

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Biochemische Studien  
zur Phosphorylierung  
humaner Argonaute-Proteine**

Sabine Rüdel

aus  
Berlin

2010

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 in der Fassung der vierten Änderungssatzung vom 26. November 2004 von Herrn Prof. Klaus Förstemann betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 1.12.2010

---

Dissertation eingereicht am 07.12.2010

1. Gutachter Prof. Klaus Förstemann

2. Gutachter Prof. Gunter Meister

Mündliche Prüfung am 03.02.2011

*"We can only see a short distance ahead,  
but we can see plenty there  
that needs to be done."*

Alan Turing  
(1912-1954\*)

- \*) Alan Turing war Logiker, Mathematiker, Kryptoanalytiker, ausgezeichnete Marathonläufer und seit frühester Kindheit als genial zu bezeichnen. Nach ihm wurde der „Turing Award“ benannt, der auch als Nobelpreis der Informatik angesehen wird. Aufgrund seiner Homosexualität wurde er im Rahmen einer gerichtlichen Verhandlung zu einer psychiatrischen Behandlung inklusive Östrogentherapie gezwungen. Er verfiel daraufhin in Depressionen und starb im Jahr darauf an einer Cyanidvergiftung - vermutlich war es Selbstmord.

<b>I.</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>III.</b>	<b>Symbolik für Aminosäuren und Nukleobasen.....</b>	<b>1</b>
<b>IV.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>2</b>
<b>V.</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>7</b>
<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>10</b>
	<b>2.1 Kleine RNAs mit Funktion in der Genexpressionsregulation – Eigenschaften, Biogenese, Bindungspartner und Wirkungsweise.....</b>	<b>11</b>
	2.1.1 siRNAs .....	11
	2.1.2 endo-siRNAs.....	12
	2.1.3 piRNAs.....	13
	2.1.4 miRNAs.....	14
	2.1.5 Kleine, regulatorische RNAs in Prokaryoten.....	16
	<b>2.2 miRNA-Biogenese und miRNP-Assemblierung in humanen Zellen.....</b>	<b>17</b>
	<b>2.3 Argonaute-Proteine, die zentralen Proteinfaktoren der RNA-vermittelten Genexpressionsregulation.....</b>	<b>22</b>
	2.3.1 Die Argonaute-Proteinfamilie ist phylogenetisch konserviert.....	22
	2.3.2 Untergliederung der Argonaute-Proteinfamilie.....	23
	2.3.3 Die Argonaute-Proteine der Säugetiere.....	24
	2.3.3.1 N-Terminus.....	26
	2.3.3.2 PAZ-Domäne.....	26
	2.3.3.3 MID-Domäne.....	26
	2.3.3.4 PIWI-Domäne.....	28
	<b>2.4 Molekulare Funktionseinheiten der RNA-vermittelten Genexpressionsregulation und ihre Wirkmechanismen.....</b>	<b>31</b>
	2.4.1 RNA-induzierte Initiation transkriptionaler Expressionsrepression (engl. <i>RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing</i> , kurz: RITS).....	31
	2.4.2 piRNPs.....	33
	2.4.3 miRNPs.....	34
	2.4.3.1 Translationsinhibition.....	35
	2.4.3.2 <i>target</i> -RNA-Destabilisierung.....	37
	2.4.4 RISC in menschlichen Zellen.....	39
	<b>2.5 Ago-Protein-Interaktionen.....</b>	<b>43</b>
	2.5.1 Die GW182-Proteinfamilie.....	43
	<b>2.6 Lokalisierung von Argonaute-Proteinen in der Zelle.....</b>	<b>47</b>
	2.6.1 Kernlokalisierung von Ago-Proteinen.....	47
	2.6.2 <i>Processing Bodies</i> : Zytoplasmatische, granuläre Strukturen in somatischen Zellen.....	48
	<b>2.7 Regulation zellulärer Vorgänge durch posttranslationale Modifikation von Proteinen.....</b>	<b>50</b>
	2.7.1 Posttranslationale Modifikation der Proteine des miRNA-Signalweges.....	50
	2.7.2 Posttranslationale Modifikationen von Argonaute-Proteinen.....	51
<b>3.</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
	4.1 Vorbereitende Arbeiten.....	55

4.1.1	Klonierungskompatible Vektoren.....	55
4.1.2	Monoklonaler $\alpha$ -hsAgo2-Antikörper.....	58
4.1.2.1	Spezifität des $\alpha$ -hsAgo2-Antikörpers in Western-Blotexperimenten.....	58
4.1.2.2	Spezifität des $\alpha$ -hsAgo2-Antikörpers in Immunopräzipitationsversuchen.....	63
4.1.2.3	Isolierung von enzymatisch-aktivem RISC und Elution mit Ago2-Peptid.....	72
4.1.2.4	Eignung des $\alpha$ -Ago2-Antikörpers für Immunofluoreszenzversuche.....	77
<b>4.2</b>	<b>Posttranslationale Modifikation von Argonaute-Proteinen in Säugerzellen.....</b>	<b>81</b>
4.2.1	Identifizierung der Phosphorylierung humaner Argonaute-Proteine.....	81
4.2.2	Erste Untersuchungen zur Ago-Phosphorylierung anhand von Ago2-Mutanten.....	86
4.2.3	Studien an Ago2 in Gegenwart verschiedener Kinasen.....	97
4.2.3.1	Phosphorylierung von Ago2 durch Casein Kinase II.....	97
4.2.3.2	Forcierte Phosphorylierung von Ago2 durch Co-Expression verschiedener Tyrosinkinase.....	101
4.2.4	Funktionale Bedeutung der Phosphorylierung von Tyrosin-529.....	112
4.2.4.1	Verifizierung der Funktionalität der Ago2-Y529-Mutanten.....	112
4.2.4.2	Charakterisierung der Y529-Mutanten.....	122
4.2.4.3	Defizite von Ago2-Y529E resultieren aus gestörter miRNA-Protein-Interaktion.....	137
4.2.4.4	Molekularer Mechanismus der Phosphorylierung von Ago2-Y529.....	148
4.2.4.5	Untersuchungen zur Tyrosinphosphorylierung des endogenen Ago2-Protein.....	155
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>161</b>
<b>5.1</b>	<b>Vorbereitende Arbeiten.....</b>	<b>161</b>
5.1.1	Etablierung der <i>FseI/Ascl</i> -Vektoren als alternative Klonierungsstrategie.....	161
5.1.2	Generierung eines hochspezifischen und vielfältig einsetzbaren monoklonalen Antikörpers gegen humanes Ago2-Protein.....	162
5.1.2.1	Auswertung der Spezifität des $\alpha$ -Ago2-Antikörpers.....	163
5.1.2.2	Bestätigung verschiedener Ago2-spezifischer Eigenschaften am endogenen Ago2-Protein.....	166
5.1.2.3	Erweiterung des Anwendungsspektrums für den $\alpha$ -Ago2-Antikörper.....	168
5.1.2.4	Abschließende Betrachtungen.....	169
<b>5.2</b>	<b>Posttranslationale Modifikation humaner Argonaute-Proteine.....</b>	<b>170</b>
5.2.1	Phosphorylierung von Ago1 und Ago2 <i>in vivo</i> .....	170
5.2.2	Serinphosphorylierung von Ago2.....	172
5.2.3	Tyrosinphosphorylierung von Ago2.....	175
5.2.3.1	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung von endogenem Ago2: In Kombination mit einer Co-Expression von Tyrosinkinase.....	177
5.2.3.2	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung von endogenem Ago2: Ohne Co-Expression von Tyrosinkinase.....	180
5.2.3.3	Y529-Phosphorylierung von Ago2.....	182
5.2.3.4	Modell zur Regulation von Ago2 durch Phosphorylierung von Y529.....	188
5.2.4	Aspekte für das weitere Studium der Regulation humaner Argonaute-Protein durch posttranslationale Modifikationen.....	191
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>193</b>
<b>6.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>193</b>
6.1.1	Chemikalien.....	193
6.1.2	Plasmide.....	194
6.1.3	Oligonukleotide.....	196
6.1.4	Antikörper.....	198
6.1.5	Organismen und Zelllinien.....	199

6.1.6 Kulturmedien.....	199
6.1.7 Puffer und Lösungen.....	200
6.1.7.1 Lösungen für RNA-Arbeiten.....	201
6.1.7.2 Reagenzien für die Northern-Blotanalyse.....	202
6.1.7.3 Lösungen für die Protein-Analytik.....	203
6.1.7.4 Lösungen für die Silberfärbung (für die Massenspektrometrie geeignet).....	204
6.1.7.5 Lösungen für immunbiochemische Protein-Arbeiten.....	204
6.1.7.6 Zellysepuffer.....	204
6.1.7.7 Lösungen für die Immunfluoreszenz (IF) .....	205
6.1.7.8 Puffer für Luziferase-Reporterassays.....	206
6.1.7.9 weitere Puffer.....	206
<b>6.2 Methoden.....</b>	<b>207</b>
6.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	207
6.2.1.1 Allgemeine Methoden.....	207
6.2.1.2 Klonierungen.....	207
6.2.1.3 <i>In vitro</i> Mutagenese.....	208
6.2.1.4 Proteinase K-Verdau.....	208
6.2.1.5 Isolierung von RNA.....	209
6.2.1.6 Gelreinigung von RNA.....	209
6.2.1.7 Radioaktive 5'-Endmarkierung chemisch synthetisierter Nukleinsäuren.....	209
6.2.1.8 3'-Endmarkierung einzelsträngiger siRNAs.....	210
6.2.1.9 Hybridisieren einzelsträngiger siRNAs.....	211
6.2.1.10 <i>In vitro</i> Transkription.....	211
6.2.1.11 Endogene radioaktive Markierung von RNA.....	212
6.2.1.12 Radioaktive 5'- <i>Cap</i> -Markierung von RNA.....	212
6.2.1.13 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von Proteinen.....	213
6.2.1.14 <i>In vitro</i> Dephosphorylierung von Proteinen.....	213
6.2.2 Zellkulturmethoden.....	214
6.2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen.....	214
6.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen.....	214
6.2.2.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA nach der Kalziumphosphatmethode.....	215
6.2.2.4 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit kommerziellen Transfektionsreagenzien.....	216
6.2.2.5 Transiente Transfektion von siRNAs in Säugerzellen.....	216
6.2.2.6 Radioaktive Markierung von Phosphoproteinen in HEK 293 Zellen.....	217
6.2.2.7 Behandlung von Säugerzellen mit Phosphataseinhibitor (PPI).....	218
6.2.3 Biochemische Methoden.....	218
<i>Lysat- und Extraktpräparationen</i>	
6.2.3.1 Totallysate von Säugerzellen.....	219
6.2.3.2 Zytoplasmatische Extrakte.....	219
6.2.3.3 Nukleäre Extrakte.....	219
<i>Gelsysteme</i>	
6.2.3.4 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (denaturierende Harnstoff-PAGE) .....	220
6.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	220
<i>Proteinfärbetechniken</i>	
6.2.3.6 Coomassie-Färbung.....	220
6.2.3.7 Silberfärbung (für die Massenspektrometrie geeignet) .....	221
6.2.4 Immunologische und Immunbiochemische Methoden.....	221
6.2.4.1 Analyse via Western-Blot.....	221
6.2.4.2 „ <i>Stripping</i> “ von Western-Blots.....	222
6.2.4.3 Kopplung monoklonaler Antikörper an Protein G-Sepharose.....	222
6.2.4.4 Immunopräzipitation.....	223

6.2.4.5	Immunopräzipitation von Phosphoproteinen.....	223
6.2.4.6	Saure Elution von immunopräzipitierten Proteinen.....	224
6.2.4.7	Isolierung des <i>RNA-induced silencing complexes</i> (RISC) durch $\alpha$ -hAgo2-IP und Elution mit Ago2-Peptid.....	224
6.2.4.8	Immunofluoreszenz-Mikroskopie.....	225
6.2.4.9	Quantifizierung der <i>P-body</i> -Lokalisierung von Ago-Proteinen.....	226
6.2.5	Experimente zur Funktionsanalyse von Argonate-Proteinen.....	226
6.2.5.1	Massenspektrometrie.....	226
6.2.5.2	Dichtegradientenzentrifugation.....	226
6.2.5.3	Northern-Blotanalyse.....	227
6.2.5.4	„ <i>Stripping</i> “ von Northern-Blotmembranen.....	228
6.2.5.5	<i>In vitro</i> Dicer-Assay.....	228
6.2.5.6	Partieller RNase T1-Verdau.....	229
6.2.5.7	<i>In vitro</i> RISC-Assay.....	229
6.2.5.8	Zeitabhängige <i>in vitro</i> Untersuchung von RISC-Aktivität: Durchführung und Auswertung.....	230
6.2.5.9	RISC-Rekonstitution mit kleinen 5'-CH <sub>3</sub> - und 5'-P-RNAs: Durchführung und Auswertung.....	230
6.2.5.10	Übertragung der Phosphorylgruppe kleiner RNAs auf Ago-Proteine.....	231
6.2.5.11	Reverse Transkription.....	232
6.2.5.12	Quantitative Echtzeit-PCR (engl. <i>quantitative real-time PCR</i> , qRT-PCR) .....	233
	<i>Luziferase-Reporterassays</i>	
6.2.5.13	Luziferase-Aktivitätsmessung.....	235
6.2.5.14	<i>In vivo rescue</i> -Experimente.....	236
6.2.5.15	<i>Tethering</i> -Assay.....	237
<b>7.</b>	<b>Quellenverzeichnis.....</b>	<b>238</b>
7.1	Internetquellen.....	238
7.2	Literaturverzeichnis.....	238
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>260</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>261</b>

### III. Symbolik der Aminosäuren und Nukleotide

#### Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asp	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparagin	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	X	Xaa	beliebige Aminosäure
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
M	Met	Methionin			

#### Nukleotide

r Ribonukleo-

d Desoxyribonukleo-

A, bei Sequenzangaben auch a

Adenin

C, bei Sequenzangaben auch c

Cytosin

G, bei Sequenzangaben auch g

Guanin

T, bei Sequenzangaben auch t

Thymin

U, bei Sequenzangaben auch u

Uracil

## IV. Abkürzungsverzeichnis

### a) Einheitenvorsätze

n	nano, $10^{-9}$
$\mu$	mikro, $10^{-6}$
c	centi, $10^{-2}$
m	mili, $10^{-3}$
k	kilo, $10^3$

### b) ferner

%	Prozent
$\alpha$	alpha (in der Bedeutung von „anti“)
$\lambda$	Lambda-Phage bzw. Phage $\lambda$

### c) Abkürzungen

<b>A</b>	<b>Ampere</b>
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Abl	Abelson Tyrosinkinase
Ac	Azetat
AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AS	Aminosäure
at	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<b>b</b>	<b>nach Kontext: „Nukleobase“ oder „bovin“</b>
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i> )
bt	<i>Bos taurus</i>
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Caenorhabditis spec.</i>
<b>ca.</b>	<b>circa</b>
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i> )
ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (engl. <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> , CIAP)

