts ein dNTP-Oligonukleotid die Struktur ergänzen und an deren Stelle kann kein NTP-Oligonukleotid treten.

Obwohl dieses RNA-Konstrukt im Vergleich zu *Spinach-wt* nicht effizient fluoresziert, zeigt sich keine Verminderung der Affinitäten zu den Chromophoren DFHBI und DFHBI-1T. Die Affinität von *Spinach* $\Delta$ 15 im Komplex mit DFHBI betrug 18 nM und im Komplex mit DFHBI-1T 98 nM. Im Vergleich dazu betrug die Affinität von *Spinach-wt* im Komplex mit DFHBI 27 nM und im Komplex mit DFHBI-1T 81 nM. Das hängt damit zusammen, dass die Affinitäten über die Fluoreszenz bestimmt wurden, die durch die Bindung des Chromophors DFHBI an die verschiedenen *Spinach*-RNA Konstrukte entsteht. Ein inkorrekt gefaltetes *Spinach*-RNA Molekül bindet dagegen das Chromophor nicht und es entsteht in diesem Fall keine Fluoreszenz. Die inkorrekt gefaltete RNA-Fraktion war nicht fluoreszent und dieser Anteil wurde somit nicht detektiert. Dadurch wurde die Affinität zu den Chromophoren der fluoreszierenden und demnach korrekt gefalteten RNA bestimmt. Es handelt sich hierbei um die wahrscheinlichste Erklärung und die Bestimmung der Faltungseffizienz für dieses Konstrukt könnte diese Vermutung belegen.

*Spinach-pp7* dagegen zeigte bei der *In-vitro*-Transkription ähnliche Ausbeuten, wie *Spinach-wt*. Jedoch sind ebenfalls Fluoreszenzverminderungen im Komplex mit den Chromophoren bei diesem Konstrukt zu verzeichnen. Im Vergleich zu *Spinach-wt* im Komplex mit DFHBI-1T, entwickelt *Spinach-pp7* im Komplex mit DFHBI 48,6 % und im Komplex mit DFHBI-1T 73,9 % der Fluoreszenz. Der Grund dafür kann wiederum eine geringere Faltungseffizienz sein. Darum wurde für *Spinach-pp7* im Vergleich zu *Spinach-wt* die Faltungseffizienz bestimmt (Kapitel 4.2.2.2). Es ist bekannt, dass RNA-Moleküle, anders als die meisten Proteine, mehrere ähnliche Energieminima in Bezug auf ihre Faltung aufweisen.<sup>126-128</sup> Demnach sind alternative Faltungen von RNA neben der gewünschten, funktionellen Faltung üblicher als bei Proteinen. So wurde für *Spinach-wt* eine Faltungseffizienz von 88 % und für *Spinach-pp7* eine Faltungseffizienz von 47 % bestimmt. Die geringere Fluoreszenzentwicklung von *Spinach-pp7* im Vergleich zu *Spinach-wt* ist demnach auf die geringere Faltungseffizienz dieses Konstrukts zurückzuführen. Durch die Integration der *pp7*-RNA in den Stamm 3 der *Spinach-wt* RNA werden mehr Möglichkeiten

zu alternativen Faltungen generiert. Auffällig ist jedoch, dass bei einem Vergleich der gleichen Menge korrekt gefalteter RNA, *Spinach-pp7* eine höhere Fluoreszenz aufweist als *Spinach-wt*. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Integration der *pp7*-RNA eine Erweiterung des  $\Pi$ -Elektronensystems zur Folge hat. Durch dieses erweiterte  $\Pi$ -Elektronensystem steigt die Fluoreszenz von *Spinach-pp7*. Ebenfalls ist die Affinität zu DFHBI mit 19 nM im Vergleich zur Affinität von *Spinach-wt* zu DFHBI mit 27 nM leicht erhöht, was eine Erklärung für die höhere Fluoreszenzentwicklung des korrekt gefalteten Konstrukts sein kann. Die Affinität zu DFHBI-1T ist dagegen mit 96 nM geringer verglichen zu *Spinach-wt* mit 81 nM. Insgesamt überwiegt jedoch die Fehlfaltung von *Spinach-pp7*, was in einer geringeren Fluoreszenz als die von *Spinach-wt* resultiert. Beide RNA-Konstrukte *Spinach $\Delta$ 15* und *Spinach-pp7* zeigten ausreichend Fluoreszenz, um weitere Messungen durchzuführen. Dabei wurde für die Etablierung der Fluoreszenzlöschungsexperimente DFHBI als Chromophor gewählt, da dieses eine höhere Affinität zu den Konstrukten aufweist als DFHBI-1T. Dagegen wurde im Fall des *HTS*-Assays DFHBI-1T als Chromophor verwendet, da hier eine höhere Fluoreszenzentwicklung zu verzeichnen war und der dynamische Bereich demnach ebenfalls größer ausfiel.

Allgemein fällt auf, dass die ermittelten Bindungen von RNA zu dem Chromophor sowohl im Fall von DFHBI als auch im Fall von DFHBI-1T affiner sind, als die in der Literatur veröffentlichten Werte. Die  $K_D$  für *Spinach-wt* zu DFHBI wurde mit 537 nM angegeben.<sup>65</sup> Eine  $K_D$  für *Spinach* zu DFHBI-1T ist nicht veröffentlicht, da sich allerdings die Werte von *Spinach2* zu DFHBI und zu DFHBI-1T kaum unterscheiden (*Spinach2* zu DFHBI 530 nM und *Spinach2* zu DFHBI-1T 560 nM)<sup>129</sup> ist anzunehmen, dass sich die  $K_D$  von *Spinach* zu DFHBI-1T ebenfalls in einem ähnlichen Bereich befindet. Der sich ergebene Unterschied in den Affinitäten lässt sich durch die verschiedenen Pufferbedingungen erklären. In dieser Arbeit waren mit 300 mM KCl und 15 mM MgCl<sub>2</sub> deutlich mehr Ionen während der Messung anwesend, als bei den veröffentlichten Messungen (125 mM KCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub>).<sup>65</sup> Anhand der Kristallstruktur von *Spinach*-DFHBI wird deutlich, dass gerade K<sup>+</sup>-Ionen an der Stabilisierung des RNA-Chromophor-Komplexes beteiligt sind.<sup>72,83,130</sup>

Zur Optimierung der Fluoreszenz innerhalb eines konkreten Experiments können andere fluoreszente RNA-Tags, wie z. B. der *Spinach2*-RNA verwendet werden. Dabei handelt es sich um eine thermostabilere Version von *Spinach-wt*. Damit ist dieses Konstrukt stabiler gefaltet als *Spinach-wt*.<sup>129</sup> Eine Optimierung der *Spinach-wt* RNA im Hinblick auf die Verwendung in *E. coli* Zellen führte zu der sogenannten *Broccoli*-RNA. Hier wurde das SELEX-Verfahren zur Selektion der RNA durch einen anschließenden FACS-Prozess

erweitert.<sup>78</sup> Zudem wurde eine *Spinach*-Version durch zufällige Mutagenese für die *in vitro* Anwendung optimiert. Das resultierende Konstrukt *iSpinach* ist im Komplex mit DFHBI fluoreszenter und benötigt geringere Salzkonzentrationen, bei höherer Thermostabilität.<sup>80</sup> Durch die Auswahl des geeignetsten fluoreszenten RNA-Aptamers für das durchzuführende Experiment kann die Fluoreszenz und damit auch die Robustheit der jeweiligen Analyse erhöht werden.

Wenn das Assaydesign es zulässt, können ebenfalls andere RNA-Gerüste als das verwendete t-RNA-System genutzt werden.<sup>124</sup> Es ist bekannt, dass das tRNA-Gerüst robust ist und dazu beitragen kann, verschiedene RNA-Strukturen zu stabilisieren. Allerdings wurde für die fluoreszente *Broccoli*-RNA das F30-Gerüst entwickelt, das die Faltung dieses RNA-Aptamers speziell in *E. coli* Zellen unterstützt.<sup>131</sup> So könnten speziell auf das jeweilige Experiment RNA-Gerüste getestet werden, sodass es zu einer optimalen Funktion der RNA kommen kann.

## 5.2. Fluoreszenzlöschungseigenschaften der *Spinach*-RNA

Die Fluoreszenzlöschungseigenschaften der *Spinach*-RNA wurde mit dem RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment (Kapitel 4.1.3) untersucht. Dazu wurde die *Spinach*-RNA an ihrem 3'-Ende um 15 nt verkürzt und somit ein frei zugängliches 5'-Ende generiert. Das resultierende RNA-Konstrukt *Spinach* $\Delta$ 15 war in der Lage, spezifisch über das freie 5'-Ende an komplementäre DNA-Sonden zu hybridisieren (Kapitel 4.1.2.3 und Kapitel 11.6). Über die Hybridisierung der DNA-Sonde konnten verschiedene Fluorophore (TMR, RHO, JOE, Cy3 und PB) in unmittelbare Nähe zu dem Chromophor DFHBI, das innerhalb von *Spinach* $\Delta$ 15 sitzt, gebracht werden. Die roten Fluorophore wiesen zwar ähnliche Anregungs- bzw. Emissionsspektren auf, waren jedoch hinsichtlich ihrer Extinktionskoeffizienten unterschiedlich, sodass die jeweiligen Überlappungsintegrale von Absorptionsspektrum des Akzeptors und Emissionsspektrum des Donors verschieden groß waren (Tabelle 35). Dadurch ergab sich für die verschiedenen Donor / Akzeptor-Kombinationen ein unterschiedlicher Förster-Abstand  $R_0$ . Der Förster-Abstand bezeichnet den Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor, bei dem die FRET-Effizienz  $E$  50 % beträgt. Je höher der  $R_0$ , desto wahrscheinlicher ist, dass das FRET-Signal über einen größeren Abstand zu detektieren ist.<sup>56</sup> Der  $R_0$  war für das rote Fluorophor Cy3 mit 6,5 nm am größten.

**Tabelle 35:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse, die aus dem RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment gewonnen wurden. Abkürzungen: D = Donor, A = Akzeptor,  $\epsilon_A$  = Extinktionskoeffizient des Akzeptors<sup>65,110-113</sup>,  $Q_D$  = Quantenausbeute des Donors.  $J(\lambda)$  = Überlappungsintegral des Donoremissionsspektrums und des Akzeptorabsorptionsspektrums in  $\text{nm}^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ,  $R_0$  = Förster-Abstand, E = FRET-Effizienz,  $r^+$  = über PyMOL<sup>105</sup> bestimmter Abstand zwischen A und D,  $r^*$  = mit Hilfe des *FRET Distance Calculators*<sup>106</sup> berechneter Abstand zwischen D und A.

D	A	$\epsilon_A /$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$Q_D$	$J(\lambda) /$ $\text{nm}^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$	$R_0 /$ nm	Position A	E / %	$r^+ /$ nm	$r^* /$ nm
<i>Spinach</i>	TMR	91000	0,72	$2.87 \times 10^{15}$	5,8	3'	$49 \pm 5$	6,8	5,8
						5'	$86 \pm 2$	3,1	4,32
<i>Spinach</i>	JOE	73000	0,72	$2.82 \times 10^{15}$	5,8	3'	$46 \pm 5$	6,8	5,9
						5'	$84 \pm 3$	3,1	4,4
<i>Spinach</i>	RHO	129000	0,72	$2.33 \times 10^{15}$	5,6	3'	$43 \pm 7$	6,8	5,9
						5'	$86 \pm 2$	3,1	4,1
<i>Spinach</i>	Cy3	150000	0,72	$5.83 \times 10^{15}$	6,5	3'	$60 \pm 2$	6,8	6,1
						5'	$87 \pm 4$	3,1	4,8
<i>Pacific Blue</i>	<i>Spinach</i>	24271	0,78	$6.81 \times 10^{14}$	4,6	3'	77	6,8	3,8
						5'	81	3,1	3,6

Die DNA-Sonden waren entweder am 5'- oder 3'-Ende mit den unterschiedlichen Farbstoffen modifiziert. Dadurch wurden verschiedene Abstände der Fluorophore zu DFHBI als Chromophor in *Spinach* $\Delta 15$  generiert. Nach Durchführung des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenz von *Spinach* $\Delta 15$  in der Nähe der roten Farbstoffe vermindert wurde. Hier war ebenfalls ein Unterschied der Fluoreszenzlöschungseffizienzen zwischen 5'- und 3'-markierten Sonden zu verzeichnen. Die Fluorophore, die am 3'-Ende der DNA-Sonde verknüpft waren, hatten einen theoretischen, mit PyMOL<sup>105</sup> bestimmten Abstand  $r^+$  von 6,8 nm zu DFHBI und eine Fluoreszenzverminderung von *Spinach* $\Delta 15$  von bis zu 60 % zur Folge. Die 5'-modifizierten Sonden dagegen hatten einen geringeren theoretischen Abstand  $r^+$  von ca. 3,1 nm zu DFHBI und eine Fluoreszenzverminderung von *Spinach* $\Delta 15$  von bis zu 87 % zur Folge (Kapitel 4.1.3). Die Abstände  $r^*$  konnten nach Ermittlung der FRET-Effizienzen ebenfalls mit Hilfe des *FRET-Distance Calculators*<sup>106</sup> berechnet werden. Die berechneten Abstände  $r^*$  spiegelten, gegeben durch die FRET-Effizienzen, ebenfalls die Abstandsabhängigkeiten wieder. Allerdings waren im Vergleich zu den mit PyMOL<sup>105</sup> bestimmten Abständen  $r^+$  die  $r^*$  von dem 3'-markierten roten Fluorophor geringer. Hier lagen die Werte zwischen 5,8 nm und 6,1 nm im Gegensatz zu dem graphisch bestimmten  $r^+$  von 6,8 nm. Im Unterschied dazu lagen die Abstände  $r^*$  von den 5'-markierten roten Fluorophoren zu DFHBI mit Werten von 4,1 nm bis 4,8 nm höher als die  $r^+$  mit 3,1 nm. Die Unterschiede zwischen den beiden bestimmten

Abständen lässt sich dadurch erklären, dass die Bestimmung über PyMOL<sup>105</sup> mit Hilfe der Kristallstruktur von *Spinach-wt* durchgeführt wurde. Abgesehen davon, dass in dieser Arbeit mit *SpinachΔ15* gearbeitet wurde und die Struktur dieses Konstrukts nicht bekannt ist, verhält sich ein Biomolekül in Lösung flexibler als in einer kompakten Kristallstruktur. Die Abstandsabhängigkeit wird bei beiden bestimmten Abständen  $r^+$  und  $r^*$  deutlich. Allgemein wurde gezeigt, dass je weiter Donor und Akzeptor voneinander entfernt liegen, die FRET-Effizienz  $E$  geringer ist. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die für FRET typische Abstandsabhängigkeit innerhalb des Hybridisierungsexperiments gültig ist.

Die Abstandsabhängigkeit spricht deutlich für einen Fluoreszenzlöschungseffekt auf Grund von FRET. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die Fluoreszenzverminderung auf eine Mischung von dynamischem und statischem Fluoreszenzlöschungsmechanismus zurückzuführen ist. Dafür können die Fluoreszenzlebenszeiten von *SpinachΔ15* in Abwesenheit und Anwesenheit des Akzeptors bestimmt werden. Die Fluoreszenzlebenszeit nimmt nur im Falle einer Fluoreszenzlöschung, ausgelöst durch FRET in Gegenwart des Akzeptors, ab.<sup>57</sup> Da die Fluoreszenz von *SpinachΔ15* jedoch im Vergleich zu *Spinach-wt* stark verringert ist, gestaltet sich die Messung von Fluoreszenzlebenszeiten als schwierig, da die benötigte Photonenzahl für eine valide Messung gegebenenfalls nicht erreicht werden kann.