CK II	Casein Kinase II
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
<b>d</b>	<b>Desoxyribonukleo-</b>
D	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig (engl.: <i>double-stranded</i> )
DTT	Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent-Assay</i> )
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (lateinisch: <i>et alterae</i> )
EthBr	Ethidiumbromid
<b>FAME</b>	<b><u>F</u>sel-<u>A</u>scl-Labor <u>M</u>eister-<u>A</u>G</b>
FH	FLAG-HA-Fusionspeptid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	<i>Firefly</i> -Luziferase
<b>g</b>	<b>nach Kontext:</b> <b>„Gramm“ oder „Erdbeschleunigung <math>g = 9,81 \text{ m*s}^{-2}</math>“</b>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GW/WG	Glycin-Tryptophan-Sequenzabfolgen

<b>h</b>	<b>nach Kontext: „human“ oder „Stunde“</b>
HA	Hämagglutinin-Fusionspeptid
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen (engl.: " <i>human embryonic kidney</i> "-cells)
HeLa	Henrietta Lacks
His	<i>hexa</i> -Histidinpeptid
hnRNP	heterogener, nukleärer Ribonukleoproteinpartikel
hs	<i>homo sapiens</i>
<b>IF</b>	<b>Immunofluoreszenz</b>
IgG	Immunglobulin der Klasse G
inkl.	inklusive
IP	Immunopräzipitation
<b>kd</b>	<b><i>in vivo</i> Depletion eines Transkriptes mittels siRNAs (engl.: <i>knock-down</i>)</b>
<b>L-</b>	<b>L-konfiguriert (lateinisch: <i>laevus</i> („links“))</b>
l	Liter
luci	Luziferase (engl.: <i>luciferase</i> )
<b>M</b>	<b>nach Kontext: „molar“ oder „(Größen)Marker“</b>
m	nach Kontext: „Meter“ oder „aus der Klasse der Säugetiere (Mammalia)“
m <sup>7</sup> G	7-Methyl-Guanosin- <i>Cap</i>
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i>
MEF	muriner Embryofibroblast (engl.: <i>mouse embryonic fibroblast</i> )
MG	Molekulargewicht
min	Minute
miR	miRNA
miRNA	microRNA
miRNP	miRNA-Protein-Partikel
mk	monoklonal
mm	<i>Mus musculus</i>
MPI(B)	Max-Planck-Institut (für Biochemie)
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger-RNA</i> )
<b>NCBI</b>	<b>engl.: <i>National Center for Biotechnology Information</i></b>
nt	Nukleotid, Nukleosid-5'-monophosphat
N-Terminus	Aminoterminus

NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
<b>ORF</b>	<b>kodierender Bereich einer DNA-Sequenz</b> (engl.: <i>open reading frame</i> )
<b>P<sup>32</sup></b>	<b>Phosphatrest (Phosphorylgruppe, -PO<sub>3</sub><sup>3-</sup>) mit Phosphor-32</b>
PAA	Polyacrylamid
PABPC1	zytoplasmatisches Poly(A)-bindendes Protein 1 (engl.: <i>cytoplasmic poly(A)-binding protein 1</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Prozessierungskörperchen (engl.: <i>processing-bodies</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i> )
pCp	Cytidin-3'-5'-biphosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
piRNA	PIWI-Protein-assoziierte RNA; (engl.: <i>PIWI-interacting RNA</i> )
PNK	Polynukleotidkinase
Poly(A)	Polynukleotid bestehend aus Adenylatresten
PPI	Phosphataseinhibitor
pre-	Vorläufer- (engl.: <i>precursor-</i> )
pri-	Primär- (engl.: <i>primary-</i> )
pS	Phosphoserin
pT	Phosphothreonin
pY	Phosphotyrosin
<b>qRT-PCR</b>	<b>quantitative Echtzeit-PCR</b> (engl.: <i>quantitative real-time PCR</i> )
<b>r</b>	<b>Ribonukleo-</b>
RDRC	RNA-gelenkter RNA-Polymerase-Komplex (engl.: <i>RNA-directed RNA polymerase complex</i> )
RISC	RNA-induzierter Repressorkomplex (engl.: <i>RNA-induced silencing complex</i> )
RITS	RNA-induzierte Initiation transkriptioneller Genexpressionsrepression (engl.: <i>RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing</i> )
RL	<i>Renilla</i> -Luziferase

rn	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)</b>
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Rotationen pro Minute
RRM	RNA-Erkennungsmotiv (engl.: <i>RNA recognition motif</i> )
rRNA	ribosomale RNA
RT	nach Kontext: „Raumtemperatur“ oder „Echtzeit (engl.: <i>real-time</i> )“
<b>S</b>	<b>Svedberg'sche Sedimentationskonstante S</b>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sp; <i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
siRNA	kleine, interferierende RNA (engl.: <i>small interfering RNA</i> )
siRNP	siRNA-Protein-Partikel
snoRNA	kleine, nukleoläre RNA (engl.: <i>small nucleolar RNA</i> )
<i>spec.</i>	Spezie (lateinisch: <i>species</i> )
ss	einzelsträngig (engl.: <i>single-stranded</i> )
<b>Tab.</b>	<b>Tabelle</b>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>Tris-buffered saline</i> )
TNRC6	Name einer bestimmten Proteinklasse, abgeleitet von engl.: " <i>trinucleotide repeat containing protein 6</i> "
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> -RNA
<b>U</b>	<b>nach Kontext: „unit(s)“ bzw. „Uracil“</b>
ÜS	Überstand
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTR	nicht-translatierte Region (engl.: <i>untranslated region</i> )
UV	ultraviolette Strahlung
<b>V</b>	<b>Volt</b>
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenanteil (engl.: <i>volume per volume</i> )
<b>WT</b>	<b>Wildtyp</b>
w/v	Masse pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i> )
<b>z.B.</b>	<b>zum Beispiel</b>

## V. Publikationen

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden in folgenden Artikeln publiziert:

A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody.

**Rüdel S**, Flatley A, Weinmann L, Kremmer E, Meister G.

RNA. 2008 Jun;14(6):1244-53. Epub 2008 Apr 22.

Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding.

**Rüdel S**, Wang Y, Lenobel R, Körner R, Hsiao HH, Urlaub H, Patel D, Meister G.

Nucleic Acids Res. 2010 Nov 10. [Epub ahead of print]

## 1. Zusammenfassung

Jedes nicht in sich geschlossene System braucht Regulationsmechanismen, um auf Umweltveränderungen reagieren zu können. Eine Form der Genexpressionsregulation in Säugerzellen wird durch kleine, nicht-kodierende RNAs vermittelt. Deren unmittelbare und essentielle Bindungspartner sind Vertreter der Argonaute-Proteinfamilie. Die Regulation dieser Proteine durch posttranslationale Modifikationen ist Thema der vorliegenden Doktorarbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass Fusionsproteine von humanem Ago1 und Ago2 an Threonin-, Serin- und Tyrosinresten *in vivo* phosphoryliert werden. Dazu gehört unter anderem der Tyrosinrest 529 (Y529), der in das Zentrum der miRNA-Bindungstasche von Ago2 ragt. Dieser Aminosäurerest stand im Fokus der umfassenden Charakterisierung, die biochemische *in vitro*-Studien mit co-exprimierten Tyrosinkinase und verschiedenen Ago2-Y529-Punktmutanten sowie zellbiologische Versuche beinhaltete. Mit dem generierten  $\alpha$ -Ago2-Antikörper (siehe unten) konnte die Tyrosinphosphorylierung schließlich auch für das endogene Ago2-Protein unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden. Die Daten sprechen dafür, dass die Phosphorylierung zu einer Blockade der Bindung kleiner RNAs führt. Versuche mit modifizierten RNAs lassen vermuten, dass die gegenseitige Abstoßung der beiden negativen Ladungen in der Bindungstasche, die des phosphorylierten Y529 sowie die am 5'-Ende der kleinen RNA, die molekulare Ursache der Blockade ist. Da erst der Komplex aus Ago-Protein und RNA eine für die Genexpressionsregulation funktionale Einheit bildet, fungiert die Phosphorylierung von Y529 möglicherweise als molekularer Schalter zur Deaktivierung von Ago und damit auch der Genexpressionsregulation *in vivo*.

Darüber hinaus konnte zusammen mit Elisabeth Kremmer ein monoklonaler Antikörper gegen das humane Ago2-Protein generiert werden. Die Charakterisierung zeigte, dass er das Protein spezifisch gegenüber anderen Vertretern dieser Proteinfamilie in Western-Blotanalysen, Immunopräzipitationsexperimenten sowie Immunofluoreszenzversuchen mit fixierten Zellen erkennt. Es ist es zudem gelungen, eine Reinigungsstrategie für endogenes Ago2-Protein unter Anwendung des Antikörpers zu etablieren. Diese erlaubt es,

das Protein in seiner nativen Struktur, unter Erhalt der enzymatischen Aktivität und in löslicher Form zu isolieren.

## 2. Einleitung

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man die durch doppelsträngige RNAs ausgelöste, sequenzspezifische Spaltung einer komplementären RNA in Eukaryoten.

Erstmals wahrgenommen wurde dieses Phänomen der durch RNA ausgelösten Repression komplementärer RNAs vor 20 Jahren, als das Einbringen weiterer Genkopien in Petunien nicht wie beabsichtigt zu einer kräftigeren Blütenfarbe führte, sondern im Gegenteil Pflanzen mit zum Teil weißen Blüten hervorbrachte (Napoli *et al.*, 1990). In Tieren wurde RNAi erst acht Jahre später durch Andrew Fire und Craig Mello entdeckt (Fire *et al.*, 1998). Nochmals acht Jahre später bekamen sie dafür den Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Das Interesse an RNAi geht längst über die Grundlagenforschung hinaus. Als neuartiger Therapieansatz ist die RNAi-Technologie auch in der Medizin sehr gefragt (Tiemann und Rossi, 2009).

In den letzten zehn Jahren hat man viele fundamentale Erkenntnisse zu den molekularen Grundlagen der RNA-vermittelten Repression komplementärer RNAs gewonnen: Als auslösende Molekülspezies wurden verschiedene Klassen kleiner RNAs identifiziert (Kim *et al.*, 2009; Abschnitt 2.1) und deren Biogenesewege erforscht (Miyoshi *et al.*, 2010; Abschnitt 2.2), unterschiedliche Funktionsmechanismen der RNA-Repression wurden offenbar (Fabian *et al.*, 2010; Abschnitt 2.4) und auch Proteine mit zentraler Bedeutung konnten charakterisiert werden (Perron und Provost, 2009; Eulalio *et al.*, 2009 (c); Ender und Meister, 2010; Abschnitt 2.3 und 2.5). In den folgenden Abschnitten sollen die einzelnen beteiligten Faktoren vorgestellt und ihre Funktionsweise näher erläutert werden. Den Schwerpunkt bildet dabei das tierische System.

## 2.1 Kleine RNAs mit Funktion in der Genexpressionsregulation – Eigenschaften, Biogenese, Bindungspartner und Wirkungsweise

Nichtkodierende, kleine RNAs, die bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen, lassen sich aufgrund ihrer Struktur, Biogenese, Vorkommen und/oder Funktionsweise in verschiedene Klassen einteilen. Die größten drei Klassen bilden die kleinen, interferierenden RNAs (engl.: *small interfering RNAs*, kurz: siRNAs), die microRNAs (miRNAs) und die mit PIWI-Proteinen interagierenden RNAs (engl.: *PIWI-interacting RNAs*, kurz: piRNAs). Neben ihrer geringen Länge von 19-31 Nukleotiden (nt) eint alle, dass sie ihre repressive Wirkung auf komplementäre Transkripte, den sogenannten *target*-RNAs, erst in Assoziation mit einem Vertreter der Argonaute-Proteinfamilie entfalten (Rana, 2007).

### 2.1.1 siRNAs

In vielen Organismen lässt sich RNAi durch lange doppelsträngige RNA induzieren (Fire *et al.*, 1998; Hammond *et al.*, 2000). Zahlreiche Studien haben aber gezeigt, dass auf molekularer Ebene 19 Basenpaar(bp) lange RNA-Duplices als Auslöser von RNAi agieren, die siRNAs. Sie resultieren aus der Prozessierung der langen, doppelsträngigen RNA durch Dicer, einem Ribonuklease (RNase)-III-Enzym, und tragen charakteristische ungepaarte Überhänge von zwei Nukleotiden Länge an den 3'-Enden und Phosphatgruppen an den 5'-Enden (Fire *et al.*, 1998, Hamilton und Baulcombe 1999; Elbashir *et al.*, 2001 (a)). Diese kleinen, interferierenden RNAs setzen sich zusammen aus dem „Leitstrang“ (engl.: *guide strand*), der sich durch nahezu perfekte Sequenzkomplementarität zur *target*-RNA auszeichnet und daher auch als *antisense*-Strang bezeichnet wird, und dem „Begleitstrang“ (engl.: *passenger strand*) bzw. *sense*-Strang (Rana 2007). Die Thermodynamik der Basenpaarung gibt vor, welcher der beiden Stränge zum Leitstrang wird: Der nämlich, dessen 5'-Ende weniger stabil gebunden ist. Dieser Sachverhalt ist als Asymmetrieregeln (engl.: *asymmetry rule*) bekannt geworden (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

Nach der Strangtrennung wird der Begleitstrang in der Regel degradiert und der Leitstrang in einen Vertreter der Klasse der Argonaute-Proteine (Abschnitt 2.3) eingebaut. Über komplementäre Basenpaarung vermittelt er die Identifizierung der *target*-RNA und positioniert gleichzeitig das Argonaute-Protein. Sofern das Argonaute-Protein über endonukleolytische Aktivität verfügt (Abschnitt 2.3.3.4 und 2.4.4), kommt es aufgrund der nahezu perfekten Basenkomplementarität der RNA-RNA-Assoziation zur Spaltung der *target*-RNA. Man spricht in dem Zusammenhang vom RNA-induzierten Repressorkomplex (engl.: *RNA-induced silencing complex*, kurz: RISC; Hammond *et al.*, 2000; siehe Abschnitt 2.4.4).

Bei Dicer-defizienten Zellen wurde nach der Zugabe von 19 bp-Duplices mit 3'-Überhängen von zwei Nukleotiden aber ohne 5'-Phosphatgruppen ebenfalls eine *target*-RNA-Repression via RNAi beobachtet (Kanellopoulou *et al.*, 2005). Tatsächlich werden die erforderlichen 5'-Phosphatgruppen in humanen Zellen durch die Kinase hClp1 ergänzt, so dass letztlich funktionale siRNAs entstehen (Weitzer und Martinez, 2007).

### 2.1.2 endo-siRNAs

Pflanzen und Tiere vermögen siRNAs endogen zu produzieren. Bei Tieren - mit Ausnahme von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) – konnten im Genom kodierte siRNAs jedoch lange Zeit nicht nachgewiesen werden (Ambros *et al.*, 2003; Ruby *et al.*, 2006; Okamura und Lai, 2008). Es galt, dass tierische siRNAs exogenen - beispielsweise viralen - Ursprungs sind und auf der Stufe der Dicer-Prozessierung (siehe Abschnitt 2.2; Abb. 2.1) in den endogenen miRNA-Biogeneseweg eingeschleust werden (Meister und Tuschl, 2004). Erst kürzlich konnten endogene RNAs mit gleichen Charakteristika wie siRNAs auch in *Drosophila melanogaster* (im Weiteren kurz *Drosophila*) und in murinen Oozyten nachgewiesen werden. Man spricht in dem Zusammenhang von endo-siRNAs (Okamura *et al.*, 2008; Czech *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2008). Die langen doppelsträngigen RNA-Vorläufermoleküle gehen aus bidirektionalen Transkriptionsprodukten repetitiver Elemente hervor

und/oder resultieren aus der Hybridisierung von Transkripten palindromischer Sequenzen (Watanabe *et al.*, 2008). Die zelluläre Funktion dieser endo-siRNAs ist bislang noch nicht verstanden.

### 2.1.3 piRNAs

piRNAs sind 24-31 nt lang, einzelsträngig und wurden bislang nur in tierischen Keimzellen, vor allem in männlichen, beobachtet. Zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung in *Drosophila* wurden piRNAs als *repeat-associated small interfering RNAs* (rasiRNAs) bezeichnet. Dieser Name leitet sich vom genetischen Kartierungsergebnis ab, demzufolge piRNA-Gene vorzugsweise in DNA-Regionen auftreten, die reich an sich wiederholenden Sequenzen (engl.: *repeats*) sind. Außerdem liegen sie oftmals zwischen Gensequenzen (engl.: *intergenic regions*) (Aravin *et al.*, 2001; Aravin *et al.*, 2003). Viele verschiedene piRNA-Loci befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander, so dass auch von piRNA-*clustern* gesprochen wird (Aravin *et al.*, 2006; Brennecke *et al.*, 2007). Die unmittelbaren Protein-Bindungspartner von piRNAs sind PIWI-Proteine, eine Unterklasse der Argonaute-Proteinfamilie (Girard *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2007; Brennecke *et al.*, 2007). Daraus resultiert die aktuelle Bezeichnung der „PIWI-Protein-interagierenden RNAs“, kurz piRNAs (engl.: *PIWI-interacting RNAs*). Für die Biogenese von piRNAs ist Dicer nicht erforderlich (Houwing *et al.*, 2007; Murchison *et al.*, 2007). Es wird vermutet, dass die RNA-Prozessierung stattdessen durch PIWI-Proteine mit Endonukleaseaktivität erfolgt (Gunawardane *et al.*, 2007). Doch die genauen Abläufe sind bislang unverstanden (Kim *et al.*, 2009). Bei Säugetieren wurden Veränderungen im piRNA-Expressionsmuster in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase beobachtet (Aravin *et al.*, 2007 (a)).

Das strukturelle Charakteristikum dieser RNA-Klasse bildet eine Methoxygruppe am 2'-Kohlenstoffatom des endständigen 3'-Nukleotids (Kirino und Mourelatos, 2007; Saito *et al.*, 2007). Die genaue Funktion dieser Modifikation ist unbekannt. Es ist anzunehmen, dass sie piRNAs zumindest anteilig vor unspezifischem Abbau schützt (Horwich *et al.*, 2007). Die bio-

logische Bedeutung von piRNAs besteht in der Inaktivierung von Retrotransposons (Aravin *et al.*, 2007 (b)). Das sind mobile genetische Elemente - auch als springende Gene bezeichnet -, deren bewegliches Modul aus RNA gebildet wird. Ihre Mobilität kann zu Mutationen führen und die Integrität des Genoms gefährden. Tatsächlich beobachtete man in Abwesenheit von piRNAs eine Zunahme der Transposonaktivität in *Drosophila* (Brennecke *et al.*, 2007), ebenso in Abwesenheit funktionaler Proteinbindungspartner (Sarot *et al.*, 2004; Carmell *et al.*, 2007).

#### 2.1.4 miRNAs

Bei miRNAs handelt es sich wie bei piRNAs um einzelsträngige, Genom-kodierte RNAs, die in Assoziation mit Argonaute-Proteinen die Genexpression regulieren. Sie sind jedoch nur 21 nt lang und ubiquitär exprimiert. Mit siRNAs (Abschnitt 2.1.1) haben sie die 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe gemein (Krol *et al.*, 2010 (b)). Grundsätzlich unterscheiden sich miRNAs in ihrer chemischen Natur oder im molekularen Aufbau nicht von siRNAs. Erst die Biogenese und die molekularen Wirkungsmechanismen erlauben die Abgrenzung der beiden Klassen (Abschnitt 2.2 und 2.4.3; Abb. 2.1).

Die miRNA-Biogenese (Abschnitt 2.2) startet im Kern mit der Synthese des polycistronischen Primärtranskriptes (engl.: *primary transcript*, kurz: pri-miRNA), das durch die Aktivität des RNase III-Enzyms Drosha weiter prozessiert wird zu miRNA-Vorläufermolekülen (engl.: *precursor-miRNAs*, kurz: pre-miRNAs). Nach dem Transport dieser haarnadelartig gefalteten, einzelsträngigen RNA ins Zytoplasma erfolgt ein weiterer Prozessierungsschritt ausgeführt durch Dicer, das zweite RNase III-Enzym des Biogeneseweges (Abb. 2.1; Kim *et al.*, 2009). Es resultieren kurze RNA-Duplices bestehend aus der zukünftigen reifen miRNA und dem Gegenstrang miRNA\* (sprich engl.: „*miRNA star*“). Anders als bei siRNAs sind die Sequenzen von miRNA und miRNA\* nicht zwangsläufig perfekt komplementär zueinander, der Duplex kann ungepaarte Stellen (engl.: „*bulges*“) aufweisen. Die Trennung der Stränge und die Entscheidung, welcher nachfolgend als reife miRNA in ein Argonaute-Protein

eingebaut wird, erfolgt gemäß der Asymmetrieregeln (Abschnitt 2.1.1) und wird durch die Aktivitäten verschiedener Proteinfaktoren unterstützt (Kim *et al.*, 2009; Abschnitt 2.2). Der assemblierte Komplex aus reifer miRNA und Argonaute-Protein wird auch als microRibonukleoprotein-Partikel (miRNP) bezeichnet. Durch die gebundene miRNA wird der miRNP zur *target*-mRNA dirigiert. Die 5'-terminalen Nukleotide zwei bis acht der miRNA, die so genannte „*seed sequence*“ (engl.), spielen bei der Identifizierung der miRNP-Bindungsstelle via komplementärer Basenpaarung eine zentrale Rolle (Doench und Sharp, 2004; Brennecke *et al.*, 2005; Bartel, 2009). Außerhalb der *seed sequence* werden ungepaarte Sequenzabschnitte dagegen toleriert, ohne sich negativ auf die miRNP-*target*-RNA-Assoziation auszuwirken. Bis auf wenige Ausnahmen befinden sich miRNP-Bindungsstellen in den terminalen Sequenzbereichen der 3'-UTRs von *target*-RNAs (Rajewsky, 2006; Grimson *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008).

Die zelluläre Funktion von miRNAs besteht in der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression. Diese erfolgt entweder durch Inhibition der Translation des Transkripts (Abschnitt 2.4.3.1) oder durch Destabilisierung der *target*-RNA mittels Rekrutierung von RNA-abbauenden Enzymen (Abschnitt 2.4.3.2) (Fabian *et al.*, 2010). Letzteres scheint den dominierenden Mechanismus der miRNA-vermittelten Expressionsrepression darzustellen (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010). Im seltenen Fall einer perfekt komplementären Basenpaarung von miRNA und *target*-RNA und bei Assoziation mit einem enzymatisch aktiven Argonaute-Protein verhalten sich miRNAs wie siRNAs und es kommt zur Spaltung der *target*-RNA (Yekta *et al.*, 2004; Abschnitt 2.4.4). Jüngst wurde auch die Aktivierung der Expression durch miRNPs beobachtet (Vasudevan *et al.*, 2007; Vasudevan und Steitz, 2007; Abschnitt 2.4.3 Ende). Der genaue Mechanismus hierzu ist allerdings noch unverstanden.

Der zelluläre Einfluss von miRNAs erstreckt sich über zahlreiche biologische Prozesse wie Entwicklung, Stoffwechsel, Wachstum und Zelltod (Kim *et al.*, 2009). Eine Störung der

miRNA-Expression geht häufig mit Krankheitsbildern und/oder Entwicklungsdefekten einher (Baltimore *et al.*, 2008; Croce, 2009; Eacker *et al.*, 2009).

### 2.1.5 Kleine, regulatorische RNAs in Prokaryoten

Auch in einigen Bakterien und Archaeen existiert ein auf kleinen RNAs basierendes System mit regulatorischer Funktion: das CRISPR-System (engl.: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, kurz: CRISPR). Wie bei Eukaryoten besteht der funktionale Effektor-Komplex aus kleiner RNA und Protein(en). Die enzymatische Aktivität dieses Komplexes führt zur Degradation zellfremder Nukleinsäuren und stellt somit einen Abwehrmechanismus, beispielsweise gegen Phagen, dar (Karginov und Hannon, 2010). Zwar weisen das CRISPR-System und die durch kleine RNAs vermittelte Genexpressionsregulation bei Eukaryoten durchaus Analogien auf, so sind in beiden Fällen die RNA-Gene in *clustern* organisiert und die kleinen, regulatorischen RNAs gehen aus doppelsträngigen Vorläufermolekülen hervor. Dennoch bestehen ebenso bedeutende Unterschiede: Während die 35-57 nt langen CRISPR-RNAs auch DNA als Substrat erkennen, richten sich die 19-31 nt langen eukaryotischen RNAs gegen RNA (Karginov und Hannon, 2010).

## 2.2 miRNA-Biogenese und miRNP-Assemblierung in humanen Zellen

RNA-Polymerase II katalysiert die Synthese von mRNAs und RNA-Polymerase III unter anderem die der ribosomalen 5S-RNA und tRNA. Auch die Transkription von miRNA-Genen, die oftmals in Intronsequenzen von Protein-kodierenden Genen liegen, erfolgt durch RNA-Polymerase II oder III (Kim *et al.*, 2009). Die resultierenden Primärtranskripte sind mono- oder polycistronische pri-miRNAs (abgeleitet von *primary miRNA-transcript* (engl.)). Ihre Struktur besteht aus schlaufenähnlichen Bereichen (engl. *loops*), vor allem aber aus doppelsträngigen Sequenzabschnitten, die von wenige Nukleotide umfassenden *bulge*-Strukturen unterbrochen sind (Abb. 2.1). pri-miRNAs stellen die Substrate des nukleären Mikroprozessorskomplexes dar. Dieser besteht unter anderem aus dem RNase III-Enzym Drosha und dem doppelsträngige RNA(dsRNA)-bindenden Protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). DGCR8 erkennt das dem *loop* abgewandte Ende der pri-miRNA und positioniert durch Protein-Protein-Interaktion dabei auch Drosha auf der RNA (Han *et al.*, 2006). Drosha katalysiert schließlich die Endonukleolyse der pri-miRNA (Lee *et al.*, 2003). Aus dieser Prozessierung resultieren ca. 70 nt lange miRNA-Vorläufermoleküle (engl.: *precursor-miRNAs*, kurz: pre-miRNAs) mit charakteristischer Haarnadelstruktur, einem Überhang von 2 Nukleotiden am 3'-Ende und einer 5'-Phosphatgruppe (Abb. 2.1). Diese Prozessierungsintermediate werden schließlich ins Zytoplasma exportiert und dort von einem weiteren RNase III-Enzym, nämlich Dicer, erkannt. Der nächste Reifungsschritt besteht in der enzymatischen Abspaltung des endständigen *loops*. Es resultiert ein ca. 23 nt langer miRNA-Doppelstrang, bestehend aus 19 Basenpaaren plus je zwei ungepaarten Nukleotiden an den 3'-Enden und 5'-Phosphatgruppen (Hutvagner *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001 (a); Abb. 2.1). Schließlich wird ein Strang als reife miRNA in ein Argonaute-Protein eingebaut, während der Gegenstrang miRNA\* im Allgemeinen degradiert wird.

Zwischen Dicer und Argonaute besteht eine physikalische Verbindung. Es ist vorstellbar, dass die miRNA-Prozessierung durch Dicer und die nachfolgende Beladung von

Argonaute mit der reifen miRNA gekoppelt erfolgen (Chendrimada *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005; Maniataki und Mourelatos, 2005; Meister *et al.*, 2005). Die räumliche Nähe würde die Beladung von Argonaute mit den korrekten RNAs sicherstellen und das Risiko eines irrtümlichen Einbaus unspezifischer RNAs, wie beispielsweise von RNA-Abbauintermediaten, minimieren. Jüngste Daten widerlegen dieses Szenario jedoch. Demnach erfolgt erst die pre-miRNA-Prozessierung durch Dicer und davon entkoppelt die ATP-abhängige Beladung des Argonaute-Proteins mit dem miRNA-Duplex (Yoda *et al.*, 2010).

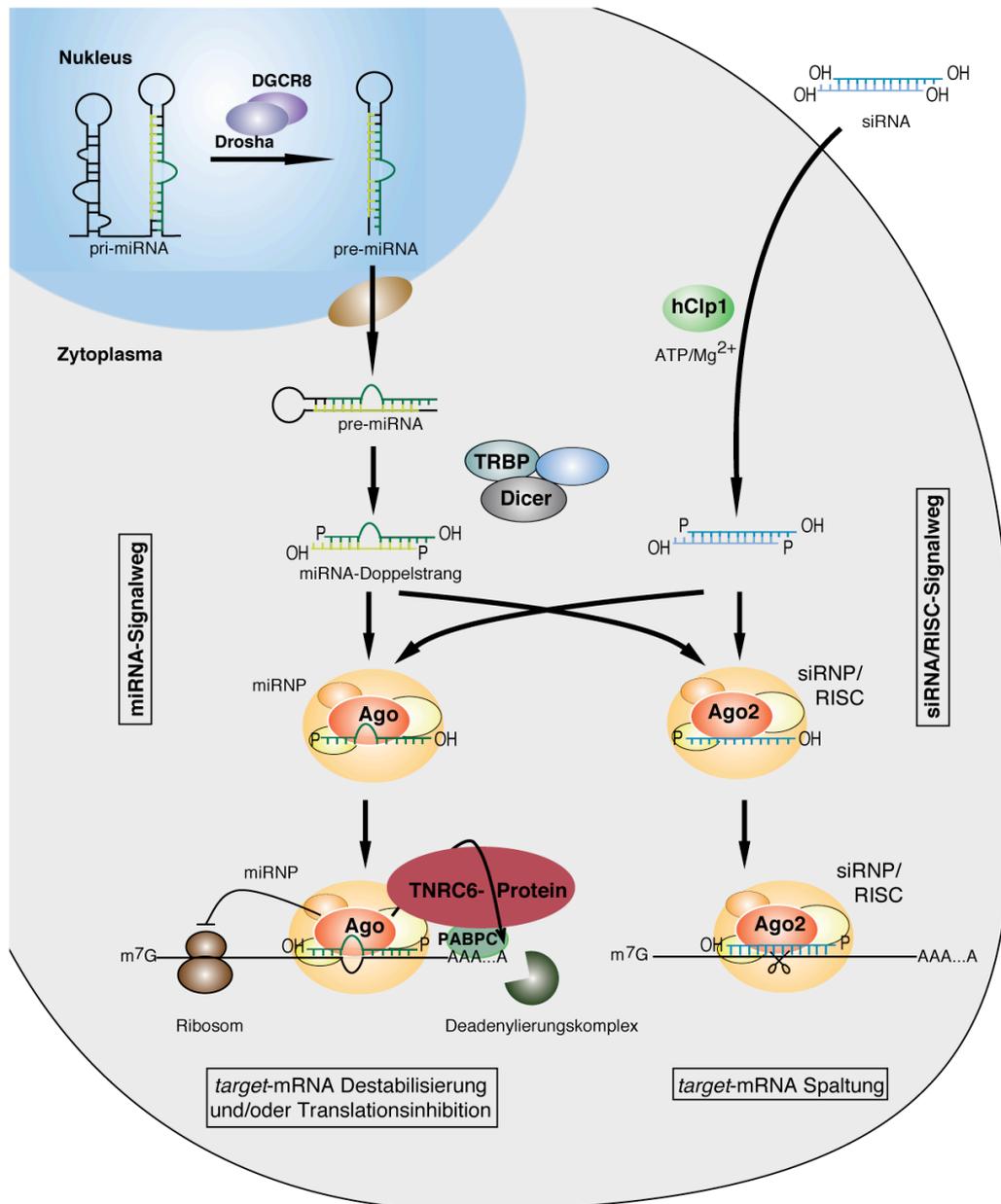
Die Proteine TRBP und/oder PACT unterstützen diesen Übergang vom Dicer-Prozessierungsintermediat zum reifen Argonaute-miRNA-Komplex (Chendrimada *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Sofern das zu beladene Argonaute-Protein über RNA-Spaltaktivität verfügt, begünstigt dies ebenfalls die Assemblierung des miRNPs, vermutlich weil die Fragmentierung des Gegenstranges dessen Dissoziation erleichtert (Diederichs und Haber, 2007). Allerdings erfordert die Spaltung durch Argonaute eine perfekt komplementäre Basenpaarung des miRNA-Duplexes im Bereich des 10. und 11. Nukleotids der zukünftigen reifen miRNA (Elbashir *et al.*, 2001 (a, b)). Diese Voraussetzung wird in der Regel von siRNAs (Abschnitt 2.1.1), jedoch nicht von miRNAs (Abschnitt 2.1.4) erfüllt. Auch sind die katalytisch inaktiven humanen Argonaute-Proteine in gleichem Maße mit miRNAs beladen wie das spaltaktive Protein Ago2 (Meister *et al.*, 2004 (b); Abschnitt 2.3.3). Offensichtlich ist die RNA-Spaltaktivität von Argonaute für die miRNP-Assemblierung zwar förderlich, aber nicht essentiell (Matranga *et al.*, 2005).