Anhand der spezifischen Fluoreszenzlöschung konnten ebenfalls die Affinitäten der verschiedenen markierten DNA-Sonden zu *SpinachΔ15* ermittelt werden. Diese waren für die 3'-modifizierte DNA-Sonden mit ca. 0,04  $\mu\text{M}$  minimal höher als die 5'-modifizierte DNA-Sonden mit ca. 0,06  $\mu\text{M}$ . Dieser Effekt kann darauf beruhen, dass die Fluorophore, je näher sie an dem G-Quadruplex von *SpinachΔ15* sitzen, die dynamische Struktur von diesem stören. Dadurch bindet DFHBI mit einer geringeren Affinität an die *Spinach*-RNA über den G-Quadruplex. Die verschiedenen rot-fluoreszierend markierten DNA-Sonden zeigten nur minimale Unterschiede in den Fluoreszenzlöschungseigenschaften und den bestimmten Affinitäten. Angesichts der ähnlichen Anregungs- und Emissionsmaxima der roten Fluorophore war dies zu erwarten. Die organischen Fluorophore haben höhere Extinktionskoeffizienten und Fluoreszenzintensitäten als *SpinachΔ15*. Eine Abschätzung, ob es zu *Bleedthrough* oder *Crosstalk* unter Verwendung dieser Fluorophore kommen kann, kann trotzdem anhand der normalisierten Spektren getroffen werden. Falls Donor und Akzeptor jedoch in den Fluoreszenzintensitäten zu stark voneinander abweichen, kann es sich auch um kein akzeptables FRET Paar handeln.

*SpinachΔ15* war ebenfalls in der Lage, als Akzeptor in der Gegenwart eines blauen Fluorophors die Fluoreszenz von diesem zu verringern. Hier war allerdings kein Unterschied

zwischen 5'- und 3'-markierter DNA-Sonde auszumachen. Das Hybridisierungsexperiment, welches die roten Fluorophore mit einbezieht, suggeriert jedoch eine Abstandsabhängigkeit. Es handelt sich bei den verwendeten Oligonukleotiden um die gleiche DNA-Sequenz und der einzige Unterschied zwischen den Sonden besteht in der Art des gekoppelten Fluorophors. Es kann es sich im Fall des Hybridisierungsexperiments bei dem Gebrauch des blauen Fluorophors PB eventuell um einen anderen Fluoreszenzlöschungsmechanismus handeln. Eine weitere Erklärung wäre, dass durch die Zugabe von 2 mM RNA bereits das Maximum an Fluoreszenzlöschung, unabhängig von dem Abstand zu dem blauen Fluorophor, erreicht wurde.

Aus diesen Experimenten lässt sich ableiten, dass die *Spinach*-RNA sowohl als Akzeptor als auch als Donor in einem FRET Experiment verwendet werden kann. Als Messgröße lässt sich hier die Verminderung der Donorfluoreszenz festlegen, da eine Akzeptorzunahme weder mit den roten, noch mit den blauen Fluorophoren zu verzeichnen war (Anhang Kapitel 11.8). Hier scheint die Energie von dem Donor zwar auf den Akzeptor übertragen zu werden, jedoch geht der Akzeptor über andere Mechanismen als Fluoreszenz wie z. B. Rotationen oder Vibrationen in den Grundzustand zurück. Es ist ebenfalls möglich, dass die gewählte Messmethode unter Verwendung eines Fluoreszenzreaders nicht sensitiv genug ist, um die geringe Akzeptorzunahme zu detektieren. Eine Möglichkeit wäre hier, anstatt der Fluoreszenz die Fluoreszenzlebenszeit des Akzeptors zu messen. Diese Art der Messung ist sensitiver und schon geringe Änderungen können detektiert werden, wenn genug Photonen innerhalb gegebener Zeit am Detektor gesammelt werden können.

### **5.3. Etablierte Systeme zur Detektion und Analyse von RNA-Protein-Interaktionen**

Da ein abstandsabhängiger, signifikanter Verlust der Donorfluoreszenz mit den rot-fluoreszierenden DNA-Sonden zu messen war, wurde für die Analyse von RPIs zunächst das Protein mit einem roten Fluorophor markiert. Da Cy3 innerhalb des RNA-DNA-Hybridisierungsexperiments das effizienteste Donorquenching hervorrief, wurde die verbesserte Form von Cy3 TideFluor3 (TF3) verwendet. TF3 stellt eine bessere Alternative zu Cy3 dar, da es bei ähnlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen eine erhöhte Fluoreszenzintensität und Konjugationsrate aufweist. Zudem ist das Fluorophor in einem Bereich von 3–11 pH-Wert unabhängig.<sup>117</sup> Bei der Verwendung von verschiedenen roten Fluorophoren innerhalb des DNA-Sonden-Hybridisierungsexperiments sind nur geringe

Unterschiede in den Fluoreszenzlöschungseffizienzen zu messen gewesen, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass TF3 ähnliche Löschungseigenschaften aufweist (Tabelle 36). Da die *Spinach-pp7* RNA von einem PP7 $\Delta$ FG-Dimer gebunden wird, sind zwei TF3-Fluorophore in der Nähe der RNA (Kapitel 4.2.1). Die spezifische Bindung der verschiedenen TF3 markierten PP7 $\Delta$ FG Mutanten wurde über REMSAs verifiziert. Schon hierbei fiel auf, dass die Bindung im Gegensatz zu PP7 $\Delta$ FG schwächer ist.

Die Abstände der Fluorophore zu dem innerhalb der *Spinach*-Struktur sitzenden Chromophor konnten mit der Erstellung eines Modells kalkuliert werden (Kapitel 4.2.1). Dabei war der geringste Abstand innerhalb der N93C-TF3 Mutante mit 4,5 nm zu verzeichnen. Die Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* war in Anwesenheit dieser Mutante mit 65 % am höchsten, was sich mit der Nähe zum Fluorophor begründen lässt (Kapitel 4.2.3). Die im Hybridisierungsexperiment verwendeten DNA-Sonden erzeugten einen Abstand von 6,8 nm im Falle der 3'-Fluoreszenzmarkierung bzw. einen Abstand von 3,1 nm im Falle der 5'-Markierung. Der Abstand für die N93C-TF3 Mutante liegt mit 4,5 nm zwischen diesen Werten und wie zu erwarten liegt die Fluoreszenzlöschung mit 65 % zwischen den ermittelten von ca. 50 % und ca. 90 % im Falle der 5'- bzw. 3'-markierten DNA-Sonde. Für die weiteren Mutanten A22C-TF3 und A62C-TF3 liegen die ermittelten Abstände  $r^+$  bei 5,2 nm und 5,9 nm bzw. bei 4,9 nm und 6,8 nm. Berücksichtigt man hier allein die größeren Abstände der Fluorophore zueinander, dann sprechen die ermittelten Fluoreszenzlöschungseffizienzen von 52 % für A22C-TF3 und 46 % für A62C-TF3 für eine Abstandsabhängigkeit. Diese Abstandsabhängigkeit unterstützt die Hypothese, dass es sich bei dem zugrundeliegenden Fluoreszenzlöschungsmechanismus um einen auf FRET basierenden Mechanismus handelt, da die Energietransferrate zur sechsten Potenz abhängig von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor ist (Formel 10). Die Abstände  $r^*$  wurden über die FRET-Effizienzen berechnet. Hierbei handelt es sich um die mittleren Abstände beider im PP7-Dimer vorhandenen roten Fluorophore. Die FRET-Effizienz unter Verwendung von PP7-A22C-TF3 suggeriert mit 6,2 nm einen höheren Abstand zwischen Donor und Akzeptor als über PyMOL<sup>105</sup> gemessen. Dies könnte jedoch ebenfalls andere Ursachen haben. Die Orientierung beider Fluorophore zueinander spielt ebenso eine wichtige Rolle. Stehen beide Fluorophore z. B in einem 90° Winkel zueinander, findet kein FRET statt. Es ist demnach möglich, dass die Markierung mit TF3 an der A22C-Position keine optimale Ausrichtung der beiden Fluorophore zueinander ermöglicht. Gleiches gilt ebenfalls für die PP7-A62C-TF3 Mutante, hier liegt der berechnete mittlere Abstand  $r^*$  ebenfalls höher als der über PyMOL<sup>105</sup> bestimmte Abstand  $r^+$ . Dagegen stimmen die Abstände, die unter Verwendung der PP7-N93C-TF3 Mutante über PyMOL<sup>105</sup>

gemessen wurden, mit den berechneten FRET-Effizienzen überein. Hier ist der berechnete mittlere Abstand  $r^*$  mit 5,7 nm genauso groß, wie die zuvor durchgeführte Messung mit PyMOL<sup>105</sup> suggeriert hat.

**Tabelle 36:** Eigenschaften der etablierten RPI-FRET-Systeme in Bezug auf die verschiedenen Zusammenstellungen der Fluorophor-Paare. Abkürzungen: D = Donor, A = Akzeptor,  $\epsilon_A$  = Extinktionskoeffizient des Akzeptors<sup>117</sup> in  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ,  $Q_A$  = Quantenausbeute des Akzeptors,  $Q_D$  = Quantenausbeute des Donors, E = ermittelte FRET Effizienz,  $J(\lambda)$  = Überlappung des Donoremissionsspektrums mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum in  $\text{nm}^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$  (berechnet mit  $\text{ale}^{103}$ , Kapitel 3.1.12),  $R_0$  = Förster-Abstand (berechnet mit *Förster Distance Calculator*<sup>104</sup>, Kapitel 3.1.12),  $r^+$  = Abstand zwischen Donor und Akzeptor (ermittelt mit PyMOL<sup>105</sup>, Kapitel 3.1.12),  $r^*$  = Abstand zwischen Donor und Akzeptor (ermittelt mit *FRET Distance Calculator*<sup>106</sup>, Kapitel 3.1.12), n. b. = nicht bestimmt, n. s. = nicht signifikant. Weitere zur Berechnung verwendete Parameter: Brechungsindex  $n = 1,33$  und Orientierungsfaktor  $\kappa^2 = 2/3$ .

D	A	$\epsilon_A /$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$Q_D$	$J(\lambda) /$ $\text{nm}^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$	$R_0 /$ nm	Position A	E / %	$r^+ /$ nm	$r^* /$ nm
<i>Spinach</i>	TF3	150000	0,72	$4.79 \times 10^{15}$	6,3	A22C	$52 \pm 1$	5,2	6,2
						A62C	$46 \pm 4$	4,9	6,5
						N93C	$65 \pm 2$	4,5	5,7
<i>Spinach mCherry</i>		72000	0,72	$1.92 \times 10^{15}$	5,4	N-terminal	$17 \pm 5$	n. b.	6,8
						C-terminal	n. s.	n. b.	8,3

Die bestimmten Affinitäten der verschiedenen TF3 markierten Mutanten wurden für A22C mit  $1,8 \mu\text{M}$ , für A62C mit  $2,9 \mu\text{M}$  und für N93C mit  $1,9 \mu\text{M}$  bestimmt. Die A62C-TF3-Mutante zeigte damit die geringste Affinität zu *Spinach-pp7*, was zudem ein Grund für die geringere Fluoreszenzlöschung von 46 % sein kann. Die Affinitäten liegen im mikromolaren Bereich, was eine Abweichung zu der veröffentlichten Affinität der *pp7*-RNA zu PP7 $\Delta$ FG von  $1,6 \text{ nM}$  darstellt (Tabelle 37).<sup>53,55</sup> Das kann daran liegen, dass der Fluorophor TF3 über hydrophobe Bindungen die  $\beta$ -Oberfläche blockieren kann. Diese störende Interaktion wäre während der Größenausschlusschromatographie nicht aufgelöst worden. Die hydrophobe  $\beta$ -Struktur des PP7 $\Delta$ FG stellt die Bindefläche für die *pp7*-RNA-Haarnadel dar, sodass die Bindung unwahrscheinlicher wird, wenn diese blockiert ist. Die Analyse der Stöchiometrie von dem TF3-Fluorophor zu der PP7-Mutante kann Aufschluss darüber geben, ob wie gewollt nur ein TF3-Molekül pro PP7-Monomer kovalent gebunden hat.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die *Spinach* Fluoreszenz über eine RPI spezifisch vermindert werden kann. Das stellt die Grundlage für Untersuchungen anderer RPIs sowie für die Etablierung des *HTS* Assays dar. Eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz war auch hier nicht zu beobachten (Kapitel 11.8). Die Gründe hierfür können die gleichen wie die in Kapitel 5.2 diskutierten sein.

Des Weiteren wurde die *Spinach-pp7*-PP7 $\Delta$ FG Interaktion über eine Fluoreszenzlöschungsanalyse untersucht, bei dem das PP7 $\Delta$ FG N- bzw. C-terminal mit *mCherry* modifiziert vorlag. Auch hier wurde die Interaktion zunächst über REMSA verifiziert (Kapitel 4.2.3). Dabei waren keine Unterschiede in dem Migrationsverhalten zwischen *mCherry*-markiertem und unmarkiertem Protein zu erkennen. Alle PP7-Proteine waren in der Lage, die Migration der *Spinach-pp7*-RNA konzentrationsabhängig zu verlangsamen. Es ist daher anzunehmen, dass die Affinität zu *Spinach-pp7* durch die Fusion mit *mCherry* nicht verändert wurde.

Das C-terminal fusionierte PP7 $\Delta$ FG zeigte eine nicht signifikante Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* (Tabelle 36). Die fehlende Signifikanz kommt dadurch zu Stande, dass auch die Negativkontrolle *mCherry* durch Zugabe in höheren Konzentrationen eine Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* bedingt. Die Anwesenheit von 250 mM NaCl milderte diesen Effekt ab, schwächte allerdings auch die Bindung von *mCherry*-PP7 $\Delta$ FG und PP7 $\Delta$ FG-*mCherry* an die RNA. Eine Optimierung der Pufferbedingungen könnte demnach hier den Beweis erbringen, dass das C-terminal fusionierte Protein ebenfalls einen signifikanten Fluoreszenzlöschungseffekt auf *Spinach-pp7* hat.

Das N-terminal fusionierte *mCherry*-PP7 $\Delta$ FG erzeugte eine Fluoreszenzlöschung von *Spinach-pp7* um 20 % relativ zu den Kontrollen *mCherry* und unmarkiertes PP7 $\Delta$ FG (Tabelle 36, Kapitel 4.3.2). Die geringere Fluoreszenzlöschung, im Vergleich zu dem DNA-Sonden-Hybridisierungsexperiment und der RPI-Analyse mit TF3 markiertem Protein, lässt sich mit dem größeren Abstand der Fluorophore zueinander erklären. Das intrinsisch gebildete Chromophor innerhalb von *mCherry* liegt 6,8 nm von DFHBI entfernt, sodass eine Fluoreszenzlöschung von 17 % ein akzeptables Resultat darstellt, hinsichtlich der Tatsache, dass FRET nur bis zu einem Abstand von 10 nm stattfinden kann. Außerdem spielt hier der geringere Extinktionskoeffizient von *mCherry* und damit das im Vergleich zu dem TF3 markierten Protein geringere Überlappungsintegral von Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrum eine Rolle. Der dadurch resultierende Förster-Abstand von 5,4 nm, bedeutet, dass bei diesem Abstand zwischen Akzeptor und Donor die FRET-Effizienz E 50 % beträgt. Da der Abstand zwischen Akzeptor und Donor hier größer ist, ist die FRET-Effizienz zur sechsten Potenz geringer.