Die beobachtete ATP-Abhängigkeit der miRNP-Bildung (Nykänen *et al.*, 2001; Yoda *et al.*, 2010), ließ vermuten, dass auch RNA-Helikasen, wie beispielsweise die RNA-Helikase A (RHA; Robb und Rana, 2007), an der Assemblierung beteiligt sein könnten. Kürzlich sind jedoch Ergebnisse publiziert worden, die auf eine Beteiligung des ebenfalls ATP-abhängigen Chaperon-Komplexes Hsc70/Hsp90 am miRNP-Assemblierungsschritt hindeuten. Je nach Modellsystem haben sich dabei unterschiedliche Reaktionsschritte als Chaperon-unterstützt erwiesen (Iwasaki *et al.*, 2010; Iki *et al.*, 2010).

Die Identifizierung der kleinen RNA durch Ago erfolgt unabhängig von der RNA-Sequenz (Wang *et al.*, 2008 (b)). Die entscheidende Rolle spielt das 5'-Ende der kleinen RNA (Hall, 2005; Abschnitt 2.3.3.3)

Im Allgemeinen zählen miRNAs zu den langlebigen zellulären RNAs, vor allem wenn sie im Verbund mit Ago und *target*-RNA vorliegen (Hwang *et al.*, 2007; Chatterjee und Grosshans, 2009). Bislang konnte für den spezifischen miRNA-Abbau in humanen Zellen keine Enzymaktivität identifiziert werden; im Gegensatz zum *C. elegans*-System, wo die Degradation reifer miRNAs unter bestimmten Voraussetzungen durch die 5'-3'-Exonuklease XRN-2 erfolgt (Chatterjee und Grosshans, 2009). Allerdings ist bekannt, dass posttranskriptionale Sequenzmodifikationen die miRNA-Stabilität beeinflussen (Kai und Pasquinelli, 2010; Krol *et al.*, 2010 (b)).

Die Regulation der miRNA-Biogenese ist vielschichtig (Krol *et al.*, 2010 (b)). Sie kann auf der Stufe der Transkription erfolgen oder durch Beeinflussung der Prozessierung, beispielsweise durch gesteuerte Bereitstellung der erforderlichen Proteine oder Einflussnahme auf deren Aktivität. Auch die miRNA selbst erfährt mitunter Veränderungen, wie nicht-Gen-kodierte Sequenzerweiterungen und/oder -modifikationen, die sich auf ihre Funktionalität auswirken. Zudem können weitere Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, die Mikroprozessorproteine p68 und p72 oder auch heterogene, nukleäre Ribonukleoproteinpartikel (hnRNPs) und SMAD-Proteine den miRNA-Signalweg beeinflussen (Krol *et al.*, 2010 (b)). Schließlich unterliegt auch der miRNA-Abbau Kontrollmechanismen: So ändert sich die Halbwertszeit bestimmter miRNAs in der Retina in Abhängigkeit der Lichtverfügbarkeit, während die Stabilität anderer miRNAs gleichzeitig unverändert bleibt (Krol *et al.*, 2010 (a)).



**Abbildung 2.1**  
**Modell zur Biogenese und Funktionsweise von miRNPs und siRNPs/RISC**  
**beim Menschen**

miRNA-Signalweg (links): Aus miRNA-Primärtranskripten (pri-miRNAs) werden im Nucleus durch den Mikroprozessorkomplex (Droscha/DGCR8) miRNA-Vorläufermoleküle (pre-miRNAs) freigesetzt, die ungepaarte *bulge*- und *loop*-Regionen beinhalten. Nach deren Export ins Zytoplasma erfolgt die weitere Prozessierung durch Dicer und Dicer-Cofaktoren wie TRBP und/oder PACT zu einem doppelsträngigen miRNA-Intermediat mit 5'-Phosphatgruppen und 2 nt-Überhängen an den 3'-Enden. Während der miRNA\*-Strang (hellgrün) im Allgemeinen degradiert wird, erfährt die reife miRNA (dunkelgrün) den Einbau in ein Argonaute-Protein (Ago). Es resultiert ein microRibonukleoprotein-Partikel (miRNP), mit dem weitere Proteine assoziiert sind,

unter anderem auch ein Vertreter der TNRC6-Proteine. Dieser trägt durch Protein-Protein-Interaktionen (PABPC) und Rekrutierung weiterer Proteine (Deadenylierungskomplex) maßgeblich zur *target*-RNA-Repression durch Destabilisierung und/oder Translationsinhibition bei. Wird eine reife miRNA in endonukleolytisch aktives Ago2 eingebaut und hybridisiert zudem mit einer perfekt komplementären *target*-RNA-Sequenz, dann kommt es zur RISC-typischen Spaltung der *target*-RNA (Querpfel nach rechts). Die durch miRNAs induzierte Aktivierung der Genexpression ist nicht dargestellt. siRNA/RISC-Signalweg (rechts): Beim Menschen haben siRNAs in der Regel einen extrazellulären Ursprung; endo-siRNA sind im Modell nicht berücksichtigt worden. siRNAs kennzeichnet eine perfekt komplementäre Basenpaarung. Sie verhalten sich – nach der Phosphorylierung der 5'-Enden durch humanes Clp1 (hClip1) – wie endogene miRNAs. Es folgt der Einbau eines siRNA-Einzelstranges in ein Ago-Protein. Dieser Komplex kann analog zum miRNP als siRNP bezeichnet werden. Einen Spezialfall stellt hierbei der Einbau in RNA-spaltaktives Ago2 in Kombination mit einer perfekt komplementären *target*-RNA-Bindungssequenz dar: Es kommt zu einer durch Ago2 katalysierte Spaltung der *target*-RNA. Man spricht vom *RNA-induced silencing complex* (RISC). Unter anderen molekularen Voraussetzungen kann die siRNA ebenso zur Destabilisierung und/oder Translationsinhibition der *target*-RNA führen wie eine miRNA (Querpfel). Weitere Erläuterungen sind Abschnitt 2.2 und 2.4 zu entnehmen. m<sup>7</sup>G, 7-Methyl-Guanosin-*Cap*; AAA...A, Poly(A)-Schwanz

In den letzten Jahren sind Ausnahmen des Konsensus-Biogeneseweges bekannt geworden. So können funktionale miRNAs unter Umgehung des Mikroprozessorkomplexes auch infolge von *splicing*-Aktivitäten aus kurzen Haarnadel-förmigen Introns – den sogenannten Mirtrons (Ruby *et al.*, 2007) – hervorgehen (Okamura *et al.*, 2007; Berezikov *et al.*, 2007; Babiarz *et al.*, 2008). Ebenso wurden miRNA-ähnliche Prozessierungsprodukte von tRNAs (Cole *et al.*, 2009) oder snoRNAs (Ender *et al.*, 2008; Saraiya *et al.*, 2008; Taft *et al.*, 2009) identifiziert. Eine Dicer-unabhängige miRNA-Prozessierung durch Ago2 wurde kürzlich für miRNA-451 beschrieben (Cheloufi *et al.*, 2010; Cifuentes *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

## 2.3 Argonaute-Proteine, die zentralen Proteinfaktoren der RNA-vermittelten Genexpressionsregulation

Argonaute-Proteine stellen die unmittelbaren Bindungspartner regulatorisch wirkender, kleiner RNAs dar (Ma *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2005). Sie sind daher von ebenso zentraler Bedeutung für diesen Signalweg wie die RNAs selber. Ihren Namen verdankt die Proteinfamilie einer *Arabidopsis thaliana*-Mutante, deren in der Entwicklung gestörte Blätter phänotypisch an die zu den Kopffüßlern zählenden Argonauta erinnern (Bohmert *et al.*, 1998). Die Argonaute-Proteinfamilie ist evolutiv hoch konserviert (Carmell *et al.*, 2002). Während die Funktion der kleinen RNA darin besteht, den Effektor-Komplex zur jeweiligen *target*-RNA zu dirigieren, bestimmt Argonaute durch Rekrutierung weiterer Proteinfaktoren das Schicksal der *target*-RNA (Chekulaeva und Filipowicz, 2009). Welche speziellen Eigenschaften es den Argonaute-Proteinen erlauben, zwischen *target*-RNA-Identifizierung und den molekularen Mechanismen der *target*-RNA-Regulation zu vermitteln, soll nachfolgend erläutert werden.

### 2.3.1 Die Argonaute-Proteinfamilie ist phylogenetisch konserviert

Seit der Entdeckung des Ago1-Gens in *Arabidopsis thaliana* wurden ähnliche Gensequenzen in den verschiedensten Organismen und in stark variierender Anzahl identifiziert: Sowohl bei Archaeen (*Archeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*) und Bakterien (*Aquifex aeolicus*) als auch bei Eukaryoten wie Pflanzen und Tieren - folglich in allen Reichen der Biologie. Der hohe Konservierungsgrad der Argonaute-Proteinfamilie legt nahe, dass ihre Mitglieder eine bedeutende physiologische Rolle spielen (Carmell *et al.*, 2002; Farazi *et al.*, 2008; Hutvagner und Simard, 2008; Höck und Meister, 2008).

Der weit verbreitete Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) stellt eine Ausnahme dar, da in seinem Genom keine Argonaute-kodierende Gensequenzen nachgewiesen werden konnten. Jedoch lässt sich durch rekombinante Expression von Dicer- und Ago-Genen anderer Hefespezies die RNA-vermittelte Genexpressionsregulation in

*S. cerevisiae* rekonstituieren (Drinnenberg *et al.*, 2009). Das Genom der artverwandten Spalt-  
hefe *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) kodiert ein Argonaute-Gen (Volpe *et al.*, 2002).

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind zehn Argonaute-Gene nachweisbar (Vaucheret, 2008), in dem von *C. elegans* konnten sogar 27 Argonaute-ähnliche Gensequenzen identifiziert werden (Yigit *et al.*, 2006). Einen Überblick über die Anzahl von Argonaute-ähnlichen Genen in den verschiedenen Organismen gibt Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1**  
**Anzahl Argonaute-ähnlicher Gensequenzen in verschiedenen Spezies**

Spezie	Genanzahl	Spezie	Genanzahl
<i>Homo sapiens</i>	8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10
<i>Mus musculus</i>	8	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
<i>Drosophila melanogaster</i>	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0
<i>Caenorhabditis elegans</i>	27	<i>Neurospora crassa</i>	2

Die Angaben zu *Homo sapiens* und *Mus musculus* sind Carmell *et al.* (2002) entnommen, die übrigen Hutvagner und Simard (2008).

Die verschiedenen Argonaute-Proteine eines Organismus sind nicht redundant (Hutvagner und Simard, 2008). Sie binden distinkte Klassen kleiner RNAs (Ghildiyal und Zamore, 2009; Kim *et al.*, 2009), sind in unterschiedlichem Maße enzymatisch aktiv (Hutvagner und Simard, 2008) und zeigen spezifische Expressionsmuster (Meister *et al.*, 2004 (b); Wu *et al.*, 2010; Deng und Lin, 2002).

### 2.3.2 Untergliederung der Argonaute-Proteinfamilie

Die Familie der Argonaute-Proteine teilt sich in drei Unterfamilien auf. Zu diesen zählt erstens die Familie der keimzellspezifischen PIWI-Proteine (Abkürzung für *P-element induced wimpy testis* (engl.); Lin und Spradling, 1997), zweitens die der ubiquitär exprimierten Ago-Proteine und drittens die der wurmspezifischen AGOs (WAGOs), die auch als Gruppe III-Agos oder sekundäre AGOs (SAGOs) bezeichnet werden (Yigit *et al.*, 2006; Faehnle und Joshua-Tor, 2007). Die Einteilung in die drei Unterfamilien erfolgt anhand der

Sequenzhomologie zu den Proteinen Piwi aus *Drosophila* und AGO1 aus *Arabidopsis thaliana* (Carmell *et al.*, 2002). Die WAGOs zeichnen sich dadurch aus, dass kein Vertreter dieser Unterfamilie eine vollständige, für die Endonuklease-Aktivität erforderliche, katalytische Aminosäuretriade (Abschnitt 2.3.3.4) aufweist. Mit den daraus resultierenden funktionalen Konsequenzen lassen sie sich weder eindeutig den PIWI- noch den Ago-Proteinen zuordnen, so dass sie als dritte Unterfamilie der Argonaute-Proteine geführt werden (Yigit *et al.*, 2006).

### 2.3.3 Die Argonaute-Proteine der Säugetiere

Das menschliche Genom kodiert acht Argonaute-Proteine: Neben vier PIWI-Proteinen auch vier Vertreter der Ago-Unterfamilie. Die PIWI-Gene heißen HIWI1, HIWI2, HIWI3 und HILI und sind auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Ihnen gegenüber stehen Ago1, Ago2, Ago3 und Ago4 der Ago-Unterfamilie. Die Gensequenzen von Ago1, 3 und 4 befinden sich als *cluster* auf Chromosom 1, während das Ago2-Gen neben dem von Hili auf Chromosom 8 lokalisiert ist (Sasaki *et al.*, 2003).

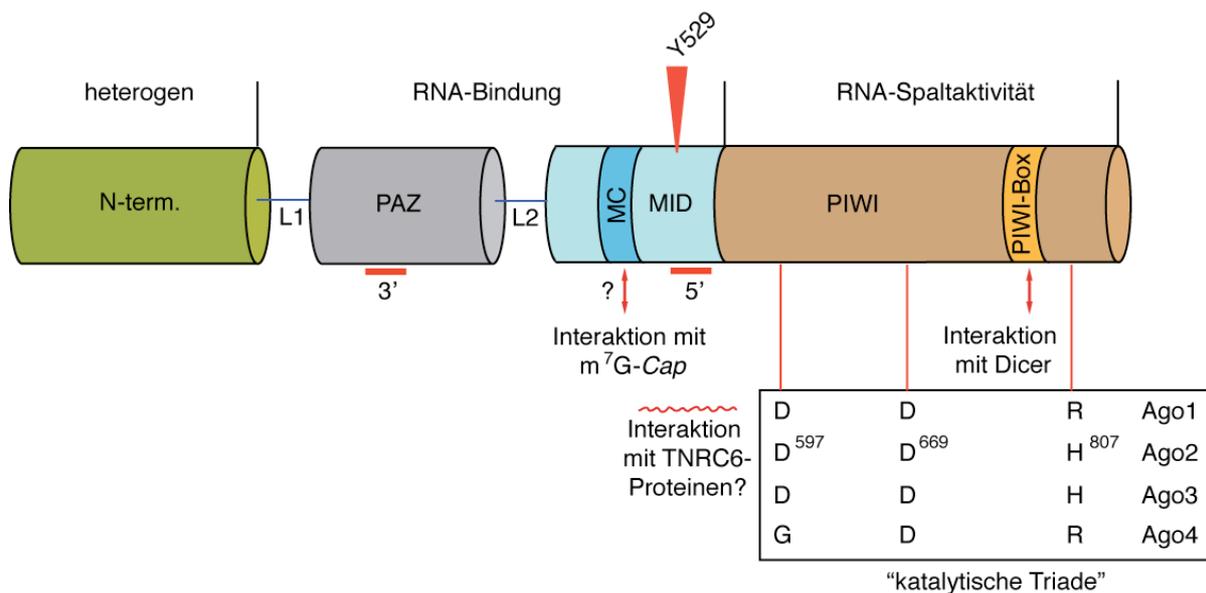
Embryostammzellen von Mäusen, die keine Proteine der Ago-Unterfamilie exprimieren, sind nicht zur Genexpressionsregulation durch kleine RNAs fähig und unterliegen der Zellapoptose. Interessanterweise ist dieser Phänotyp reversibel, sobald ein beliebiges der Ago-Proteine Ago1-4 ektopisch exprimiert wird (Su *et al.*, 2009).

Ago2 war der erste klonierte Vertreter der humanen Ago's, nachdem man das Protein in einer die Translation stimulierenden Reinigungsfraction identifiziert hatte (Zou *et al.*, 1997). Eine tatsächliche Beteiligung von Ago2 bei der Translation wurde dabei nicht nachgewiesen. Infolge dieser Studie werden Ago-Proteine auch als eukaryotische Translationsinitiationsfaktoren 2C 1 bis 4 (eIF2C1-4) bezeichnet.

Die Identifikation von Ago1 in Säugetieren erfolgte bei einem Antikörperscreen mit Geweben von Ratten (Cikaluk *et al.*, 1999). Das Protein trat in Assoziation mit dem Golgi-

Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) auf und ist daher auch als GER95p (Golgi ER Protein 95 kD) bekannt (Cikaluk *et al.*, 1999).

Argonaute-Proteine sind basische, RNA-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von durchschnittlich 100 kD. Einige Vertreter können unter gewissen molekularen Voraussetzungen die sequenzspezifische Hydrolyse einer *target-RNA* katalysieren (Höck und Meister, 2008; Abschnitt 2.4.4). Bei den humanen Ago-Proteinen ist das Ago2. Argonaute-Proteine zeichnen sich ferner durch das Vorhandensein zweier charakteristischer Domänen aus: der PIWI/Argonaute/Zwille- (PAZ-) und der *P-element induced wimpy testis*- (PIWI-) Domäne. Davon leitet sich ihre Zugehörigkeit zu den so genannten PAZ-PIWI-Domänen- (PPD)-Proteinen ab. Die Domänenstruktur ist in Abbildung 2.2 illustriert.



**Abbildung 2.2**

**Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Argonaute-Proteinen und deren vermuteten molekularen Funktionen**

Argonaute-Proteine weisen vier große Faltungseinheiten auf: den N-terminalen Bereich (N-term.), sowie die PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille)-, MID (middle)- und PIWI (*P-element induced wimpy testis*)-Domäne, verbunden durch zwei Aminosäuresequenzen *linker1* (L1) und *linker2* (L2). Die Domäneneinteilung leitet sich von der Kristallstruktur des PIWI-Proteins von *Aquifex aeolicus* ab (Yuan *et al.*, 2005). Die molekularen Funktionen verschiedener Sequenzabschnitte sind rot gekennzeichnet und in den Abschnitten 2.3.3.1-2.3.3.4 näher erläutert. *m<sup>7</sup>G-Cap*, 7-Methyl-Guanosin-Cap.

Nachfolgend sollen die einzelnen Domänen und ihre Eigenschaften vorgestellt werden.

### 2.3.3.1 N-Terminus

Im N-terminalen Bereich manifestieren sich die größten Sequenzunterschiede der vier humanen Ago-Proteine, die insgesamt eine Aminosäuresequenzhomologie von rund 80% aufweisen (nicht gezeigte Daten).

### 2.3.3.2 PAZ-Domäne

Die PAZ-Domäne umfasst die Bindungstasche, in der das 3'-Ende der kleinen RNA verankert wird. Mutagenesestudien haben gezeigt, dass diese Bindung auf zahlreichen Interaktionen verschiedener Aminosäureseitenketten mit dem Ribose-Phosphatrückgrat der RNA basiert. Folglich ist die Bindung des 3'-Endes weitgehend unabhängig von der Basensequenz (Lingel *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2005). Mit hoher Affinität werden dagegen die zwei ungepaarten 3'-Nukleotide eines miRNA-Duplex erkannt (Ma *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004). Doch auch voluminöse Modifikationen am 3'-Ende der kleinen RNA, wie beispielsweise ein Biotinrest an einer 7-gliedrigen Kohlenstoffkette, stören den Einbau in Ago nicht (Martinez *et al.*, 2002).

In den Laboren von Hannon und Parker hat man die Auswirkungen eines gleichzeitigen Austausches von neun Aminosäuren im Sequenzbereich der Bindungstasche gegen Alanin untersucht („PAZ9“-Mutante; Liu *et al.*, 2005 (a)). Zwar interagiert das mutierte Protein mit Dicer, doch eine miRNA-Bindung konnte nicht nachgewiesen werden. Außerdem lokalisiert die PAZ9-Mutante nicht wie das Wildtypprotein in speziellen zytoplasmatischen RNA-Protein-Strukturen, den so genannten *processing bodies* (Abschnitt 2.6.2; Liu *et al.*, 2005 (a)).

### 2.3.3.3 MID-Domäne

Die Bindungstasche für das 5'-Ende der kleinen RNA ist Teil der MID-Domäne (abgeleitet vom englischen Wort *middle*). Kristallstrukturen prokaryotischer Ago-Proteine beladen mit kurzen Nukleinsäureketten (Parker *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Rivas

*et al.*, 2005) und eine der isolierten MID-Domäne eines eukaryotischen Ago-Proteins (Boland *et al.*, 2010) haben in Kombination mit Mutagenesestudien gezeigt, dass die für die miRNA-Verankerung essentiellen Aminosäureseitenketten gegenüber denen der 3'-miRNA-Bindungstasche relativ genau definiert werden können. Eine zentrale Rolle spielt eine Tyrosinseitenkette – Tyrosin-123 (Tyr123 oder Y123) beim Piwi-Protein von *Archaeoglobus fulgidus* und Y529 beim humanen Ago2-Protein (Hall, 2005). Zwischen der Hydroxylgruppe dieses Aminosäurerestes und der 5'-Phosphorylgruppe der RNA kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Des weiteren treten die  $\pi$ -Elektronen der aromatischen Ring-systeme vom Tyrosinrest und der Base des ersten 5'-Ribonukleotids in Wechselwirkung miteinander (engl.: *stacking*). Die Wasserstoffbrücke ermöglicht die Erkennung des miRNA-charakteristischen 5'-Phosphatrestes und die *stacking*-Interaktion die sequenzunabhängige Fixierung der kleinen RNA (Hall, 2005). Allerdings haben RNA-Sequenzierungsstudien gezeigt, dass aus humanem Gewebe isolierte miRNAs überwiegend Uracil (U) oder Adenin (A) als erste 5'-Base aufweisen (Hu *et al.*, 2009). Und kürzlich veröffentlichte NMR-Titrationsdaten von der MID-Domäne des humanen Ago2-Proteins und Nukleosid-Monophosphaten bestätigen, dass Adenosin- und Uridin-Monophosphate tatsächlich einen kinetischen Vorteil gegenüber Guanosin- und Cytosin-Monophosphaten bei der Ago-Bindung haben (Frank *et al.*, 2010). Von Bindungsstudien mit 5'-modifizierten kleinen RNA-Duplices ist bekannt, dass bevorzugt 5'-phosphorylierte Stränge in Ago eingebaut werden (Chen *et al.*, 2008). Transfizierte, unphosphorylierte siRNAs werden in der Zelle durch hC1p1 phosphoryliert und erfüllen damit das 5'-Phosphatkriterium ebenfalls (Weitzer und Martinez, 2007). Bei der miRNP-Assemblierung *in vitro* mit einzelsträngiger RNA (Abschnitt 2.4.4; Abb. 2.3) ist die 5'-Phosphorylgruppe dagegen grundsätzlich verzichtbar. Sogar 5'-methylierte Stränge werden eingebaut (Martinez *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008). Rivas und Kollegen (2005) beobachteten mit 5'-unphosphorylierter RNA und rekombinantem Ago-Protein bei der *target*-RNA-Spaltung durch RISC (Abschnitt 2.4.4) jedoch eine erhöhte Abweichung von der vorhergesagten Endonukleolyse-Position. Generell zeigt die Bindungstasche für das miRNA-5'-

Ende eine geringere Toleranz gegenüber RNA-Modifikationen als die für das 3'-Ende (Martinez *et al.*, 2002). Neben Y529 tragen auch die entwicklungsgeschichtlich konservierten Seitenketten K533, Q545 und K570 (YKQK-Motiv) sowie Atome der Hauptkette von C546 zur Positionierung des 5'-Endes bei (Frank *et al.*, 2010).

Eine weitere Rolle soll die 5'-Bindungstasche und im speziellen Y529 bei der Interaktion von Ago mit Vertretern der GW182-Proteinfamilie (Abschnitt 2.5.1) spielen. Darüber hinaus wurde der MID-Domäne eine 7-Methyl-Guanosin-(m<sup>7</sup>G-)Cap-bindende Eigenschaft zugeschrieben, für die zwei konservierte Phenylalaninseitenketten, namentlich F470 und F505 beim humanen Ago2-Protein, essentiell sein sollen (Kiriakidou *et al.*, 2007). Die Autoren nannten diese Sequenzabschnitt „MC“. Allerdings häufen sich Daten, die den Befund in Frage stellen (Eulalio *et al.*, 2008; Kinch und Grishin, 2009; Djuranovic *et al.*, 2010; Boland *et al.*, 2010). Die Aminosäuren scheinen dagegen eine Bedeutung für die miRNA-Bindung und die Interaktion mit Vertretern der GW182-Proteinfamilie (Abschnitt 2.5.1) zu haben (Eulalio *et al.*, 2008).

#### 2.3.3.4 PIWI-Domäne

Die größte Ago-Domäne stellt die PIWI-Domäne dar. Kristallstrukturdaten deckten in ihrem Faltungsmuster eine Ähnlichkeit zu RNase H-Enzymen auf (Song *et al.*, 2004). Diese Ribonuklease-Klasse katalysiert die Hydrolyse von RNA in RNA-DNA-Hybridduplices (Champoux und Schultz, 2009). Tatsächlich wurde für die Argonaute-Proteine von *Aquifex aeolicus* und *Archeoglobus fulgidus* eine Präferenz für die Bindung kleiner DNAs nachgewiesen (Ma *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005), so dass nach Hybridisierung mit einer *target*-RNA ein klassisches RNase H-Substrat vorliegt. Argonaute-Proteine von höher entwickelten Spezies entfalten ihre Aktivität ausschließlich gegenüber reinen RNA-Duplices (Meister *et al.*, 2004 (b); Liu *et al.*, 2004; Baumberger und Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2006). Die enzymatische RNA-Hydrolyse durch Ago erfordert drei Aminosäureseitenketten, namentlich den Asparaginsäurerest-597 (D597), den Asparaginsäurerest-669 (D669) und den Histidinrest-807 (H807), wobei sich die

Positionsangaben auf die Primärsequenz von humanem Ago2-Protein beziehen (Rivas *et al.*, 2005). Die katalytische DDH-Triade ist nicht bei allen Argonaute-Proteinen konserviert, zum Beispiel nicht bei humanem Ago1 oder Vertretern der WAGOs (Abschnitt 2.3.2; Abb. 2.2). Umgekehrt ist die Existenz der Triade nicht hinreichend für eine RNA-Spaltaktivität. So katalysiert humanes Ago3-Protein, das ebenfalls über ein intaktes DDH-Motiv verfügt, die Hydrolyse einer *target*-RNA nicht (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004 (b)). Da von den humanen Ago-Proteinen vor allem die Endonukleasefunktion von Ago2 nach rekombinanter Expression in *Escherichia coli* (*E.coli*) analysiert wurde (Rivas *et al.*, 2005), ist nicht auszuschließen, dass beispielsweise posttranslationale Modifikationen die unterschiedlichen Katalyseaktivitäten der humanen Ago-Proteine bedingen. In Analogie zum RNase III-Enzym Dicer werden RNA-spaltaktive Ago-Proteine auch als *slicer* bezeichnet bzw. im Zusammenhang mit der enzymatischen *target*-RNA-Hydrolyse von *slicer*-Aktivität gesprochen (Lingel und Sattler, 2005). Weitere Studien zeigen, dass auch der Austausch anderer Aminosäureseitenketten einen Verlust der Spaltaktivität zur Folge haben kann. Das betrifft unter anderem Q633 und H634 (Liu *et al.*, 2004) sowie einzelne Arginin- und Lysinseitenketten (Wang *et al.*, 2008 (b)).

Schließlich liegt im C-terminalen Bereich der PIWI-Domäne die so genannte PIWI-Box. Hierbei handelt es sich um einen entwicklungsgeschichtlich konservierten Sequenzabschnitt von ca. 40 Aminosäuren (Cox *et al.*, 1998), dem nach *in vitro*-Experimenten mit Ago-Deletionsmutanten die Funktion der Dicer-Interaktion zugeschrieben wird (Tahbaz *et al.*, 2004). Neuere, elektronenmikroskopische Daten, die in Zusammenhang mit einer schonenden Protein-Protein-Vernetzungsmethode parallel zur Komplexseparation im Glutaraldehyd-Glycerol-Dichtegradienten gewonnen wurden, bestätigen das (Wang *et al.*, 2009 (b)).