Mit Hilfe dieses Experiments wurde die Affinität der Interaktion mit 140 nM bestimmt. Dieser Wert unterscheidet sich von dem in der Literatur beschriebenen  $K_D$ -Wert von 1,6 nM<sup>53,55</sup>. Der Verlust der Affinität um ca. Faktor 100 kann hier durch die Verwendung von 250 mM NaCl im Puffer verzeichnet werden, um die nicht spezifischen Wechselwirkungen

von *mCherry* zu der RNA zu vermindern. Es ist auch möglich, dass die hohe KCl-Konzentration im Puffer die Bindung der RNA an das Protein stört. Jedoch konnte in der weiteren Literatur gefunden werden, dass die Erhöhung der KCl-Konzentration bis zu 1 M nur eine 4-fache Steigerung der Dissoziationskonstanten zur Folge hatte (Tabelle 37)<sup>53</sup>. Hier unterschied sich jedoch die *pp7*-RNA-Sequenz deutlich von der in dieser Arbeit verwendeten und es wurde das PP7-Protein in voller Länge (PP7FL) verwendet. Dadurch bildet das PP7-Proteindimer eine Hüllstruktur aus, was wiederum einen positiven Einfluss auf den  $K_D$ -Wert haben könnte.

**Tabelle 37:** Zusammenstellung der, in der Literatur beschriebenen und in dieser Arbeit gewonnenen,  $K_D$ -Werte der *pp7*-RNA:PP7-Protein-Interaktion. Die Sequenzübereinstimmung der *pp7*-RNA unter den verschiedenen Methoden wurde fett markiert. Abkürzungen: PP7FL= PP7-Protein in voller Länge.

$K_D$	<i>pp7</i> -RNA-Sequenz	PP7-Protein	Methode	Quelle	Puffer
1,0 – 4,0 nM	uaaggaguuu <b>auaugga</b> aaccuuu ([ $\alpha$ -32P]ATP)	PP7FL	Filterbindungs- -assay	Peabody <i>et al.</i> , 2001 <sup>53</sup>	Verschiedene Pufferbedingungen: 0,1 M MOPS (pH = 6,2-7,7 oder Tris-HCl (pH = 7,0- 8,5), 0,4 – 1 M KCl, 10 mM MgAc <sub>2</sub>
1,6 ± 0,4 nM	g <b>cgcacagaagauaugg</b> <b>cuucgugc</b> gc	PP7 $\Delta$ FG	REMSA	Singer <i>et al.</i> , 2007 <sup>55</sup>	10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 25 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,01 mg ml <sup>-1</sup> tRNA, 50 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> Heparin, 0,01 % (w/v) IGEPAL CA630
1,8 $\mu$ M	<b>ggcacagaagauauggc</b> <b>uucgugc</b> c	PP7 $\Delta$ FG- A22C- TF3	FRET-Assay	diese Arbeit	50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 300 mM KCl, 2 mM Spermidin
2,9 $\mu$ M	<b>ggcacagaagauauggc</b> <b>uucgugc</b> c	PP7 $\Delta$ FG- A62C- TF3	FRET-Assay	diese Arbeit	50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 300 mM KCl, 2 mM Spermidin
1,9 $\mu$ M	<b>ggcacagaagauauggc</b> <b>uucgugc</b> c	PP7 $\Delta$ FG- N93C- TF3	FRET-Assay	diese Arbeit	50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 300 mM KCl, 2 mM Spermidin
140 nM	<b>ggcacagaagauauggc</b> <b>uucgugc</b> c	mCherry- PP7 $\Delta$ FG	FRET-Assay	diese Arbeit	50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 300 mM KCl, 250 mM NaCl, 2 mM Spermidin

Ebenfalls ist es nicht auszuschließen, dass die Fluoreszenzmarkierung der *pp7*-RNA mit der *Spinach*-RNA einen Einfluss auf die Bindeaffinität zu dem Protein hat. Hier wäre ein Vergleich mit der Bindung von unmarkierter *pp7*-RNA und PP7 $\Delta$ FG nötig, die z. B. über ein

REMSA ermittelt werden kann. Dagegen kann ein Verlust der Affinität durch die Fusion an *mCherry* ausgeschlossen werden, da PP7 $\Delta$ FG im REMSA eine ähnliche Bindung zu *Spinach-pp7* gezeigt hat (Abbildung 30).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das genetisch kodierbare System zur Analyse von RPIs innerhalb von Zellen anwendbar ist. Die *Spinach-pp7*-RNA konnte erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) Zellen überexprimiert werden und nach Zugabe von DFHBI konnte eine signifikante Fluoreszenzerhöhung gemessen werden. Das *mCherry*-PP7-Protein wurde anschließend zu dem Lysat dieser Zellen gegeben und ein FRET-Signal konnte in demselben Maße, wie es *in vitro* gemessen wurde, detektiert werden (20 %). Ein Problem stellte hier die richtige Stöchiometrie der Bindepartner zueinander dar, weshalb *mCherry*-PP7 gereinigt zu dem Lysat gegeben und nicht ebenfalls in Zellen überexprimiert wurde. Um in humanen Zellen ein Signal detektieren zu können, wäre es von Vorteil, wenn beide Komponenten in der Zelle exprimiert werden würden. Eine Kolo-kalisation von Donor und Akzeptor durch die Bindung von RNA und Protein könnte anschließend in humanen Zellen mikroskopisch detektiert werden. Um die Interaktion jedoch zu verifizieren, könnten die Fluoreszenzlebenszeiten von Donor und Akzeptor detektiert werden, um ein eindeutiges Signal zu bekommen.

Insgesamt konnte mit beiden Herangehensweisen die Interaktion spezifisch nachgewiesen und die Affinität von RNA und Protein zueinander analysiert werden. Gerade in dem Fall, indem das Protein genetisch kodiert mit *mCherry* fusioniert vorlag, können weitere Optimierungen nützlich sein, da es sich um ein komplett genetisch kodierbares System handelt. Damit ist es ein guter Kandidat für zukünftige *in vivo* Anwendungen. Solche Optimierungen sollten sich vor allem auf die *Spinach*-RNA beziehen. Sie sollte die Robustheit und Faltungseffizienz besitzen, dass sie durch die Fusion mit der RNA von Interesse nicht ihre Struktur und dadurch auch ihre Fluoreszenz verliert. Außerdem wären eine höhere Quantenausbaute von Vorteil sowie die Weiterentwicklung der RNA-Konstrukte mit anderen spektralen Eigenschaften, um Multiplexen möglich zu machen. Für *in vivo* Anwendung wäre die höhere Fluoreszenz zudem von Vorteil, um die Fluoreszenzlebenszeiten messen zu können. Hierdurch könnten innerhalb von humanen Zellen direkte RPIs anhand der Abnahme der Fluoreszenzlebenszeit des Donors detektiert werden.

#### 5.4. Etablierung des *High Throughput Screenings*

In der Literatur sind nur wenige Beispiele von *HTS* Assays zur Detektion von Inhibitoren für RPIs bekannt.<sup>123</sup> Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, das in Kapitel 4.2.1 etablierte Fluoreszenzlöschungssystem hinsichtlich der Anwendbarkeit innerhalb eines *HTS* zu prüfen. Die *pp7*-RNA lag dabei mit *Spinach* fluoreszenzmarkiert vor und die Mutante N93C des PP7 $\Delta$ FG Proteins war mit dem chemischen Farbstoff TF3 markiert. Unter Beachtung der zuvor optimierten Bedingungen (Tween-20- und DMSO-Konzentration und Kavitätenvolumen), blieb der dynamische Bereich über einen Zeitraum von mindestens 5 h stabil zwischen 1,6 und 2. Unter Einbeziehung der Standardabweichungen errechnet sich der Z-Faktor<sup>132</sup>, der über den gleichen Zeitraum bei 0,65 liegt. Damit wird der Assay laut Definition als exzellent eingestuft.<sup>132</sup> Jedoch ist hier zu beachten, dass die Standardabweichung eine große Rolle in der Berechnung des Z-Faktors spielt und hier eine Datenmenge von  $N = 15$  eventuell als zu klein erachtet werden kann.

Das initiale Screening wurde an dem Paradigm-Mikroplattenleser unter Verwendung von Fluorescein-Filtersets durchgeführt ( $E_x = 490$  nm,  $E_m = 525$  nm). Das entspricht nicht den optimalen Werten für den *Spinach*-DFHBI-1T Komplex, der ein Anregungsmaximum von 472 nm und ein Emissionsmaximum von 506 nm hat. Nach Durchführung des *Screenings* wurden aus den Fluoreszenzwerten von *Spinach-pp7* die b-Faktoren berechnet. Dabei handelt es sich um die Abweichung des Medians aller erhaltenen Werte. Diese Art der Auswertung ist nur unter der Annahme möglich, dass es bei der Mehrheit aller Werte zu keiner Fluoreszenzänderung nach Zugabe der Substanzen kommt und diese Werte sich nach Gauß verteilen. Im Mittel lag der b-Faktor der Negativkontrollen demnach bei 0. Zudem lagen 86,2 % der Werte um den Nullpunkt verteilt zwischen einem b-Faktor von  $-3$  bis 3. Das gibt einen Hinweis über die gute Qualität der Auswertung. 11,2 % der Substanzen verringerten die Fluoreszenz von *Spinach-pp7* soweit, dass der ermittelte b-Faktor unter einem Wert von  $-3$  lag. Das spricht dafür, dass die Stabilität dieser RNA-Population gegenüber diesen organischen Molekülen nicht mehr gegeben ist. Sie verändern die Struktur der RNA und damit verhindern sie die Bindung zu DFHBI-1T, sodass weniger oder keine Fluoreszenz mehr zu messen war. Es ist nicht auszuschließen, dass unter den 11,2 % dieser Substanzen falsch negative vorhanden waren. Diese könnten die *pp7*-PP7-Interaktion inhibiert haben, indem sie die RNA gebunden haben und gleichzeitig aber die Struktur dieser so geändert haben, dass ebenfalls die Fluoreszenz inhibiert wurde.

Alle Substanzen, die einen b-Faktor über 3 erreichten, wurden als Hits betrachtet. Insgesamt lagen 34 *Hits* über einem b-Faktor von 3, was einer initialen *Hit*-Rate von 2,4 % entspricht. Zur Validierung wurden diese Hits zunächst unter Assaybedingungen am Safire<sup>2</sup>-Mikroplattenleser erneut vermessen. Der Vorteil der Verwendung des Safire<sup>2</sup>-Mikroplattenlesers im Gegensatz zum Paradigm- Mikroplattenleser war, dass die Anregungs- und Emissionswellenlängen exakt eingestellt werden konnten. Hierzu wurde das Experiment zunächst unter *HTS* Bedingungen mit den 34 *Hits* wiederholt (Abbildung 35). Dabei stellte sich heraus, dass 20 der *Hits* reproduzierbar eine höhere Fluoreszenz als der Fluoreszenzlöschungskomplex aufwiesen.

Validierungsschritt	Bibliothek	initialer Screen am Paradigm	Wiederholung des Screenings am Safire <sup>2</sup>	Prüfung auf Autofluoreszenz	Prüfung auf nicht-spezifische Fluoreszenz	Titration
Anzahl Kandidaten	1416	34	20	16	10	0
Kandidaten / %	100	2,4	1,4	1,1	0,7	0,0

**Abbildung 35:** Graphische Darstellung des Validierungsprozesses nach dem initialen Screening der Testbibliothek.

Ein Grund für die Differenz zwischen beiden Mikroplattenlesern kann sein, dass einige Substanzen während des initialen *HTS* am Paradigm-Mikroplattenleser auf Grund von Autofluoreszenz eine Fluoreszenzsteigerung zeigten. Unter den optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen am Safire<sup>2</sup>-Mikroplattenleser erscheinen diese Moleküle dann nicht mehr autofluoreszent. Um die autofluoreszierenden Substanzen herauszufiltern, die auch unter den optimalen Wellenlängen eine Signalerhöhung hervorrufen, wurde die Messung ohne Zugabe der RNA wiederholt. Dabei stellte sich heraus, dass 4 der *Hits* eine eindeutige Autofluoreszenz aufwiesen, die ein falsch positives Signal hervorgerufen haben. Des Weiteren wurde die Messung ohne Zugaben von fluoreszenzmarkiertem Protein durchgeführt, um zu auf nicht spezifische Fluoreszenz zu testen. Dabei wurden weitere 6 Substanzen, die eine Fluoreszenzerhöhung der RNA zur Folge haben, ohne die RNA zuvor gequenchet vorlag, herausgefiltert. Die verbliebenen 10 Substanzen wurden zu dem Fluoreszenzlöschungskomplex titriert, um eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzsteigerung zu detektieren und somit den jeweiligen EC<sub>50</sub>-Wert zu bestimmen (Abbildung 34 d). Auf diese Weise konnte kein organisches Molekül identifiziert werden, dass spezifisch die *pp7*-*PP7*-Interaktion inhibiert, sodass es sich bei allen durch den *HTS* identifizierten Substanzen um falsch positive *Hits* gehandelt haben könnte.

Das kann zum einen an der Größe der Substanzbibliothek liegen, bei der es sich nur um eine kleine Testbibliothek handelt. Es ist möglich, dass sich kein Inhibitor in der Bibliothek befand. Da die 10 Hits vor der Titration jedoch den bisherigen Validierungsschritten standhielten, ist es notwendig einen komplementären Assay zu der durchgeführten Titration vorzunehmen, um dieses Ergebnis zu widerlegen oder zu bestätigen. Hierzu eignet sich z. B. ein REMSA, bei dem mit steigenden Konzentrationen der Inhibitor-Kandidaten eine Komplexbildung verhindert wird.

Das Ziel des Assays war es zu zeigen, dass *Spinach*-DFHBI innerhalb eines solchen *HTS*-Assays funktioniert und es war nicht das Ziel, Inhibitoren für die verwendete Modell-RPI zu entwickeln. Darum ist das Screening als erfolgreich zu bewerten. Insgesamt konnte mit dem Assay gezeigt werden, dass der Einsatz von fluoreszenten RNA-Tags in FRET-basierten Interaktionsstudien und in einem *HTS* zur Identifizierung von Inhibitoren solcher Interaktionen unter Beachtung der oben diskutierten Punkte verwendet werden kann.

## 6. Zusammenfassung

Interaktionen von RNA mit anderen Biomolekülen rücken immer mehr in den Fokus der Forschung. Darum sind homogene Untersuchungsmethoden zur Analyse von RNA-Interaktionen von großem Interesse. Im Zuge dieser Arbeit wurden neue Methoden entwickelt, die die Analyse von RNA-Protein-Interaktionen ermöglichen. Diese Experimente basieren auf dem Prinzip des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) unter Verwendung der fluoreszenten *Spinach*-RNA.

Zunächst wurde gezeigt, dass *Spinach*-DFHBI als Donor oder Akzeptor FRET eingehen kann. Die ursprüngliche *Spinach-wt* RNA wurde am 3'-Ende um 15 nt verkürzt (*Spinach $\Delta$ 15*), um so ein zugängliches 5'-Ende für die Hybridisierung einer fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde zu erzeugen. Nach der Bindung von komplementären DNA-Sonden, die am 3'- oder 5'-Ende mit roten Fluoreszenzfarbstoffen als FRET-Akzeptoren markiert waren, konnte ein spezifisches Quenching von *Spinach $\Delta$ 15* im Komplex mit DFHBI detektiert werden. Ebenfalls konnte die für FRET typische Abstandsabhängigkeit ermittelt werden. Fluorophore, die am 5'-Ende der Sonde lokalisiert waren, hatten einen geringeren Abstand zu DFHBI als das 3'-Fluorophor und zeigten eine höhere Fähigkeit *Spinach $\Delta$ 15* zu quenchen. Dabei erzeugte das Fluorophor Cy3 die höchste Quenchingeffizienz. Das RNA-DNA-Hybridisierungsexperiment hat bewiesen, dass die *Spinach* RNA innerhalb eines FRET-basierten Aufbaus genutzt werden kann.