Zusammenfassend ist zuzusagen, dass sich die verschiedenen Funktionen der Ago-Proteine wie RNA-Bindung, Protein-Protein-Interaktion und enzymatische RNA-Spaltaktivität unterschiedlichen Abschnitten der Primärsequenz zuordnen lassen, was Mutagenesestudien entgegen kommt. Man unterscheidet vier prominente Ago-Domänen:

- 1) den weitgehend heterogenen N-Terminus,
- 2) die PAZ-Domäne mit der Bindungstasche für das 3'-Ende der kleinen RNA,
- 3) die MID-Domäne mit der Bindungstasche für das 5'-Ende der kleinen RNA und
- 4) schließlich die PIWI-Domäne mit den essentiellen Aminosäureresten für die RISC-typische *slicer*-Aktivität und der PIWI-Box für die RNA-unabhängige Ago-Dicer-Interaktion.

## 2.4 Molekulare Funktionseinheiten der RNA-vermittelten Genexpressionsregulation und ihre Wirkmechanismen

Die durch kleine, nichtkodierende RNAs vermittelte Regulation der Genexpression basiert stets auf der Assoziation einer kleinen regulatorischen RNA (Abschnitt 2.1) mit einem Vertreter der Argonaute-Proteinfamilie (Abschnitt 2.3). Diese molekulare Einheit ist *in vitro* sehr beständig und behält ihre enzymatische Aktivität auch nach Behandlung mit einer 2,5 M KCl-Lösung (Martinez und Tuschl, 2004).

Die kleine RNA vermittelt die *target*-RNA-Identifikation. Die Aufgabe des Argonaute-Proteins besteht in der Rekrutierung weiterer Proteinfaktoren. Es bestimmt auf diesem Weg das weitere Schicksal der *target*-RNA (Pillai *et al.*, 2004).

### 2.4.1 RNA-induzierte Initiation transkriptionaler Expressionsrepression (engl. *RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*, kurz: RITS)

RNAi wird in der Regel als ein post-transkriptionaler Regulationsmechanismus angesehen. Tatsächlich existiert jedoch auch ein direkter Bezug zwischen der RNAi-Maschinerie und der Bildung von Heterochromatin, mit unmittelbarer, reprimierender Wirkung auf den Transkriptionsvorgang (Grewal und Jia, 2007). Man spricht von der RNA-induzierten Initiation transkriptionaler Expressionsrepression (engl.: *RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*, kurz: RITS). Unter Heterochromatin versteht man stark verdichtete und transkriptional weitgehend inaktive Chromatinbereiche.

In *S. pombe* sind RNAi-Komponenten wie Dicer und Ago für die Heterochromatin-Etablierung an bestimmten genomischen Loci essentiell (Volpe *et al.*, 2002; Reinhart und Bartel, 2002). Der RITS-Komplex von *S. pombe* setzt sich zusammen aus Ago1 mit der gebundenen kleinen RNA, dem Chromodomänenprotein Chp1 und Tas3, einem Protein mit Glycin(G)- und Tryptophan(W)-reichen (GW-reichen) Sequenzen (Verdel *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass der RITS-Komplex im Nukleus über die kleine RNA mit dem naszierenden Transkript hybridisiert (Moazed, 2009). Durch Ago1 wird das Protein Stc1 rekrutiert,

das seinerseits mit einem Multiproteinkomplex interagiert, zu dem auch die für Lysin-9 von Histon 3 (H3K9) spezifische Methyltransferase Ctr4 gehört (Bayne *et al.*, 2010). Auf diesem Weg fördert der RITS-Komplex die H3K9 Methylierung und somit die Heterochromatin-Bildung bestimmter genomischer Loci in *S. pombe*.

RNA-abhängige RNA-Polymerasen (engl.: *RNA-directed RNA polymerase*, kurz: RdRP) sind Enzyme, die die Synthese von RNA-Molekülen katalysieren und dabei RNA-Matrizen verwenden. In *Drosophila* hat man kürzlich eine RdRP-ähnliche Aktivität identifizieren können (Lipardi und Paterson, 2009), in Wirbeltieren bislang jedoch nicht (Ahlquist, 2002; Baulcombe, 2007). Vor allem Pflanzen und evolutionär weniger hoch entwickelte Eukaryoten verfügen über RdRPs (Ahlquist, 2002). Auch in *S. pombe* existiert ein RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Komplex (engl.: *RNA-directed RNA polymerase complex*, kurz: RDRC). Zwischen ihm und dem RITS-Komplex besteht eine physikalische Verbindung (Motamedi *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2005). Es ist vorstellbar, dass RDRC von dem mit einem naszierenden Transkript assoziierten RITS-Komplex rekrutiert wird, und die Synthese eines Gegenstranges katalysiert, mit der Ago1-gebundenen kleinen RNA als Primer und dem wachsenden Transkript als Matrize. Die resultierende doppelsträngige RNA könnte durch Dicer zu siRNAs prozessiert und in dieser Form in Ago1 eingebaut werden, was schließlich eine Verstärkung der transkriptionalen Repression bedingen würde (Moazed, 2009).

Im Zusammenhang mit künstlich produzierten siRNAs wurde auch in humanen Zellen eine direkte Repression der Transkription beobachtet (Morris *et al.*, 2004, Janowski *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Zudem geht eine Reduktion von humanem Ago1-Protein mit einer Abnahme der H3K9-Dimethylierung einher, die ein Kennzeichen der Transkriptionsrepression darstellt (Kim *et al.*, 2006). Jedoch sind die molekularen Zusammenhänge noch weitgehend unverstanden. Auch ist zu klären, in wie weit diesen Beobachtungen eine physiologische Rolle zukommt (Verdel *et al.*, 2009). Es wird interessant sein zu sehen, ob

und welche Rolle endo-siRNAs (Abschnitt 2.1.2) und die Regulation von Transposons durch kleine RNAs dabei spielen.

#### 2.4.2 piRNPs

Die Assoziation von PIWI-Proteinen und piRNAs bezeichnet man als piRNPs, deren zelluläre Funktion in der Repression von Transposons und der piRNA-Biogenese gesehen wird (Abschnitt 2.1.3; Aravin *et al.*, 2007 (b)).

Über ihre Wirkungsweise und die molekularen Mechanismen in menschlichen Zellen ist noch nicht viel bekannt. Neben geeigneten Modellsystemen fehlen für eine umfassende Analyse auch effiziente Antikörper gegen die verschiedenen humanen PIWI-Proteine. Eine bessere Vorstellung hat man von den Gegebenheiten im *Drosophila*- und Maus-System. In *Drosophila* konnte die Interaktion von Piwi mit dem Heterochromatinprotein HP1 nachgewiesen werden (Brower-Toland *et al.*, 2007). Das lässt spekulieren, dass der Transposon-Deaktivierung möglicherweise ein RITS-ähnlicher Mechanismus (Abschnitt 2.4.1) zugrunde liegt. Zum anderen zeigt Piwi Endonukleaseaktivität (Gunawardane *et al.*, 2007). Es wäre daher alternativ vorstellbar, dass zur Piwi-gebundenen piRNA komplementäre Transkripte über einen RISC-ähnlichen Weg (Abschnitt 2.4.4) inaktiviert werden.

*Knock-out*-Studien in Mäusen offenbarten Unterschiede zwischen den murinen PIWI-Proteinen Miwi, Miwi2 und Mili: Bei männlichen Mäusen ohne funktionales Miwi-Protein kommt es zu einem späteren Zeitpunkt zu Defekten in der Spermatogenese (Deng und Lin, 2004) als bei Miwi2- oder Mili-defizienten Tieren (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004; Carmell *et al.*, 2007). Das lässt darauf schließen, dass die Proteine in unterschiedlichen Entwicklungsstadien aktiv sind. Obwohl alle murinen PIWI-Proteine über die *slicer*-typische DDH-Triade verfügen (Abschnitt 2.3.3.4), wird derzeit davon ausgegangen, dass die Repression von Transposons nicht über eine RISC-ähnliche Transkriptdegradation (Aravin *et al.*, 2007 (b); Abschnitt 2.4.4), sondern durch Induktion von DNA- und/oder Histonmethylierung erfolgt (Carmell *et al.*, 2007).

Kürzlich wurde die entwicklungsgeschichtlich konservierte Interaktion von PIWI-Proteinen mit verschiedenen Tudor-Domänen(TDRD)-Proteinen beschrieben (Chen *et al.*, 2009; Nishida *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Vagin *et al.*, 2009; Kirino *et al.*, 2010). Die Funktion der PIWI-TDRD-Interaktion scheint in der korrekten zellulären Lokalisierung der PIWI-Proteine zu bestehen. Zudem wirken sich funktionale Defekte der TDRD-Proteine negativ auf die piRNA-Produktion und folglich auch auf die piRNP-Bildung aus, was wiederum die Gametogenese beeinträchtigt (Siomi *et al.*, 2010).

### 2.4.3 miRNPs

Der Begriff miRNP bezeichnet einen zytoplasmatischen Komplex aus einem Ago-Protein und einer miRNA sowie gegebenenfalls weiteren Proteinfaktoren, der durch post-transkriptionale Regulation einer *target*-mRNA die Genexpression beeinflusst. Dabei gilt, dass eine bestimmte *target*-RNA über Bindungsstellen für mehrere und größtenteils verschiedene miRNAs bzw. miRNPs verfügt, und dass umgekehrt zu einem bestimmten miRNP komplementäre Sequenzen in unterschiedlichen *target*-RNAs vorkommen (Lim *et al.*, 2005; Peter, 2010; Thomas *et al.*, 2010, picTar: Krek *et al.*, 2005; TargetScan: Lewis *et al.*, 2005; Grimson *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2009). Es ist davon auszugehen, dass Synergieeffekte bei der Genexpressionsregulation durch miRNPs auftreten (Bartel, 2004; Pillai *et al.*, 2005). Die Funktionalität eines miRNP-Effektorkomplexes wird durch weitere RNA-Bindungsproteine und die Sekundärstruktur einer *target*-RNA beeinflusst (Ameres *et al.*, 2007; Grimson *et al.*, 2007; Kedde *et al.*, 2007; Kertesz *et al.*, 2007; Zekri *et al.*, 2009; Fabian *et al.*, 2010).

Man unterscheidet zwei wesentliche Wirkungsweisen von miRNPs bei der Expressionsrepression: Einerseits die Inhibierung der Translation und andererseits die Destabilisierung der *target*-RNA. Schließlich wurde vereinzelt auch eine miRNP-abhängige Aktivierung von *target*-RNAs beobachtet (Fabian *et al.*, 2010).

### 2.4.3.1 Translationsinhibition

Im Fall einer Blockade der mRNA-Translation durch miRNPs lässt sich die mRNA selbst nachweisen, nicht jedoch das Protein als endgültiges Genprodukt. Je nach experimentellem System unterstützen publizierte Daten die Annahme einer Inhibierung der Translationsinitiation, der -elongation oder einen unmittelbaren Abbau der naszierenden Polypeptidkette. Das Szenario der Proteolyse scheint am wenigsten wahrscheinlich, unter anderem, weil Proteasominhibitoren keinen Einfluss auf die miRNA-vermittelte Regulation haben und alternative Proteasen bislang nicht identifiziert werden konnten (Filipowicz *et al.*, 2008).

Die Hypothese, dass miRNPs den Elongationsschritt der Translation stören, basiert vor allem auf Ergebnissen von Dichtegradientenzentrifugationsversuchen, bei denen eine stete Co-Sedimentation der miRNA-regulierten *target*-RNAs mit Polysomen beobachtet wurde (Olsen und Ambros, 1999; Petersen *et al.*, 2006; Seggerson *et al.*, 2002; Maroney *et al.*, 2006; Nottrott *et al.*, 2006). Das belegt jedoch nicht zwangsläufig, dass miRNP-reprimierte RNAs ein Bestandteil der Polyribosomen selbst sind. Zudem wurden in Dichtegradientenzentrifugationsversuchen mit *Drosophila*-Zellextrakten sogenannte „Pseudo-Polysomen“ beobachtet (Thermann und Hentze, 2007). Zwar konnte bis heute weder die molekulare Identität der Pseudo-Polysomen geklärt, noch ihre Existenz im Säugersystem nachgewiesen werden, doch möglicherweise handelt es sich bei den Polysomfraktionen in den ursprünglichen Studien zum Mechanismus der miRNP-vermittelten Expressionsrepression um mißinterpretierte Pseudo-Polysomen.

Kürzlich wurde berichtet, dass bei der Reproduktion eines der ursprünglichen Dichtegradientenzentrifugationsexperimente die Migration der *let-7*-regulierten LIN-14-RNA nicht wie zuvor in den Polysomenfraktionen (Olsen und Ambros, 1999; Seggerson *et al.*, 2002), sondern in Fraktionen geringerer Dichte zu beobachten war (Ding und Grosshans, 2009).

Bei der Blockade der Initiation spielt die 5'-*Cap*-Struktur der mRNA eine bedeutende Rolle: Während eine *target*-RNA mit physiologischem 5'-*Cap* durch miRNPs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* reprimiert wird, zeigten RNAs mit unphysiologischen, *Cap*-analogen 5'-Modifikationen oder internen Ribosom-Bindungsstellen (engl.: *internal ribosome entry site*, kurz: IRES) eine Resistenz gegenüber der Regulation durch miRNPs (Humphreys *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005; Mathonnet *et al.*, 2007; Zdanowicz *et al.*, 2009).

Ein weiteres Indiz, das für die Inhibition des Translationsinitiationsschrittes spricht, ist die Beobachtung, dass miRNP-regulierte Transkripte in einigen Dichtegradientenzentrifugationsläufen nicht in den Polyribosomfraktionen migrieren, sondern gegenüber unregulierten RNAs eine Verschiebung in die Fraktionen niedermolekularer Komplexe erfahren (Pillai *et al.*, 2005).

Es wird spekuliert, ob miRNPs letztlich die mRNA-Zirkularisierung verhindern und so die effiziente Translation der mRNA blockieren. Für die Zirkularisierung ist neben der 5'-*Cap*-Struktur auch der 3'-Poly(A)-Schwanz erforderlich (Jackson *et al.*, 2010). Doch im Vergleich zu den experimentellen Ergebnissen der *Cap*-Abhängigkeit, lassen die Daten zur funktionalen Bedeutung des Poly(A)-Schwanzes in der miRNP-vermittelten mRNA-Repression weniger eindeutige Schlüsse zu (Fabian *et al.*, 2010).

Schließlich wurde die direkte Interaktion zwischen humanem Ago2 und der 5'-*Cap*-Struktur einer mRNA berichtet, was eine Blockade der Translationsinitiation mechanistisch hätte erklären können (Kiriakidou *et al.*, 2007). Jedoch wird diese Wechselwirkung durch neuere Erkenntnisse in Frage gestellt. Die mutmaßlich an der *Cap*-Interaktion beteiligten Aminosäurereste von Ago2 sind demnach für die Wechselwirkung mit GW182, einem essentiellen Faktor im miRNA-Signalweg, erforderlich (Abschnitt 2.3.3.3 und 2.5.1; Eulalio *et al.*, 2008). GW182 interagiert auch mit dem Poly(A)-bindenden Protein PABPC1, was ebenfalls eine Störung der mRNA-Zirkularisierung bewirken und so letztlich eine Translationsinhibition bedingen könnte (Abschnitt 2.5.1; Tritschler *et al.*, 2010).

Daneben wurde der eukaryotische Initiationsfaktor eIF6 in Assoziation mit Ago2, TRBP und Dicer nachgewiesen (Chendrimada *et al.*, 2007). eIF6 blockiert die Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten zum translationsaktiven 80S Ribosom (Ceci *et al.*, 2003) und bietet damit eine alternative Erklärung für den molekularen Mechanismus der Translationsinhibition. Eine andere Studie, durchgeführt in einem zellfreien *in vitro*-System, belegt einerseits einen Überschuss von ribosomalen 40S- gegenüber 60S-Faktoren auf reprimierten Transkripten und andererseits die Unzugänglichkeit des AUG-Startkodons (Wang *et al.*, 2008 (a)). Beides steht in Einklang mit der Annahme einer Initiationsblockade durch die Interaktion der miRNP-Komponenten mit eIF6. Allerdings konnte die eIF6-Abhängigkeit der *target*-RNA-Repression für *Drosophila* und *C. elegans* bislang nicht bestätigt werden (Eulalio *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2008).

Obgleich die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht vollkommen verstanden sind, so stellt die Initiationsinhibition derzeit das wahrscheinlichere Modell der miRNP-vermittelten Translationsblockade dar.

#### **2.4.3.2 *target*-RNA-Destabilisierung**

Die Translationsinhibition wurde lange Zeit als der dominierende Mechanismus der miRNA-vermittelten Genexpressionsrepression bei Tieren angesehen. In den letzten Jahren mehrten sich allerdings Beispiele zur miRNP-induzierten Destabilisierung von *target*-RNAs (Bagga *et al.*, 2005; Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Giraldez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Studien haben gezeigt, dass die miRNP-vermittelte Expressionsrepression primär über die Deadenylierung und den anschließenden Abbau der *target*-RNAs erfolgt (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010).

Der molekulare Mechanismus der miRNP-induzierten Transkript-Destabilisierung wurde in *Danio rerio* (Zebrafisch), *C. elegans*, *Drosophila* und Säugerzellen untersucht und erwies sich als entwicklungsgeschichtlich konserviert (Fabian *et al.*, 2010). Ago rekrutiert

demzufolge einen Vertreter der GW182-Proteinfamilie (Abschnitt 2.5.1; Meister *et al.*, 2005; Landthaler *et al.*, 2008; Eulalio *et al.*, 2008). Dieser interagiert mit dem zytoplasmatischen Poly(A)-Bindungsprotein PABPC1 (Fabian *et al.*, 2009; Zekri *et al.*, 2009; Jinek *et al.*, 2010) und dem CCR4/NOT1-Deadenylierungskomplex (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Fabian *et al.*, 2009). Damit wird die Deadenylierung der *target*-RNA eingeleitet. Zudem konnten Wechselwirkungen zwischen Ago und den *Decapping*-Komplex-Enzymen Dcp1 und Dcp2 nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2005 (a); Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007 (a)). Das Entfernen der *Cap*-Struktur durch den *Decapping*-Komplex leitet schließlich den endgültigen Abbau der *target*-RNA durch die 5'-3'-Exonuklease Xrn1 ein (Coller und Parker, 2004; Orban und Izaurralde, 2005).

Eine weit geringere physiologische Rolle scheint bei Wirbeltieren die *target*-RNA-Destabilisierung durch die Ago-katalysierte, RISC-typische Spaltung einer *target*-RNA zu spielen (Abschnitt 2.4.4). Tatsächlich ist mit der HoxB8-mRNA nur ein physiologisches Beispiel für diese Form der *target*-RNA-Destabilisierung in Säugern bekannt (Yekta *et al.*, 2004). Bei der Hybridisierung von miRNA und *target*-RNA ist der Sequenzbereich der Nukleotide 10-12 der miRNA im Allgemeinen ungepaart (Bartel, 2009; Abschnitt 2.1.4 und 2.2; Abb. 2.1). Diese *bulge*-Struktur verhindert, dass enzymatisch aktive Ago-Proteine ihre inhärente  *slicer*-Aktivität gegenüber der *target*-RNA entfalten können.

Die beiden Repressionsmechanismen Translationsinhibition und Destabilisierung der *target*-RNA schließen sich gegenseitig nicht aus. Je nach Modellsystem und *target*-RNA sprechen experimentelle Daten dafür, dass der Deadenylierung eine Translationsinhibition vorangeht (Fabian *et al.*, 2009) oder nachfolgt (Beilharz *et al.*, 2009). Auch von einer Deadenylierung während der Translation wurde berichtet (Hu *et al.*, 2009). Des Weiteren wird eine reprimierte *target*-RNA nicht zwangsläufig vollständig degradiert: In Hepatokarzinomazellen wird die

CAT-1-mRNA durch miR-122 in einen translationsinaktiven Zustand versetzt und kann aus diesem infolge von Stress reaktiviert werden (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Die Resultate machen deutlich, dass statt eines allgemeingültigen Repressionsmechanismus vielmehr *target*-RNA- und zell- bzw. gewebsspezifische Eigenschaften sowie kinetische Parameter den Ablauf der miRNP-vermittelten Genexpressionsrepression diktieren (Fabian *et al.*, 2010).

Schließlich besteht eine konträre, dritte Wirkungsweise von miRNPs: die Translationsaktivierung. Die Arbeitsgruppe von J. Steitz hat beobachtet, dass die Translation der TNF $\alpha$ -mRNA miRNP-bedingt in wachstumsarretierten humanen Zellen gesteigert wird, während in proliferierenden Zellen eine Repression erfolgt (Vasudevan und Steitz, 2007; Vasudevan *et al.*, 2007). In einer anderen Studie wurde berichtet, dass bei Assoziation eines miRNPs mit der 5'-UTR einer *target*-mRNA die Translation aktiviert, im Fall einer 3'-UTR-Assoziation jedoch reprimiert wird (Orom *et al.*, 2008).

Weitere Untersuchungen werden zeigen, welche Rolle die Translationsaktivierung in der miRNP-vermittelten Transkriptregulation spielt und welchen Regeln sie gehorcht.

#### **2.4.4 RISC in menschlichen Zellen**

RISC stellt die molekulare Funktionseinheit der RNA-Interferenz dar und kann als Spezialfall eines miRNP angesehen werden. Den Komplex charakterisiert, dass er sich aus einem endonukleolytisch aktivem Argonaute-Protein und einer kleinen RNA, die perfekte Basenkomplementarität zur Bindungssequenz der *target*-RNA aufweist, zusammensetzt und infolgedessen die Spaltung (engl.: *cleavage*) der *target*-RNA katalysiert.

Im humanen System werden diese RISC-Voraussetzungen bei einer Beladung von Ago2 (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004 (b); Azuma-Mukai *et al.*, 2008; Rüdell *et al.*, 2008) mit dem Leitstrang einer siRNA (Abschnitt 2.1.1) erfüllt. Infolge der Bindung einer *target*-RNA

katalysiert Ago2 die Spaltung des Zuckerphosphatrückgrats gegenüber den Nukleotiden 10 und 11 des Leitstranges (Elbashir *et al.*, 2001 (b)), was zu einem 3'-Fragment mit einer 5'-Phosphorylgruppe und einem 5'-Fragment mit einer 3'-Hydroxylgruppe führt (Martinez und Tuschl, 2004; Schwarz *et al.*, 2004).

Die exakte molekulare Zusammensetzung von RISC *in vivo* ist über Ago2 und die kleine RNA hinaus unbekannt. Verschiedene Modellsysteme und Reinigungsstrategien brachten RNPs mit RISC-Eigenschaften von unterschiedlichen Molekulargewichten und mit diversen assoziierten Proteinen hervor (Nykänen *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002; Mourelatos *et al.*, 2002; Rand *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2005; Höck *et al.*, 2007; Robb und Rana, 2007).

Der Arbeitsgruppe von Joshua-Tor ist es gelungen, RISC *in vitro* mit heterolog exprimiertem, humanem Ago2-Protein zu rekonstituieren. Sie konnte zeigen, dass bereits ein Komplex aus Ago2 und einer kleinen, einzelsträngigen RNA einen funktionsfähigen – sogenannten Minimal-RISC – bilden und die Spaltung einer *target*-RNA *in vitro* katalysieren kann (Rivas *et al.*, 2005).

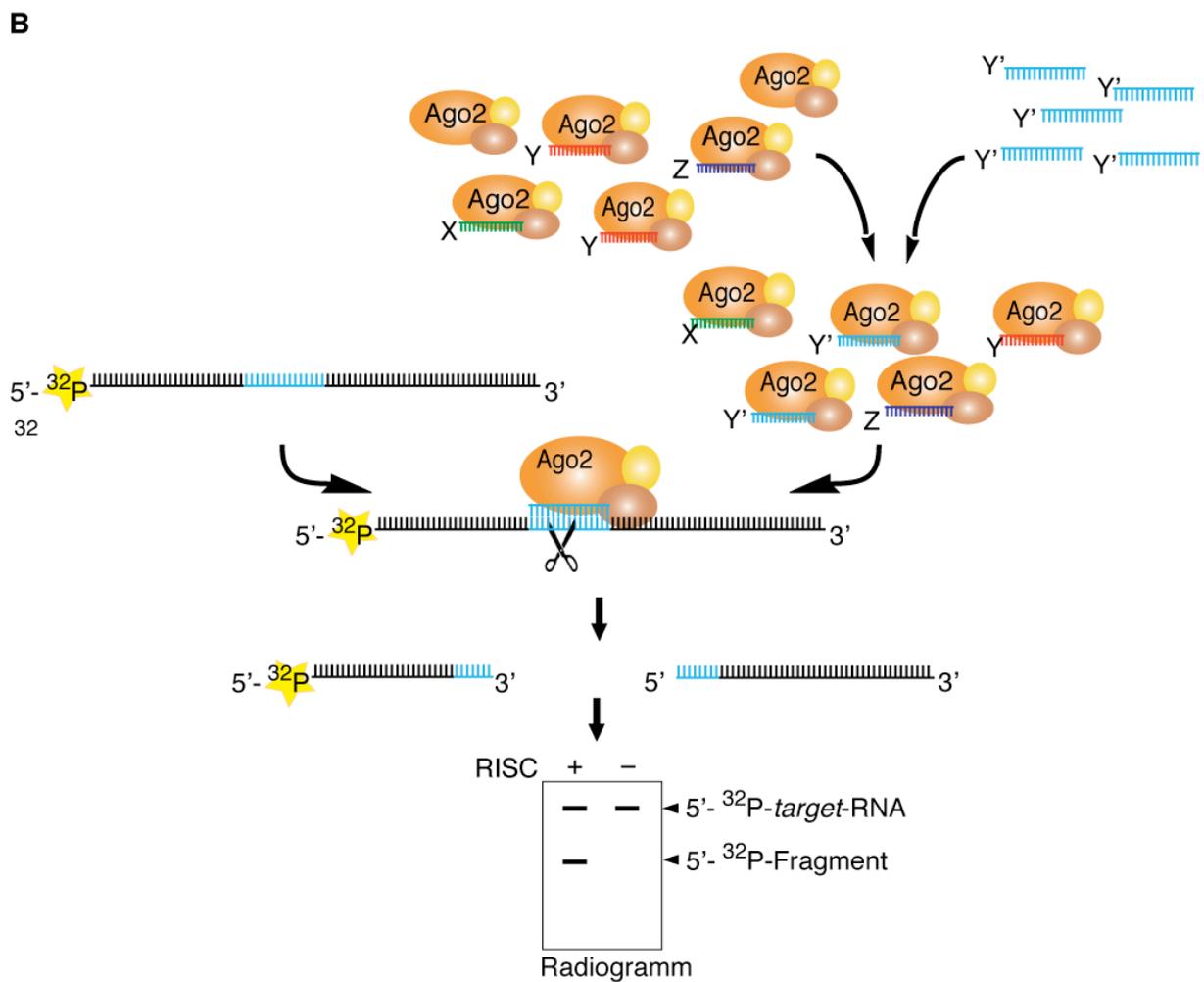
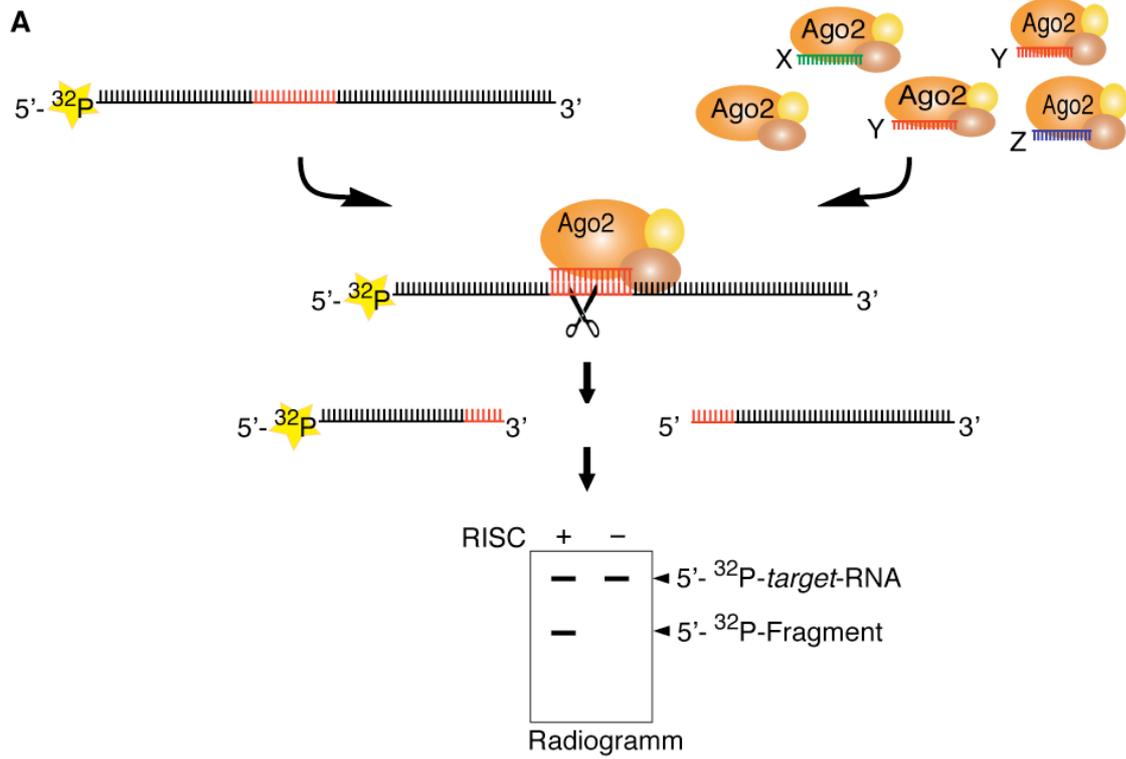
Tatsächlich ist es möglich, RISC-Aktivität in geeigneten Systemen *in vitro* zu untersuchen. Die Bereitstellung von RISC kann durch Zellextrakte (Elbashir *et al.*, 2001 (b); Meister *et al.*, 2004 (a)) oder in isolierter Form erfolgen, beispielsweise als Immunopräzipitat (Meister *et al.*, 2004 (b); Rüdell *et al.*, 2008) oder nach heterologer Expression von endonukleolytisch aktivem Ago-Protein (Rivas *et al.*, 2005). Sofern das verwendete Proteinexpressionssystem über einen endogenen miRNA-Signalweg verfügt, ist zumindest ein Teil der daraus isolierten Ago-Proteine mit kleinen RNAs beladen. Andernfalls kann RISC durch Inkubation des enzymatisch aktiven Ago-Proteins zusammen mit der gewünschten, einzelsträngigen kleinen RNA *in vitro* rekonstituiert werden (Rivas *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Rüdell *et al.*, 2008) (Abb. 2.3 B).