Anschließend wurde dieses System auf eine RPI übertragen. Dazu wurde die Interaktion zwischen dem PP7-Protein und der *pp7*-RNA verwendet. Auf der einen Seite wurden dafür verschiedene Cystein-Mutanten von PP7 $\Delta$ FG kloniert, sodass nach erfolgreicher Expression über eine Michael-Addition das rote Fluorophor TF3 eingeführt werden konnte. TF3 wurde als bessere Alternative zu Cy3 verwendet, da es bei ähnlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen eine erhöhte Fluoreszenzintensität und Konjugationsrate aufweist. Auf der anderen Seite wurde die *pp7*-RNA mit der *Spinach*-RNA fluoreszent markiert, indem die *pp7*-RNA in den Stamm 3 (P3) von *Spinach* integriert wurde (*Spinach-pp7*). Die Bindung von Protein und RNA wurde über REMSAs verifiziert. Es konnte eine signifikante Abnahme der *Spinach-pp7* Fluoreszenz nach Bindung an fluoreszenzmarkiertem Protein detektiert und die  $K_D$ -Werte der jeweiligen Mutanten mit 1,8–2,9  $\mu$ M bestimmt werden.

Weiterführend wurde die Methode genetisch kodierbar gestaltet, indem der chemische Fluorophor TF3 durch den biologischen Fluorophor *mCherry* ausgetauscht wurde. Dazu wurde PP7 $\Delta$ FG N- bzw. C-terminal mit der für *mCherry* kodierenden Sequenz kloniert und

das Protein anschließend exprimiert und gereinigt. Die Bindung an *Spinach-pp7* konnte über REMSAs verifiziert werden. Hier zeigte sich im Gegensatz zu den PP7-TF3-Mutanten kein Unterschied in der Bindungsaffinität im Vergleich zu unmarkiertem PP7 $\Delta$ FG. Die Titration von (N)-*mCherry*-PP7 und (C)-PP7-*mCherry* zu *Spinach-pp7* zeigte ebenfalls ein Quenching von *Spinach-pp7*. (C)-PP7-*mCherry* zeigte einen leichten Fluoreszenzverlust, der aufgrund von Schwankungen im Vergleich zu den Kontrollen *mCherry* und PP7 $\Delta$ FG nicht signifikant war. Für (N)-*mCherry*-PP7 war dagegen ein signifikanter Fluoreszenzverlust von 20 % zu verzeichnen. Der  $K_D$ -Wert von (N)-*mCherry*-PP7 zu *Spinach-pp7* wurde mit 140 nM bestimmt. Im Anschluss wurde gezeigt, dass *Spinach-pp7* in *E. coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert werden kann und das Lysat in der Lage ist, die Fluoreszenz von DFHBI zu erhöhen. Nach Zugabe von gereinigtem (N)-*mCherry*-PP7 konnte hier im selben Maße, wie es *in vitro* gemessen wurde, eine Fluoreszenzabnahme detektiert werden. Dieses Experiment zeigte, dass die *Spinach*-RNA in einem genetisch kodierbaren und FRET-basierten Versuchsaufbau sowohl *in vitro* als auch in Lysaten genutzt werden kann.

Abschließend wurde das zuvor etablierte Experiment, das die TF3 markierte Mutante PP7-N93C und *Spinach-pp7* beinhaltet, in einem *High Throughput Screening (HTS)* genutzt. Dabei diente der hier vorgenommene Assay als erster Nachweis, dass *Spinach*-DFHBI in einem *HTS* verwendet werden kann. Als *Readout* wurde hier die Zunahme der *Spinach-pp7* Fluoreszenz gewählt, die dann eintritt, wenn die Interaktion inhibiert wird. Nach Optimierung des *HTS* wurde die Substanzbibliothek LOPAC<sup>1280</sup> getestet. Dabei wurden 34 potentielle Inhibitoren identifiziert, die sich nach der Validierung durch Titration als falsch positive initiale Hits herausstellten. Hier stellen komplementäre Assays den nächsten Schritt dar, um das Ergebnis zu widerlegen oder zu bestätigen.

Insgesamt konnten die Experimente beweisen, dass die *Spinach*-RNA zur Analyse von RPIs innerhalb eines FRET-basierten Systems genutzt werden kann. Damit wurde das Methodenspektrum für homogene Untersuchungsmethoden für RNA-Interaktionen erweitert. Eine weitere Optimierung der fluoreszenten RNA-Aptamere hinsichtlich anderer Farben, besserer Affinitäten zu den Chromophoren oder Helligkeiten der Komplexe kann es ermöglichen, hier das Anwendungsspektrum weiter zu verbreitern und zu verbessern.

## 7. Summary

Interactions of RNA with other biomolecules are increasingly becoming the focus of research. Therefore, homogeneous examination methods are of great interest for the investigation of RNA interactions. In the course of this work, a new method was developed that allows the analysis of RNA-Protein-Interactions. These experiments were based on the principle of Förster resonance energy transfer (FRET) using the fluorescent *Spinach* RNA.

First it was demonstrated that *Spinach*-DFHBI can enter FRET as a donor or acceptor. The original *Spinach-wt* RNA was shortened by 15 nt at the 3' end (*Spinach $\Delta$ 15*) to generate a freely accessible 5' end, which was used for the hybridization of a fluorescent-labeled DNA probe. After the binding of complementary DNA probes labeled as FRET acceptors with red fluorescent dyes at the 3' or 5' end, a specific quenching of *Spinach $\Delta$ 15* in the complex with DFHBI could be detected. The distance dependency typical for FRET could also be determined. There were differences in the fluorescence quenching between the labeling sites at the 5' or 3' end of the DNA probe detectable. Fluorophores located at the 5' end of the probe had a smaller distance to DFHBI than the 3' fluorophore and displayed a higher ability to quench *Spinach $\Delta$ 15*. The fluorophore Cy3 produced the highest quenching efficiency. The RNA-DNA-hybridization experiment has proven that *Spinach*-RNA can be used within a FRET-based setup.

This system was then transferred to an RPI. For this, the interaction between the PP7 protein and the *pp7*-RNA was used. On the one hand, different cysteine mutants of PP7 $\Delta$ FG were cloned, so that after successful expression, the red fluorophore TF3 could be introduced via a Michael addition. As a better alternative to Cy3, TF3 was used as it has stronger fluorescence intensity, higher conjugation yield and longer shelf life. On the other hand, the *pp7*-RNA was fluorescently labelled with the *Spinach*-RNA by integrating the *pp7*-RNA into *Spinaches'* stem 3 (P3) (*Spinach-pp7*). The binding of protein and RNA was verified via REMSAs. A significant decrease in *Spinach-pp7* fluorescence after binding to fluorescence-labeled protein was detected and the  $K_D$  values of the respective mutants were determined to be 1.8–2.9  $\mu$ M. Further, the method was designed to be genetically codable by replacing the chemical fluorophore TF3 with the biological fluorophore mCherry. Therefore, PP7 $\Delta$ FG was cloned N- or C-terminal with the sequence coding for mCherry and the protein was subsequently expressed and purified. The binding to *Spinach-pp7* was verified via REMSAs. In contrast to the PP7-TF3 mutants, there was no difference in binding affinity compared to unlabeled PP7 $\Delta$ FG. The titration of (N)-mCherry-PP7 and (C)-PP7-mCherry to *Spinach-pp7* also

displayed quenching of *Spinach-pp7*. (C)-PP7-mCherry exhibited a slight fluorescence loss which was not significant due to fluctuations compared to controls mCherry and PP7 $\Delta$ FG. For the (N)-mCherry-PP7, however, a significant fluorescence loss of 20% was observed. The  $K_D$  of (N)-mCherry-PP7 to *Spinach-pp7* was determined to be 140 nM. Subsequently it was demonstrated that *Spinach-pp7* can be expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells and the lysate is able to increase the fluorescence of DFHBI. After the addition of purified (N)-mCherry-PP7, a fluorescence decrease could be detected to the same extent as measured *in vitro*. This experiment illustrates that the *Spinach*-RNA can be used in a genetically coded and FRET-based experimental setup both *in vitro* and in lysates.

Finally, the previously established experiment, which contains the TF3-labeled mutant PP7-N93C and *Spinach-pp7*, was used in an HTS. The assay used here served as the first proof that *Spinach*-DFHBI is applicable in an High Throughput Screening (HTS). The increase in *Spinach-pp7* fluorescence, which occurs when the interaction is inhibited, was selected as a readout. After optimization of the HTS, the library LOPAC<sup>1280</sup> was tested. 34 potential inhibitors were identified which, after titration validation, were found to be false positive initial hits. Here, complementary assays represent the next step to refute or confirm the result. Overall, these experiments have proven that the *Spinach*-RNA can be used to analyze RPIs in a FRET-based system. This extended the range of methods for homogeneous methods of investigation for RNA interactions. Further optimization of the fluorescent RNA aptamers with regard to other colors, better affinities with the chromophores or brightness of the complexes can make it possible to broaden and improve the range of applications.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Alberts, B. *et al.* Molecular Biology of the Cell. 4th Ed. New York Section 4.4 (2002).
2. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* 15, 17–29 (2006).
3. Hernandez, N. Small Nuclear RNA Genes: A Model System to Study Fundamental Mechanisms of Transcription. *J. Biol. Chem.* 276, 26733–26736 (2001).
4. Huang, Y. *et al.* Biological functions of microRNAs: A review. *J. Physiol. Biochem.* 67, 129–139 (2011).
5. Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I. & Engelke, D. R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 505–8 (2002).
6. Inouye, M. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation--a review. *Gene* 72, 25–34 (1988).
7. Mole, L. D. B. & Sabatier, P. Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* 20, 3617–3622 (2001).
8. Geisler, S. & Coller, J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 699–712 (2013).
9. Ponting, C. P., Oliver, P. L. & Reik, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* 136, 629–641 (2009).
10. Montange, R. K. & Batey, R. T. Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 117–133 (2008).
11. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. & Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582, 1977–1986 (2008).
12. Lunde, B. M., Moore, C. & Varani, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 479–90 (2007).
13. Lee, M.-H. RNA-binding proteins. *WormBook* 1–13 (2006).
14. Schuwirth, B. S. Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science* (80-.). 310, 827–834 (2005).
15. Green and, R. & Noller, H. F. Ribosomes and Translation. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 679–716 (1997).

16. Bocchetta, M., Xiong, L., Shah, S. & Mankin, S. Interactions between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal E site. *RNA* 7, 54–63 (2001).
17. Ramakrishnan, V. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell* 108, 557–572 (2002).
18. Poehlsgaard, J. & Douthwaite, S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 870–881 (2005).
19. Makarova, K. S., Brouns, S. J. J., Horvath, P., Sas, D. F. & Wolf, Y. I. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev.* 9, 467–477 (2012).
20. Karginov, F. V. & Hannon, G. J. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol. Cell* 37, 7–19 (2010).
21. Terns, M. P. & Terns, R. M. CRISPR-Based Adaptive Immune Systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 321–327 (2011).
22. Yang, L. *et al.* RNA-Guided Human Genome. *Science* (80-. ). 339, 823–827 (2013).
23. Portela, A. & Digard, P. The influenza virus nucleoprotein: A multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* 83, 723–734 (2002).
24. Elton, D., Medcalf, L., Bishop, K., Harrison, D. & Digard, P. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J. Virol.* 73, 7357–7367 (1999).
25. Albo, C., Valencia, A. & Portela, A. Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 69, 3799–3806 (1995).
26. Ye, Q., Krug, R. M. & Tao, Y. J. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* 444, 1078–1082 (2006).
27. Hellman, L. M. & Fried, M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* 2, 1849–1861 (2007).
28. Fried, M. G. Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis* 10, 366–376 (1989).
29. Buratowski, S. & Chodosh, L. A. Mobility Shift DNA-Binding Assay Using Gel Electrophoresis. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 1–11 (2001).
30. Berkowitz, R. D., Luban, J. & Goff, S. P. Specific binding of human

- immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein and nucleocapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays. *J. Virol.* 67, 7190–200 (1993).
31. Ruscher, K. *et al.* A fluorescence based non-radioactive electrophoretic mobility shift assay mobility shift assay. *J. Biotechnol.* 1656, 163–170 (2000).
  32. Gel-shift, O. R. N. A. *et al.* Research Report Assays for Characterization of Cytoplasmic. *Biotechniques* 27, (1999).
  33. Lo, I. *et al.* RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *PNAS* 100, 8354–8359 (2003).
  34. Yoon, J. *et al.* Short Article LincRNA-p21 Suppresses Target mRNA Translation. *MOLCEL* 47, 648–655 (2012).
  35. Silanes, D. *et al.* Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *PNAS* 101, 2987–2992 (2004).
  36. Trask, J. B. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Tech. Focus* 7, 149–154 (1991).
  37. Price, C. M. Fluorescence In Situ Hybridization. *Blood Rev.* 7, 127–134 (1993).
  38. Baker, M. RNA imaging. *Nat. Technol. Featur.* 9, 787–791 (2012).
  39. Zimmerman, S. G., Peters, N. C., Altaras, A. E. & Berg, C. A. protocol Optimized RNA ISH , RNA FISH and protein-RNA double labeling ( IF / FISH ) in Drosophila ovaries. *Nat. Protoc.* 8, 2158–2179 (2013).
  40. Vyboh, K., Ajamian, L. & Mouland, A. J. Detection of Viral RNA by Fluorescence in situ Hybridization ( FISH ). *J. Vis. Exp.* 63, 2–6 (2012).
  41. Carey, M. F., Peterson, C. L. & Smale, S. T. The RNase Protection Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 276–285 (2013).
  42. Ma, Y. J., Dissen, G. A., Rage, F. & Ojeda, S. R. RNase Protection Assay. *Methods* 278, 273–278 (1996).
  43. Takahashi, T. *et al.* p53 a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Reports* 491 (1989).
  44. Young, H. A., Subleski, J. J. & Krebs, S. M. Multiprobe Ribonuclease Protection Assay for Simultaneous Measurement of mRNA Expression. *Mol. Biol.* 1–15 (2003).
  45. Paradh, A. D., Hill, A. E. & Mitchell, W. J. Detection of beer spoilage bacteria

- Pectinatus and Megasphaera with acridinium ester labelled DNA probes using a hybridisation protection assay. *J. Microbiol. Methods* 96, 25–34 (2014).
46. SenGupta, D. J. *et al.* A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8496–8501 (1996).
  47. Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B. & Wickens, M. RNA – protein interactions in the yeast three-hybrid system : Affinity , sensitivity , and enhanced library screening. 227–233 (2005).
  48. SENGUPTA, D. J., WICKENS, M. & FIELDS, S. Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *Rna* 5, 596–601 (1999).
  49. Putz, U., Skehel, P. & Kuhl, D. A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 24, 4838–4840 (1996).
  50. Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B. & Wickens, M. RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *Rna* 11, 227–233 (2005).
  51. Hafner, M. *et al.* Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129–141 (2010).
  52. Ceysens, P.-J. & Lavigne, R. Bacteriophages of Pseudomonas. *Future Microbiol.* 5, 1041–1055 (2010).
  53. Lim, F., Downey, T. P. & Peabody, D. S. Translational Repression and Specific RNA Binding by the Coat Protein of the Pseudomonas Phage PP7. *J. Biol. Chem.* 276, 22507–22513 (2001).
  54. Olsthoorn, R. C. L., Garde, G., Dayhuff, T., Atkins, J. F. & Duin, J. van. Nucleotide Sequence of a Single-Stranded RNAPhage from Pseudomonas aeruginosa: Kinship to Coliphages and Conservation of Regulatory RNA Structures. *Virology* 206, 611–625 (1994).
  55. Chao, J. a, Patskovsky, Y., Almo, S. C. & Singer, R. H. Structural basis for the coevolution of a viral RNA-protein complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 103–105 (2008).
  56. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Princ. Fluoresc. Spectrosc.* Springer, New York, USA, 3rd Ed. 362 (2006).
  57. Winter, R. & Noll, F. Methoden der Biophysikalischen Chemie. (1998).

58. Eftink, R. M. & Ghiron, A. C. Fluorescence Quenching Studies with Proteins. *Anal. Chim. Acta* 227, 199–227 (1981).
59. Gratton, E., Jameson, D. M., Weber, G. & Alpert, B. A model of dynamic quenching of fluorescence in globular proteins. *Biophys. J.* 45, 789–794 (1984).
60. Boaz, H. & Rollefson, G. K. The Quenching of Fluorescence. Deviations from the Stern Volmer Law. *Univ. Calif.* 72, 3435–3443 (1950).
61. Förster, T. Fluoreszenz organischer Verbindungen. *Vandenhoeck Rupr.* (1951).
62. Förster, T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* 33, 166–175 (1946).
63. Förster, T., Energiewanderung, Z. & Von, F. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 248, 55–75 (1939).
64. Förster, T. Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischengmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Zeitschrift für Naturforsch.* 4a, 321–327 (1949).
65. Paige, J. S., Wu, K. Y. & Jaffrey, S. R. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* 333, 642–6 (2011).
66. Shimomura, O., Johnson, F. & Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Phys.* 1353, 233–239 (1962).
67. Ormö, M. *et al.* Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* 273, 1392–1395 (1996).
68. Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246–1251 (1996).
69. Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509–544 (1998).
70. Youvan, D. C. & Michel-Beyerle, M. E. Structure and fluorescence mechanism of GFP. *Nat. Biotechnol.* 14, 1219–1220 (1996).
71. Yang, T. T., Cheng, L. & Kain, S. R. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* 24, 4592–4593 (1996).
72. You, M. & Jaffrey, S. R. Structure and Mechanism of RNA Mimics of Green

- Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biophys.* 44, 187–206 (2015).
73. Sampson, T. Aptamers and SELEX: the technology. *World Pat. Inf.* 25, 123–129 (2003).
  74. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* 24, 381–403 (2007).
  75. Ouellet, J. RNA Fluorescence with Light-Up Aptamers. *Front. Chem.* 4, 1–12 (2016).
  76. Han, K. Y., Leslie, B. J., Fei, J., Zhang, J. & Ha, T. Understanding the photophysics of the spinach-DFHBI RNA aptamer-fluorogen complex to improve live-cell RNA imaging. *Journal of the American Chemical Society* 135, 19033–8 (2013).
  77. Song, W., Strack, R. L., Svensen, N. & Jaffrey, S. R. Plug-and-play fluorophores extend the spectral properties of spinach. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 1198–1201 (2014).
  78. Filonov, G. S., Moon, J. D., Svensen, N. & Jaffrey, S. R. Broccoli: Rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 16299–16308 (2014).
  79. Strack, R. L., Disney, M. D. & Jaffrey, S. R. A superfolding Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. *Nat. Methods* 10, 1219–24 (2013).
  80. Autour, A., Westhof, E. & Ryckelynck, M. iSpinach: a fluorogenic RNA aptamer optimized for in vitro applications. *Nucleic Acids Res.* 44, 2491–2500 (2016).
  81. Zou, J. *et al.* Selection of Intracellularly Functional RNA Mimics of Green Fluorescent Protein Using Fluorescence-Activated Cell Sorting. *J. Mol. Evol.* 81, 172–178 (2015).
  82. Huang, H. *et al.* A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. *Nat. Chem. Biol.* 10, 686–691 (2014).
  83. Warner, K. D. *et al.* Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 658–663 (2014).
  84. Sharma, S., Zaveri, A., Visweswariah, S. S. & Krishnan, Y. A Fluorescent Nucleic Acid Nanodevice Quantitatively Images Elevated Cyclic Adenosine Monophosphate in Membrane-Bound Compartments. *Small* 10, 4276–4280 (2014).
  85. Strack, R. L. & Jaffrey, S. R. New approaches for sensing metabolites and proteins in live cells using RNA. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 651–655 (2013).

86. Nakayama, S., Luo, Y., Zhou, J., Dayie, T. K. & Sintim, H. O. Nanomolar fluorescent detection of c-di-GMP using a modular aptamer strategy. *Chem. Commun.* 48, 9059 (2012).
87. Su, Y., Hickey, S. F., Keyser, S. G. L. & Hammond, M. C. In Vitro and in Vivo Enzyme Activity Screening via RNA-Based Fluorescent Biosensors for S-Adenosyl-1 -homocysteine (SAH). *J. Am. Chem. Soc.* 138, 7040–7047 (2016).
88. You, M., Litke, J. L. & Jaffrey, S. R. Imaging metabolite dynamics in living cells using a Spinach-based riboswitch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E2756–E2765 (2015).
89. Bose, D., Su, Y., Marcus, A., Raulet, D. H. & Hammond, M. C. An RNA-Based Fluorescent Biosensor for High-Throughput Analysis of the cGAS-cGAMP-STING Pathway. *Cell Chem. Biol.* 1–11 (2016).
90. Inuzuka, S., Matsumura, S. & Ikawa, Y. Optimization of RNA-based c-di-GMP fluorescent sensors through tuning their structural modules. *J. Biosci. Bioeng.* 122, 183–187 (2016).
91. Paige, J. S., Nguyen-duc, T., Song, W. & Jaffrey, S. R. Fluorescence Imaging of Cellular Metabolites with RNA. *Science (80-. )*. 335, 1194 (2012).
92. Bhadra, S. & Ellington, A. D. A Spinach molecular beacon triggered by strand displacement. *RNA* 20, 1183–1194 (2014).
93. Bhadra, S. & Ellington, A. D. Design and application of cotranscriptional non-enzymatic RNA circuits and signal transducers. *Nucleic Acids Res.* 42, e58 (2014).
94. Chizzolini, F., Forlin, M., Cecchi, D. & Mansy, S. S. Gene Position More Strongly Influences Cell-Free Protein Expression from Operons than T7 Transcriptional Promoter Strength. *ACS Synth. Biol.* 3, 363–371 (2014).
95. Pothoulakis, G., Ceroni, F., Reeve, B. & Ellis, T. The Spinach RNA Aptamer as a Characterization Tool for Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.* 3, 182–187 (2014).
96. Okuda, M., Fourmy, D. & Yoshizawa, S. Use of Baby Spinach and Broccoli for imaging of structured cellular RNAs. *Nucleic Acids Res.* gkw794 (2016).
97. Zhang, J. *et al.* Tandem Spinach Array for mRNA Imaging in Living Bacterial Cells. *Sci. Rep.* 5, 17295 (2015).
98. Guet, D. *et al.* Combining Spinach-tagged RNA and gene localization to image gene expression in live yeast. *Nat. Commun.* 6, 8882 (2015).

99. Ong, W. Q., Citron, Y. R., Sekine, S. & Huang, B. Live Cell Imaging of Endogenous mRNA Using RNA-Based Fluorescence ‘Turn-On’ Probe. *ACS Chem. Biol.* 12, 200–205 (2017).
100. Burch, B. D., Garrido, C. & Margolis, D. M. Detection of human immunodeficiency virus RNAs in living cells using Spinach RNA aptamers. *Virus Res.* 228, 141–146 (2017).
101. Svensen, N. & Jaffrey, S. Fluorescent RNA Aptamers as a Tool to Study RNA-Modifying Enzymes. *Cell Chem. Biol.* 23, 415–425 (2016).
102. Kollenda, S. Vergleichende Studien *Spinach*-basierter FRET-Systeme am Beispiel der pp7-RNA-PP7-Protein Interaktion. (Technische Universität Dortmund, 2015).
103. FluorTools. a|e-UV-Vis-IR Spectral Software 1.2. [www.fluortools.com](http://www.fluortools.com)
104. Osman Bilsel. Förster distance calculator. (2009).
105. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
106. Kent, T., Ganewatta, D. & Maddiah Mazahr. FRET distance calculator.
107. Sanger, F. Sequences, Sequence, and Sequences. *Annu. Rev.* 57, 1–28 (1988).
108. Mairhofer, J., Wittwer, A., Cserjan-Puschmann, M. & Striedner, G. Preventing T7 RNA Polymerase Read-through Transcription? A Synthetic Termination Signal Capable of Improving Bioprocess Stability. *ACS Synth. Biol.* 4, 265–273 (2015).
109. Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *J. Biomed. Opt.* 6, 287–91 (2001).
110. Fernández-Suárez, M., Ting, A. Y., Fernandez-Suarez, M. & Ting, A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 929–943 (2008).
111. Extinction Coefficient of 6-JOE. <http://www.atdbio.com/content/33/FAM-fluorescein-H>
112. Mujumdar, R. B., Ernst, L. a, Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. & Waggoner, A. S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* 4, 105–11 (1993).
113. Life Technologies Corporation. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies.* (2010).
114. Crankshaw, M. W. & Grant, G. A. in *Wiley* 15.1 (2000).

115. Chalker, J. M., Bernardes, G. J. L., Lin, Y. A. & Davis, B. G. Chemical modification of proteins at cysteine: Opportunities in chemistry and biology. *Chem. - An Asian J.* 4, 630–640 (2009).
116. Ponchon, L. & Dardel, F. Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. *Nat. Methods* 4, 571–576 (2007).
117. [https://www.biomol.de/product\\_Tide-FluorTM3-maleimide-TF3-maleimide-Superior-replacement-to-Cy3.html?aRelated=ABD-2270](https://www.biomol.de/product_Tide-FluorTM3-maleimide-TF3-maleimide-Superior-replacement-to-Cy3.html?aRelated=ABD-2270).
118. Pollok, B. A. & Heim, R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends in Cell Biology* 9, 57–60 (1999).
119. Chudakov, D., Matz, M., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol. Rev.* 90, 1103–1163 (2010).
120. Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–72 (2004).
121. Shcherbo, D. *et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods* 4, 741–746 (2007).
122. Cooper, T. A., Wan, L. & Dreyfuss, G. RNA and Disease. *HHMI* 136, 777–793 (2009).
123. Roos, M. *et al.* A Small-Molecule Inhibitor of Lin28. *ACS Chem. Biol.* 11, 2773–2781 (2016).
124. Ponchon, L. & Dardel, F. Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. *Nat. Methods* 4, 571–576 (2007).
125. Cazenave, C. & Uhlenbeck, O. C. RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6972–6976 (1994).
126. Zemora, G. & Waldsich, C. RNA folding in living cells. *RNA Biol.* 7, 634–641 (2010).
127. Moore, P. B. The RNA folding problem. *Cold Spring Harb. Monogr. Ser.* 37, 381–402 (1999).
128. Herschlag, D. RNA chaperones and the folding problem. *J. Biol. Chem.* 270, 20871–20874 (1995).
129. Strack, R. L., Disney, M. D. & Jaffrey, S. R. A superfolding Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. *Nat. Methods* 10, 1219–24

- (2013).
130. Huang, H. *et al.* A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. *Nat. Chem. Biol.* 10, 686–691 (2014).
  131. Filonov, G. S., Kam, C. W., Song, W. & Jaffrey, S. R. In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies. *Chem. Biol.* 22, 649–660 (2015).
  132. Hall, K. Y. R. New equation of state for Z-factor calculations. *Oil Gas J.* 71.1, 82–92 (1973).

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Professor Susanne Brakmann für die Übernahme des Erstgutachtens der vorliegenden Arbeit und die Unterstützung während der Promotionszeit danken. Professor Daniel Summerer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Sven Hennig für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion anzufertigen, für das spannende und herausfordernde Thema, die anregenden Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Daniel Längle danke ich für die Synthese von DFHBI und Dr. Sonja Sievers für die Bereitstellung der LOPAC<sup>1280</sup>, sowie Dr. Philipp Thiel für die Hilfestellung bei der Auswertung des HTS-Assays. Außerdem danke ich ganz herzlich meinem Masterstudenten Sebastian Kollenda für die Klonierung, Reinigung, Expression und TF3-Fluoreszenzmarkierung der PP7-Cysteinmutanten, sowie für erste REMSAs und Titrationsexperimente mit diesen.

Ich danke allen ehemaligen und jetzigen CGClern für die herzliche und professionelle Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Sabine Graf, Nicole Pospiech, Svenja Koch, Nele Hollmann und Fabian Mörtl ganz herzlich für die gesamte Zeit am CGC, die langen Pizzaabende und die vielen nicht nur fachspezifischen Diskussionen. Insbesondere möchte ich hier Sabine Graf danken, die immer ein offenes Ohr für Probleme hatte.

Sabine Graf und Nicole Pospiech danke ich zusätzlich für das intensive Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Insbesondere danke ich meinen Freunden, die mich während dieser Zeit immer unterstützt haben. Namentlich erwähnen möchte ich hier Eva-Maria Vester und Frank Gerhard für die vielen aufbauenden Worte und die Geduld mit mir. Ich danke ebenfalls meiner ganzen Familie, besonders meinen Eltern für die Unterstützung und das Vertrauen, ohne welches diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Laura Roszyk

### Beruflicher Werdegang

Seit Nov. 2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am *Chemical Genomics Centre (CGC)* der Max-Planck-Gesellschaft,  
Dr. Sven Hennig

Okt. 2012–Sep. 2013 Masterstudentin am *Chemical Genomics Centre* des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie Dortmund,  
Dr. Sven Hennig

Okt. 2010–Mrz. 2011 Bachelorstudentin an der Technischen Universität Dortmund, Prof. Dr. Christof Niemeyer

Okt. 2008–Nov. 2013 TU Dortmund: Studiengang Chemische Biologie

Okt. 2007–Sep. 2008 TU Dortmund: Studiengang Chemie

### Schulische Laufbahn

1998–2007 Ruhrtal Gymnasium Schwerte

## 11. Anhang

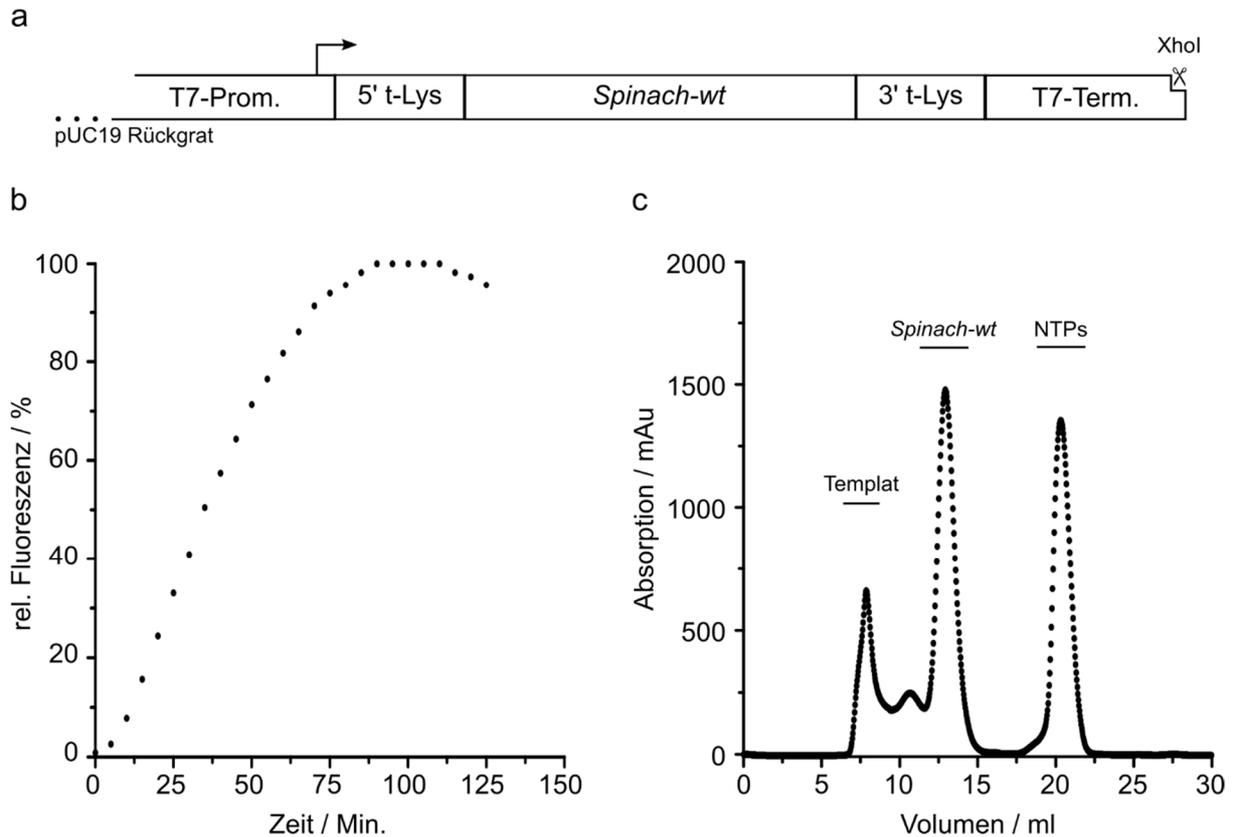
### 11.1. Sequenzen der verschiedenen *Spinach*-Konstrukte

**Tabelle 38:** Sequenz des jeweiligen DNA-Templates zur *In-vitro*-Transkription von *Spinach-wt*, *Spinach $\Delta$ 15* und *Spinach-pp7*. In kursiver Schrift sind die t-Lys-Sequenzen, in Fettschrift die *Spinach*-Sequenzen und in Großbuchstaben die pp7-Sequenz dargestellt.

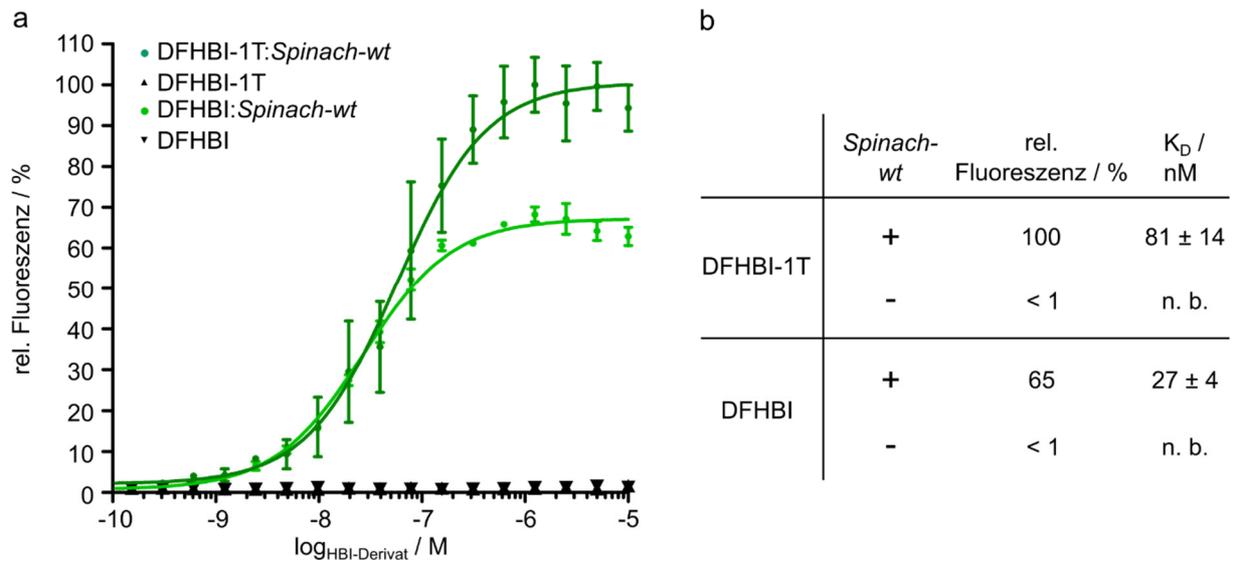
DNA-Template	DNA-Sequenz
Spinach-wt	<i>cccggatagctcagtcggtagagcagcggccg</i> <b>gacgcgaccgaaatgg</b> <i>tgaaggacgggt</i> <b>ccagtgttcggcactgttgagtagagtgtgagctccgtaactgg</b> <i>tcgcgtccggccgcg</i> <i>ggtccagggttcaagtccctgttcgggcgcca</i>
Spinach $\Delta$ 15	<b>gaattcgacgcgaccgaaatgg</b> <i>tgaaggacgggtccagtgttcggcactgttgagtaga</i> <b>gtgtgagctcca</b>
Spinach-pp7	<i>cccggatagctcagtcggtagagcagcggccg</i> <b>gaattcggacgcgaccgaaatgg</b> <i>tgaag</i> <b>gacgggtccagtgc</b> <i>GGCACAGAAGATATGGCTTCGTGCCgcactgttgagtagagtgtga</i> <b>gtccgtaactgg</b> <i>tcgcgtcaagcttcggccgcgggtccagggttcaagtccctgttcgg</i> <i>gcgcca</i>

## 11.2. Charakterisierung der *Spinach-wt* RNA

Zu Referenzzwecken wurde die *Spinach-wt* RNA ebenfalls wie *Spinach $\Delta$ 15* und *Spinach-pp7* in einen pUC19 Vektor kloniert, *in vitro* transkribiert, gereinigt (Abbildung 36) und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzentwicklung im Komplex mit DFHBI und DFHBI-1T analysiert (Abbildung 37).

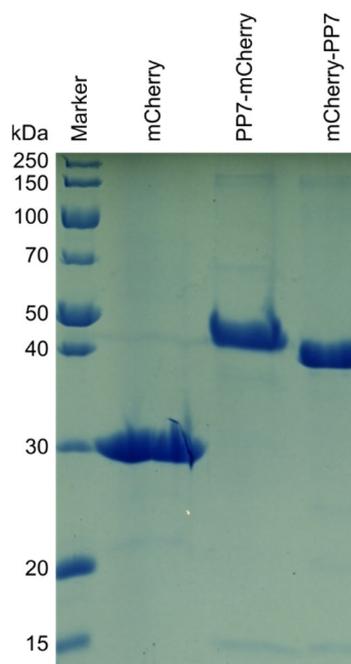


**Abbildung 36:** *In-vitro*-Transkription und Reinigung von *Spinach-wt*. (a) Schematische Darstellung der Klonierung von *Spinach-wt* flankiert von der t-Lys Sequenz in das pUC19-Vektorrückgrat. (b) Zeitabhängige Fluoreszenzmessung während der *In-vitro*-Transkription von *Spinach-wt* RNA. Die Messung wurde nach Zugabe von 50  $\mu$ M DFHBI bei 37°C durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde alle 5 Min. bei 462 nm Anregungswellenlänge und 506 nm Emissionswellenlänge gemessen. (c) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Transkriptionsgemisches von *Spinach-wt* über eine S75 10/300 GL Sepharose Matrix.



**Abbildung 37:** Charakterisierung von *Spinach-wt*. (a) Titration von 1  $\mu$ M *Spinach-wt* RNA mit steigenden Konzentrationen von DFHBI (hellgrün) bzw. DFHBI-1T (dunkelgrün). Die Emission wurde bei 506 nm unter einer Anregung bei 462 nm gemessen (N = 3). (b) Vergleichende Darstellung der ermittelten Floreszenzen und  $K_{DS}$  von *Spinach-wt* mit 50  $\mu$ M DFHBI und DFHBI-1T.

### 11.3. SDS-PAGE Analyse der gereinigten *mCherry*-Proteine



**Abbildung 38:** 12 %ige SDS-PAGE der gereinigten, verwendeten *mCherry*-Fusionsproteine. Berechnete Massen *mCherry*: 28261 Da, *mCherry-PP7*: 42523 Da und *PP7-mCherry*: 43130 Da

## 11.4. Alignment von PP7-wt und PP7 $\Delta$ FG

```

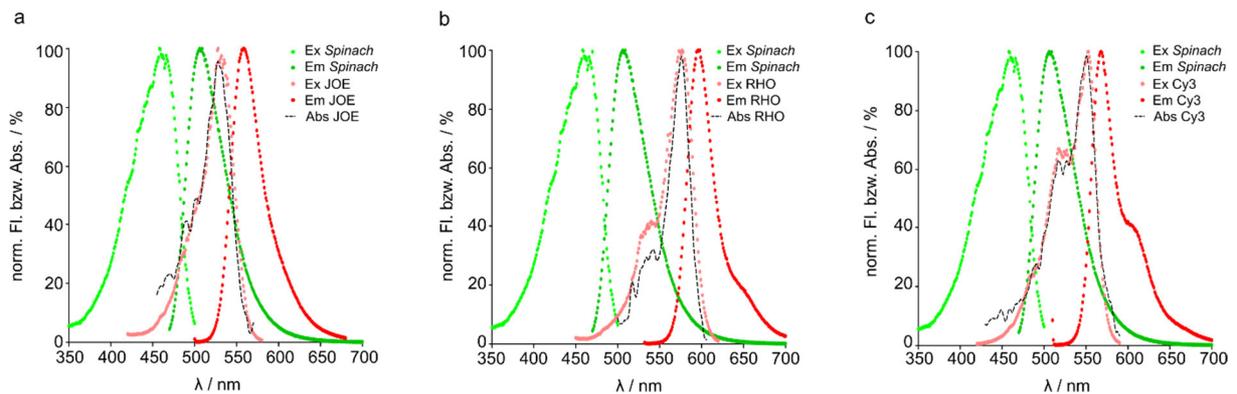
          10      20      30      40      50      60
PP7_1-127*_wt  sktivlavgeatrtlteiqstadrqifeekvgplvgrlrlrtaslrqngaktayrvnlkld
PP7_1-127*_Del67-74 sktivlavgeatrtlteiqstadrqifeekvgplvgrlrlrtaslrqngaktayrvnlkld

          70      80      90      100     110     120
PP7_1-127*_wt  qadvvdCstsvCgelpkvrytqwshdvtivansteasrkslydltkslvatsqvedlvvnlvplgr
PP7_1-127*_Del67-74 qadvvdSG-----lpkvrytqwshdvtivansteasrkslydltkslvatsqvedlvvnlvplgr

```

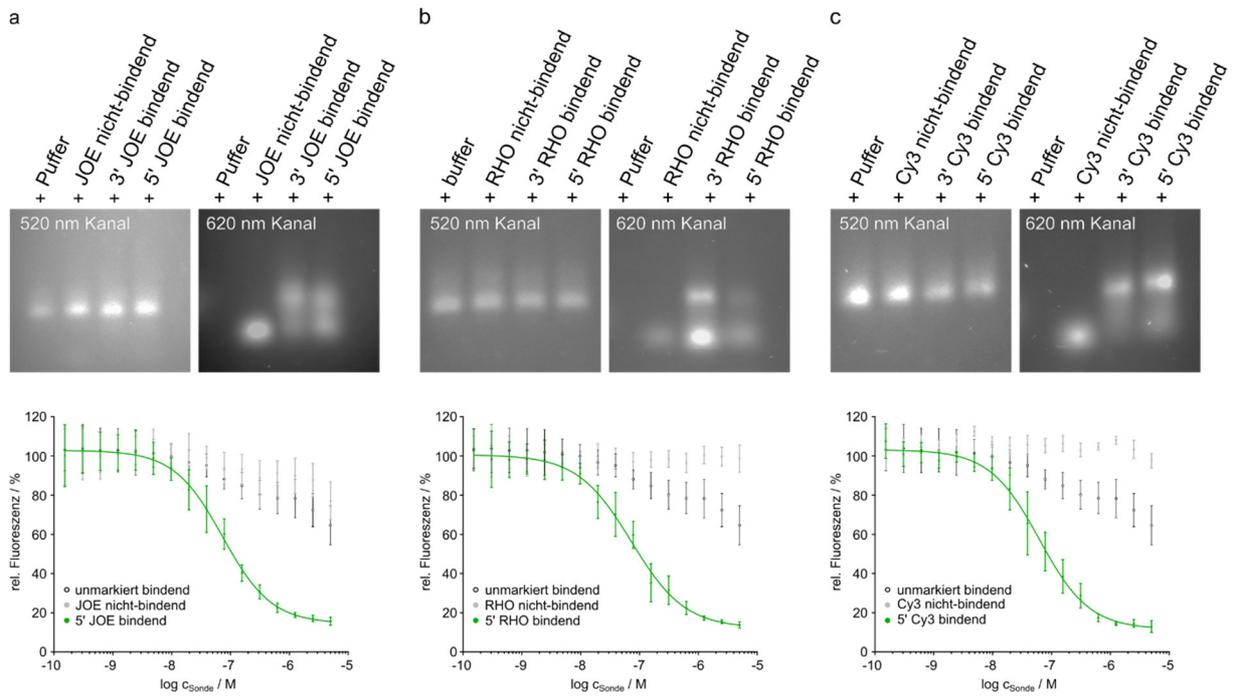
**Abbildung 39:** Sequenzalignment von PP7-wt (oben) mit PP7 $\Delta$ FG (unten). In der Mutante PP7 $\Delta$ FG ist der FG-Bereich von C67 bis C74 deletiert und die AS Ser und Gly wurden an diese Stelle kloniert.

## 11.5. Fluoreszenzspektren von *Spinach-pp7*, JOE, RHO und Cy3



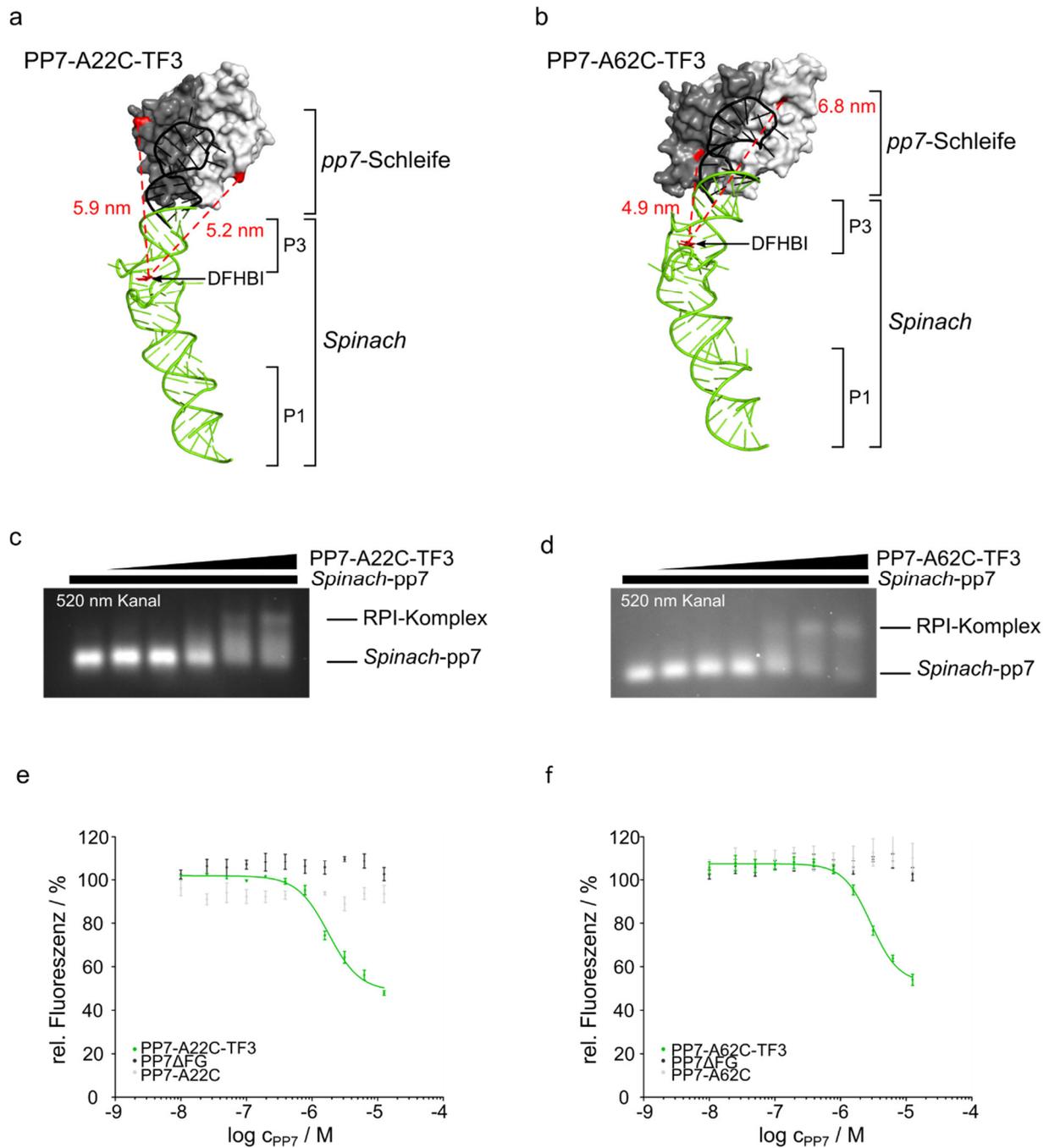
**Abbildung 40:** Fluoreszenzspektren von *Spinach $\Delta$ 15* überlagert mit denen von JOE (a), RHO (b) und Cy3 (c). In schwarz ist das Absorptionsspektrum des jeweiligen Akzeptors dargestellt.

## 11.6. Bindungsstudien von *Spinach* $\Delta 15$ mit JOE-, RHO- und Cy3-markierten DNA-Sonden



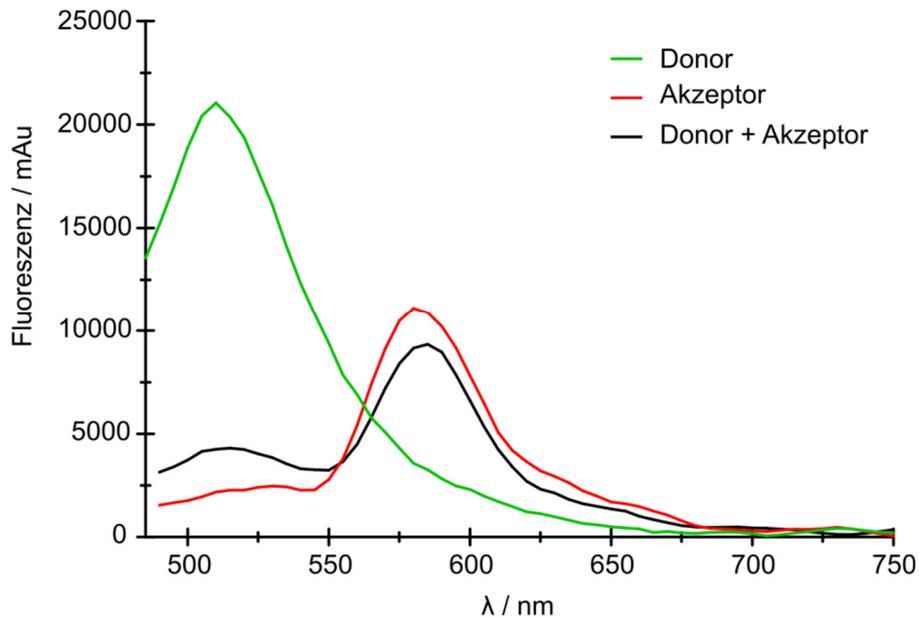
**Abbildung 41:** Quenching von *Spinach* $\Delta 15$  mit weiteren rot markierten DNA-Sonden. REMSAs (oben) und Titrations (unten) zur Verifizierung der *Spinach* $\Delta 15$  Bindung an JOE (a), RHO (b) und Cy3 (c) markierten DNA Sonden. Daten der Titrations sind als  $\pm$ SEM der Triplikate dargestellt.

## 11.7. Abstandsmessungen, REMSAs und Titrations von *Spinach-pp7* mit PP7-A22C-TF3 und PP7A62C-TF3

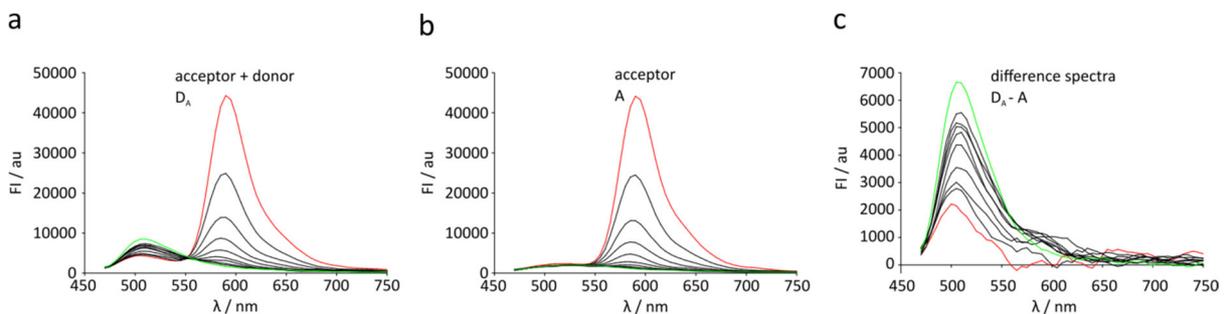


**Abbildung 42:** Distanzmessungen zwischen DFHBI als *Hotspot* der Fluoreszenz innerhalb von *Spinach-pp7* und der TF3 Markierung an der PP7-A22C-Mutante (a) und der PP7-A62C-Mutante (b). Die hier gezeigten Interaktionen wurden mit Hilfe der PDB Codes 2qux (*pp7:PP7ΔFG*) und 4ts2 (*Spinach-DFHBI*) dargestellt. Die Distanzmessung wurde mit PyMOL<sup>105</sup> durchgeführt. Die Bindung von *Spinach-pp7* an PP7-A22C-TF3 (c) und PP7-A62C-TF3 (d) wurde über REMSA verifiziert. Die spezifische Verminderung der Fluoreszenz von *Spinach-pp7* nach Zugabe von PP7-A22C-TF3 (e) und PP7-A62C-TF3 (f) konnte anschließend gezeigt werden. Die REMSAs und Titrations der drei verschiedenen TF3-markierten PP7-Cysteinmutanten wurde im Rahmen seiner Masterarbeit<sup>102</sup> von Sebastian Kollenda erstmals durchgeführt.

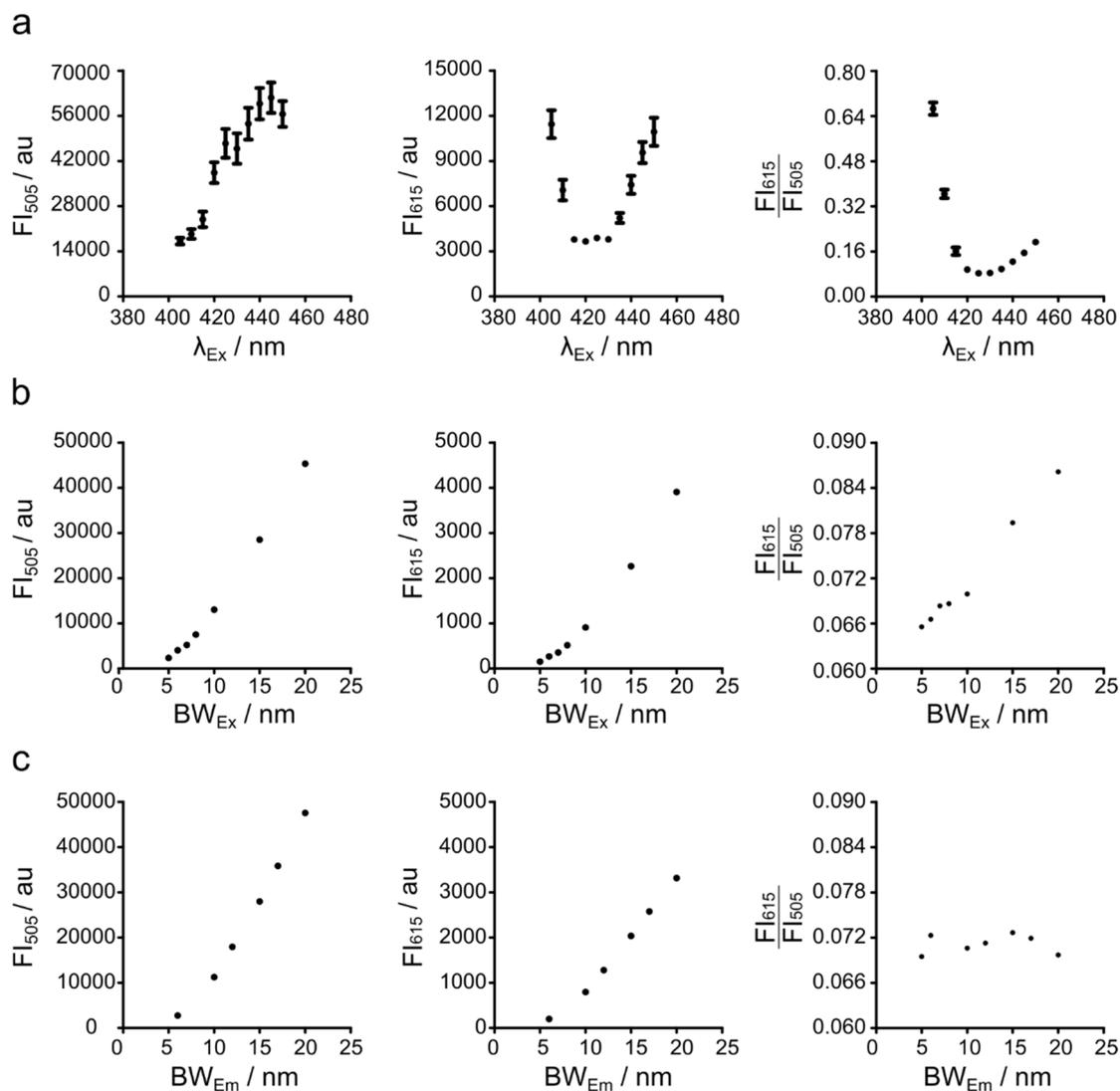
## 11.8. Messung der Akzeptorzunahme in Anwesenheit von *Spinach* $\Delta$ 15 bzw. *Spinach-pp7*



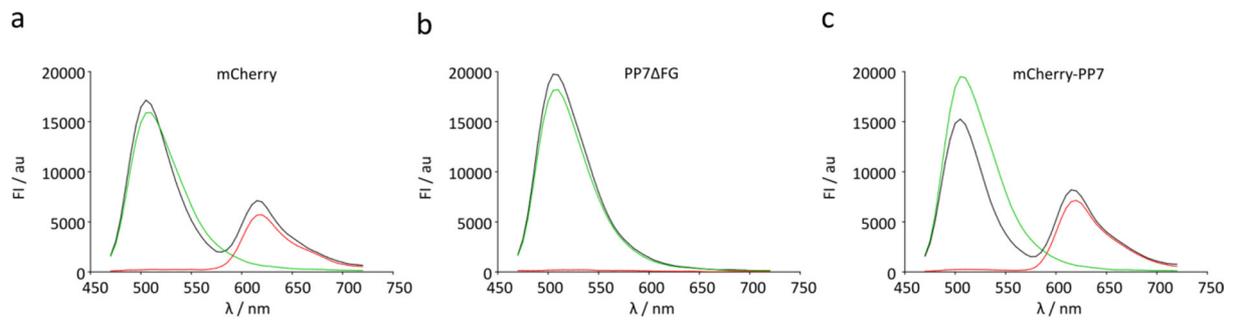
**Abbildung 43:** Akzeptorzunahme in Anwesenheit von *Spinach* $\Delta$ 15. Die Emissionsspektren von 500 nM *Spinach* $\Delta$ 15 und 500 nM 5'-TMR bindender Sonde wurden einzeln (grün = *Spinach-pp7* (Donor), rot = 5'-TMR bindende Sonde (Akzeptor)) und gemischt (schwarz) nach Anregung bei 450 nm aufgenommen.



**Abbildung 44:** Akzeptorzunahme in Anwesenheit von *Spinach-pp7*. (a) Emissionsspektren von 250 nM *Spinach-pp7* nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen PP7-N93C-TF3 (0–25 μM). (b) Emissionsspektren der gleichen Konzentrationen von PP7-N93C-TF3 in Abwesenheit des Donors *Spinach-pp7*. (c) Differenzspektren aus (a) und (b) zur Darstellung der fehlenden Akzeptorfluoreszenzzunahme. Die Anregungswellenlänge betrug 450 nm.



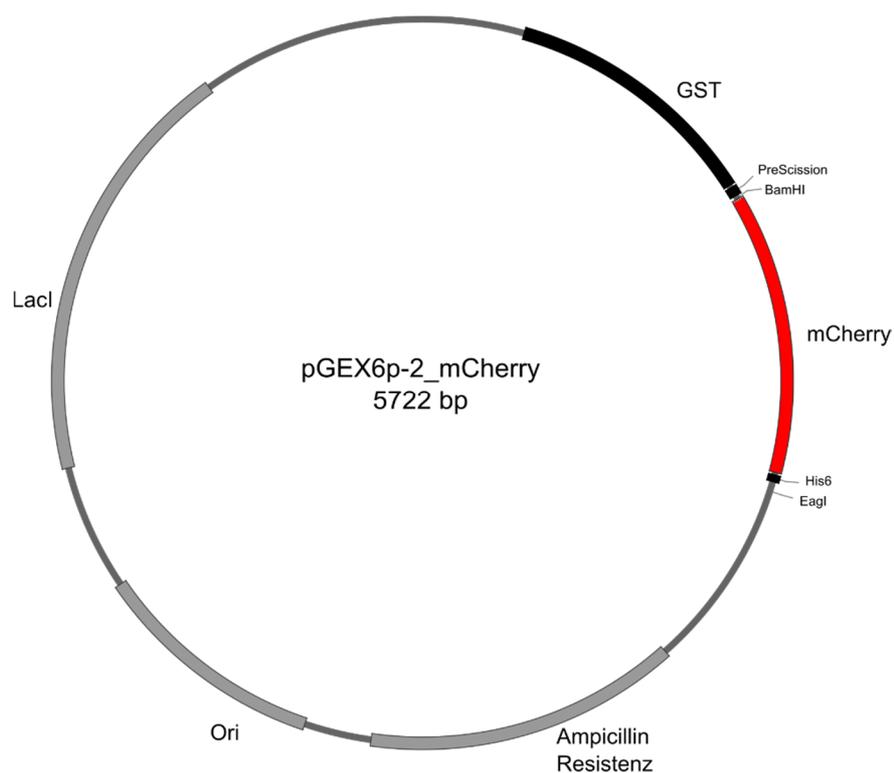
**Abbildung 45:** Minimierung von *mCherry Bleedthrough*-Effekten in BL21(DE3) Lysat. (a) Anregungsspektren generiert durch entweder Lysat von *Spinach-pp7* exprimierenden *E. coli* Zellen aufgenommen bei der *Spinach*-spezifischen Wellenlänge (505 nm, links) oder *mCherry* (25  $\mu$ M protein) aufgenommen an der *mCherry*-spezifischen Wellenlänge (615 nm, mittig). Für einen minimalen Bleedthrough sollte das Verhältnis von 615 nm zu 505 nm möglichst klein sein (rechts). (b) Scan der Exzitationsbandweiten angeregt bei 425 nm und analysiert entweder bei der *Spinach*-Wellenlänge (505 nm, links) oder *mCherry*-Wellenlänge (615 nm, mittig). Rechts ist wiederum das Verhältnis von 615 nm zu 505 nm angegeben. (c) Scan der Emissionsbandweiten angeregt und analysiert unter den gleichen Konditionen wie in (b).



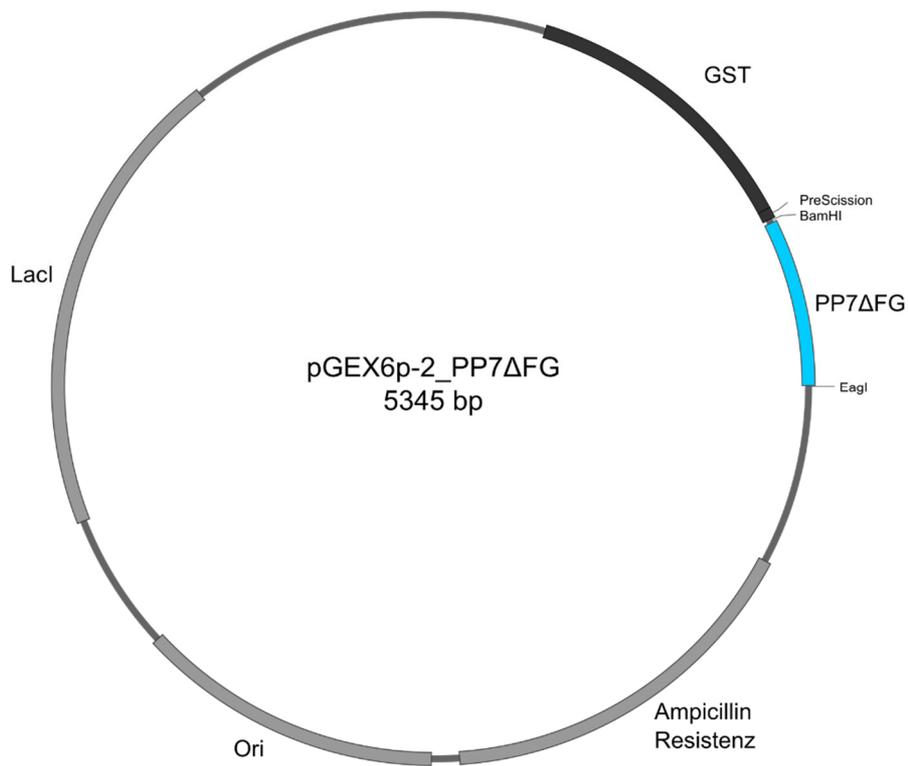
**Abbildung 46:** *mCherry* Fluoreszenz in Anwesenheit von *Spinach-pp7*. (a) Emissionsspektren eines *Spinach-pp7* Lysats aus einer *E. coli* BL21(DE3) Überexpressionkultur in Anwesenheit von 50  $\mu$ M *mCherry* (schwarz), in Abwesenheit des Akzeptors *mCherry* (grün) oder Akzeptor ohne Anwesenheit des Donors *Spinach-pp7* (rot). (b) Gleiche Messung mit PP7 $\Delta$ FG anstelle von *mCherry*-Protein. (c) Gleiche Messung mit *mCherry-PP7* anstelle von *mCherry*-Protein. Die rote Linie in jedem Graphen repräsentiert das Emissionsspektrum des Akzeptors, die grüne Linie die Emissionsspektren des Donors und die schwarze Linie das Emissionsspektrum des Donors in Anwesenheit von 50  $\mu$ M Akzeptor (*mCherry*, PP7 $\Delta$ FG oder *mCherry-PP7*).

## 11.9. Vektorkarten

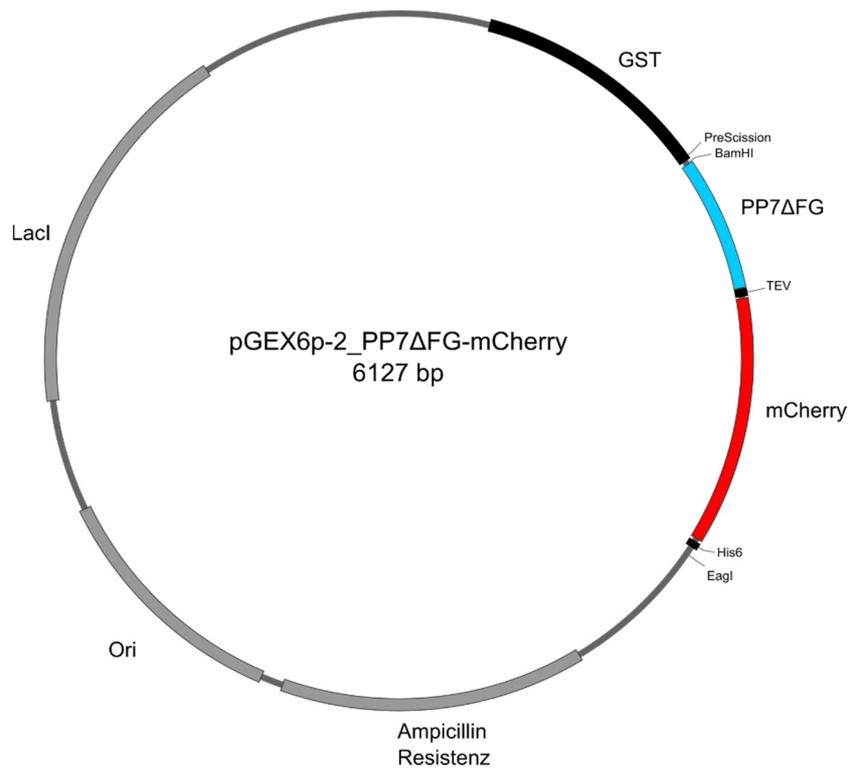
### 11.9.1. Vektorkarte von pGEX6p-2\_*mCherry*



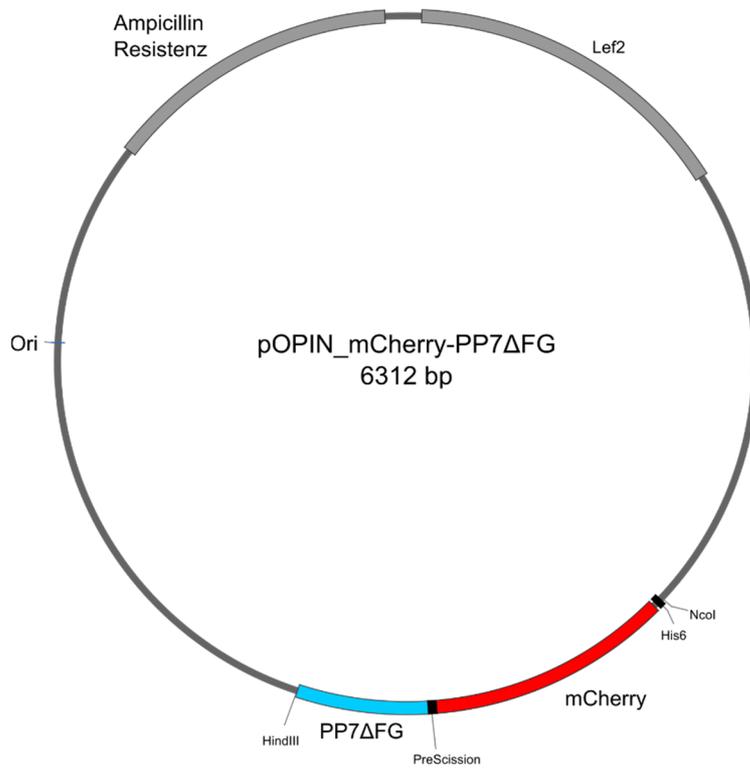
### 11.9.2. Vektorkarte von pGEX6p-2\_PP7ΔFG



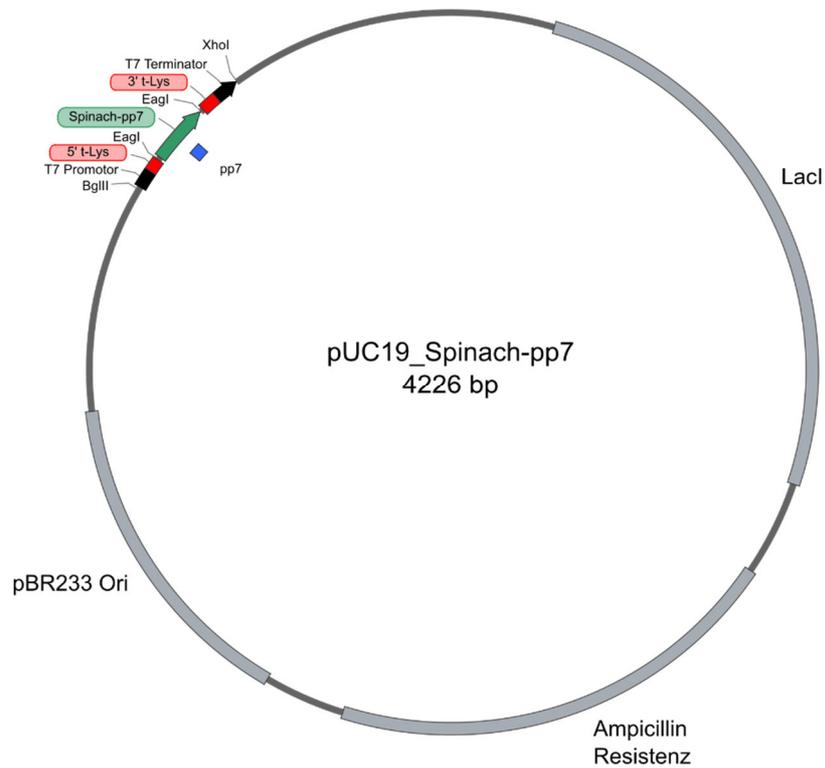
### 11.9.3. Vektorkarte von pGEX6p-2\_PP7ΔFG-mCherry



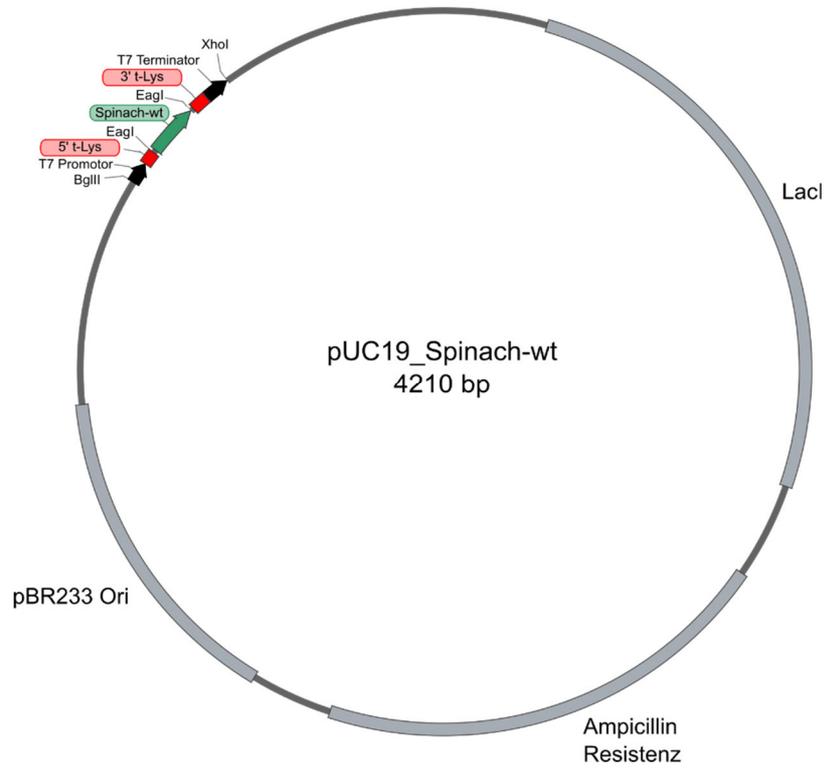
#### 11.9.4. Vektorkarte von pOPIN\_mCherry-PP7ΔFG



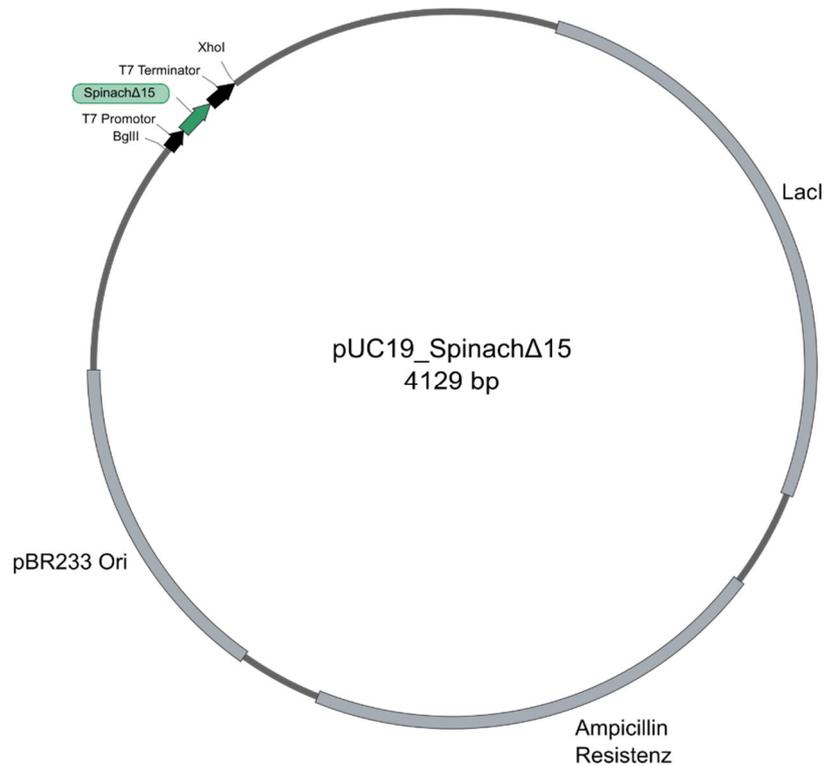
#### 11.9.5. Vektorkarte von pUC19\_Spinach-pp7



### 11.9.6. Vektorkarte von pUC19\_Spinach-wt



### 11.9.7. Vektorkarte von pUC19\_SpinachΔ15



**11.9.8. Vektorkarte von pET28\_Spinach-pp7**