Als RISC-Substrate werden für den *in vitro* RISC-Assay *target*-RNAs eingesetzt, die über eine perfekt komplementäre Bindungsstelle für eine bestimmte kleine RNA, beispielsweise für miR-Y, verfügen (Abb. 2.3 A). Sie werden *in vitro* synthetisiert und können anschließend mit einem radioaktiv-markierten 5'-Cap versehen werden (Elbashir *et al.*, 2001 (b); Meister *et al.*, 2004 (b)). Infolge der Inkubation mit RISC kommt es zur enzymatischen *target*-RNA-Hydrolyse durch alle Ago2-Moleküle, die mit der passenden kleinen RNA beladen sind, im Beispiel mit miR-Y. Nach der Größenauftrennung im denaturierenden Harnstoffgel und Exposition kann das 5'-Fragment aufgrund der radioaktiven Cap-Markierung neben der ungespaltenen *target*-RNA detektiert werden (Abb. 2.3 A).

### Abbildung 2.3

#### Schematische Darstellung eines *in vitro* RISC-Assays

(A) Die *in vitro* synthetisierte und am 5'-Cap radioaktiv-markierte *target*-RNA verfügt über eine perfekt komplementäre Bindungsstelle für eine bestimmte miRNA, im gegebenen Beispiel für miR-Y. Während der Inkubation der *target*-RNA mit RISC wird sie durch enzymatisch aktive und mit miR-Y-beladene Ago-Proteine gespalten, in menschlichen Zellen durch Ago2. Ago-Proteine mit anderen miRNAs wie miR-X oder miR-Z sind für das Versuchsergebnis ohne Bedeutung. Zuletzt wird die RNA aus dem Reaktionsansatz isoliert und im denaturierenden Harnstoffgel der Größe nach aufgetrennt. Anhand der radioaktiven Markierung können die intakte *target*-RNA und das 5'-Fragment als Produkt der Endonukleolyse detektiert werden. (B) stellt eine Variante von (A) dar und beschreibt die Rekonstitution von RISC *in vitro* mit einer beliebigen kleinen RNA. Letztere, im Beispiel Y', wird als Einzelstrang mit isoliertem RISC inkubiert, bevor die Zugabe der dazugehörigen <sup>32</sup>P-*target*-RNA erfolgt. Die erfolgreiche Y'-RISC-Assemblierung zeigt sich in der enzymatischen Hydrolyse der *target*-RNA. Die Analyse erfolgt wie unter (A) beschrieben. Der Stern symbolisiert die radioaktive <sup>32</sup>P-Markierung und ✂ die enzymatische RNA-Spaltung, kleine RNAs und ihre komplementären Bindungsstellen sind farbig hervorgehoben. In der Literatur überwiegen *in vitro* RISC-Assays mit partiell gereinigtem RISC, der neben Ago2 weitere Proteinfaktoren enthält. Das wurde in der Abbildung berücksichtigt.



## 2.5 Ago-Protein-Interaktionen

miRNPs entfalten ihre Funktion *in vivo* durch die Interaktion mit weiteren Proteinen. Dabei assemblieren sich distinkte RNA-Protein-Komplexe unterschiedlicher molekularer Zusammensetzung und enzymatischer Aktivität. Die Arbeitsgruppe von Meister separierte drei Ago-Komplexe I, II und III via Dichtegradientenzentrifugation aus Totallysat humaner Zellen (Höck *et al.*, 2007). Komplex I stellt mit rund 300 kD den kleinsten, Komplex III mit mehr als 900 kD den größten Partikel dar. Komplex II und III ko-sedimentieren mit ribosomalen Proteinen und sind in RNase-behandeltem Zelllysat nicht nachweisbar. Folglich handelt es sich bei Ago-Komplex II und III um RNPs. Nach Immunopräzipitation von Ago2 aus den verschiedenen Komplexen konnte für Komplex I RISC-Aktivität beobachtet werden, während Dicer-Aktivität in den Ago2-Immunopräzipitaten von Komplex I und III und in geringerem Umfang auch in Komplex II auftrat (Höck *et al.*, 2007). Demnach können die in einem Komplex co-existierenden Proteine Ago2 und Dicer gemeinsam isoliert werden.

Die detaillierte Untersuchung der Proteinzusammensetzung der drei Ago-Komplexe zeigte unter anderem, dass einige der identifizierten Proteinfaktoren nur in einem bestimmten Komplex vertreten sind. TRBP (Abschnitt 2.2; Abb. 2.1), ein Co-Faktor von Dicer, konnte massenspektrometrisch nur in Komplex I, die mutmaßliche RNA-Helikase MOV10 (Meister *et al.*, 2005) dagegen nur in Komplex III nachgewiesen werden (Höck *et al.*, 2007). Andere Proteine waren in allen drei Ago-Komplexen vertreten, unter anderem Importin 8 (Imp8; Weinmann *et al.*, 2009). Dieses Protein interagiert mit humanem Ago1-4 unabhängig von RNA. *Knock-down*-Studien ließen erkennen, dass Imp8 zum einen für die nukleäre Lokalisation von Ago2 erforderlich ist und zum anderen die zytoplasmatische Expressionsrepression durch miRNAs positiv beeinflusst (Weinmann *et al.*, 2009).

### 2.5.1 Die GW182-Proteinfamilie

Von zentraler Bedeutung für die posttranskriptionale Genexpressionsrepression sind die Ago-interagierenden Proteine der GW182-Proteinfamilie. Sie sind als Bestandteil von

miRNPs in verschiedenen Modellorganismen identifiziert worden und funktionale Studien bestätigen, dass GW182-Proteine auch mechanistisch an der Expressionsregulation durch kleine RNAs beteiligt sind (Ding *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005 (b); Meister *et al.*, 2005; Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006 (a,b); Eulalio *et al.*, 2008; Landthaler *et al.*, 2008; Chekulaeva *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009 (a,b); Lazzaretti *et al.*, 2009; Miyoshi *et al.*, 2009; Takimoto *et al.*, 2009; Zipprich *et al.*, 2009).

In *Drosophila* existiert nur ein Vertreter dieser Proteinfamilie, nämlich GW182, bei Säugern liegen dagegen drei Homologe vor: TNRC6A (Abkürzung für engl.: *trinucleotide repeat containing protein 6A*) - das humane GW182, TNRC6B und TNRC6C. Die Proteine haben ein Molekulargewicht von rund 180 kD und verfügen am N-Terminus über 12 (*Drosophila*) bzw. 21-33 (*Homo sapiens*) Glycin-Tryptophan-(GW/WG-)Sequenzwiederholungen (Eulalio *et al.*, 2009 (c)). Über diese erfolgt die RNA-unabhängige Interaktion mit Ago-Proteinen (Till *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2009 (b)). Im Fall des *Drosophila* Proteins wurde kürzlich gezeigt, dass nur die ersten fünf bis acht N-terminalen GW/WG-Sequenzen zur Ago-Interaktion beitragen, während die darauf folgenden bei der *target*-RNA-Repression eine Rolle spielen (Chekulaeva *et al.*, 2010). Auf die humanen Homologen trifft das nicht zu (Lazzaretti *et al.*, 2009; Zipprich *et al.*, 2009). GW/WG-Sequenzen sind auch bei der Wechselwirkung von Ago1 und Tas3 im RITS-Komplex von *S. pombe* essentiell (Till *et al.*, 2007; Partridge *et al.*, 2007; Abschnitt 2.4.1). Das bezeugt die entwicklungsgeschichtliche Konservierung dieses Ago-Interaktionsmotivs (Till *et al.*, 2007; El-Shami *et al.*, 2007), das im Zusammenhang mit Tas3 auch als *Ago hook* (engl. für „Ago-Haken“) bezeichnet wird (Till *et al.*, 2007). Dennoch handelt es sich bei Tas3 um kein GW182-Protein, sondern vielmehr um ein funktionales Analogon hinsichtlich der GW/WG-Sequenzen (Eulalio *et al.*, 2009 (c)).

Ein GW182-Protein kann mit mehreren Ago-Komplexen zugleich assoziiert vorliegen (Takimoto *et al.*, 2009; Chekulaeva *et al.*, 2010), was die Synergie-Effekte der miRNA-vermittelten Transkript-Repression eventuell erklären könnte (Abschnitt 2.4.3; Grimson *et al.*, 2007).

Das Interaktionsmotiv auf der Seite von Ago ist weniger exakt definiert. Die Analyse zahlreicher Ago-Punktmutanten offenbarte, dass die Interaktion mit dem *Ago hook*-Peptid eine intakte 5'-Bindungstasche und im speziellen Y529 erfordert (Abschnitt 2.3.3.3). Erstaunlicherweise waren jedoch weder bei der Interaktion von Ago mit dem *Ago hook*-Peptid in Gegenwart zunehmender RNA-Mengen, noch bei der Ago-RNA-Interaktion in Abhängigkeit zunehmender *Ago hook*-Peptidmengen Konkurrenzeffekte zu beobachten, wie es aufgrund der vermuteten identischen Bindungsstellen zu erwarten gewesen wäre (Till *et al.*, 2007). Die von Eulalio und Kollegen (2009 (b)) generierten Ago-Mutanten beeinflussten größtenteils miRNA-Bindung und GW182-Interaktion zugleich. Ausnahmen bilden Mutationen in der PAZ-Domäne (Abschnitt 2.3.3.2), die die miRNA-Bindung verhinderten, nicht aber die Ago-GW182-Interaktion. Der Austausch eines Phenylalaninrestes störte dagegen die GW182-Interaktion, nicht aber die miRNA-Bindung. Doppelmutanten mit dem identifizierten Phenylalaninrest führten jedoch wieder zu weniger eindeutigen Ergebnissen (Eulalio *et al.*, 2009 (b)). Vermutlich überschneiden sich die Sequenzbereiche der GW182-Interaktion mit denen der miRNA-Bindung. Da sich beide Ago-Funktionen aber unabhängig voneinander untersuchen lassen, stellen sie keine grundsätzlich miteinander gekoppelten Eigenschaften dar (Eulalio *et al.*, 2009 (b)).

Was hinsichtlich der GW182-Interaktion sicher scheint, ist, dass erstens Sequenzabschnitte der MID und PIWI-Domäne erforderlich sind (Till *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2009 (b); Lian *et al.*, 2009), und dass zweitens Ago jeweils nur mit einem GW182-Protein interagiert (Takimoto *et al.*, 2009). Offenkundig ist außerdem, dass ausschließlich solche Argonaute-Proteine mit GW182-Proteinen interagieren, die in der miRNA-vermittelten, posttranskriptionalen Genexpressionsregulation involviert sind (Eulalio *et al.*, 2009 (c)).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass GW182-Proteine die Destabilisierung einer mRNA unabhängig von Ago hervorrufen können, wenn sie experimentell in die räumliche Nähe dieser RNA gebracht werden. Für diese Funktion sind C-terminalen Sequenzbereiche

erforderlich, die unter „*silencing domain*“ (engl.) zusammengefasst werden und für die Interaktion mit weiteren Proteinfaktoren benötigt werden (Behm-Ansmant *et al.*, 2006 (a); Li *et al.*, 2008; Baillat und Shiekhattar, 2009; Chekulaeva *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009 (c); Lazzaletti *et al.*, 2009; Zipprich *et al.*, 2009). Neben Ago besteht auch eine direkte Wechselwirkung von GW182-Proteinen und dem Poly(A)-bindenden Protein PABPC1 (Beilharz *et al.*, 2009; Fabian *et al.*, 2009; Zekri *et al.*, 2009; Jinek *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass diese Protein-Protein-Interaktion mit der Zirkularisierung der zu translatierenden mRNA interferiert und auf diese Weise eine Translationsinhibition bewirkt (Tritschler *et al.*, 2010). Aber auch mRNAs ohne Poly(A)-Schwanz - und somit in Abwesenheit von PABPC1 - werden in miRNA- und GW182-abhängiger Weise reguliert, so dass alternative Mechanismen der Translationsinhibition existieren müssen (Abschnitt 2.4.3.1; Eulalio *et al.*, 2009 (c); Chekulaeva *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009 (d); Pillai *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006 PNAS; Beilharz *et al.*, 2009).

Der Vergleich der humanen TNRC6-Proteine mit dem *Drosophila* Protein GW182 lässt vermuten, dass die funktionale Bedeutung einzelner Domänen entwicklungsgeschichtlich nicht konserviert ist. Möglicherweise resultiert das aus der Tatsache, dass in *Drosophila* nur ein Vertreter dieser Proteinfamilie existiert und beim Menschen drei (Eulalio *et al.*, 2009 (c)).

Ein weiteres Charakteristikum der GW182-Proteine ist die Lokalisierung in granulären, zytoplasmatischen Strukturen, die auch als *GW-bodies* (engl. für „Körperchen“) bezeichnet werden (Abschnitt 2.6.2; Eystathioy *et al.*, 2002). Im Fall der humanen TNRC6-Proteine ist für diese Lokalisierung die Interaktion mit Ago-Proteinen zwar erforderlich, jedoch nicht ausreichend (Eulalio *et al.*, 2009 (c); Lazzaletti *et al.*, 2009).

## 2.6 Lokalisierung von Argonaute-Proteinen in der Zelle

Argonaute-Proteine zeigen ein spezifisches Verteilungsmuster in der Zelle. Studien in humanen Zellen mit EGFP (engl.: *enhanced green fluorescent protein*)-Ago2 ergaben, dass rund 15-20% der Ago2-Moleküle im Kern lokalisiert sind, während die übrigen einen zytoplasmatischen Pool bilden (Ohrt *et al.*, 2008). Von diesem verteilt sich die Mehrheit gleichmäßig im Zytoplasma, nur 1,3% akkumulieren in *processing bodies* (engl. für Prozessierungskörperchen; *P-bodies* oder kurz: PBs; Leung *et al.*, 2006; Abschnitt 2.6.2). In welchem Zusammenhang die zelluläre Lokalisierung von Argonaute-Proteinen mit ihrer Funktion steht, ist bislang kaum verstanden. Nachfolgend sind die bisherigen Erkenntnisse zur Kern- und PB-Lokalisierung zusammengefasst.

### 2.6.1 Kernlokalisierung von Ago-Proteinen

Nicht nur für Organismen wie *S. pombe*, *Drosophila* und Pflanzen ist eine potentielle Rolle von Ago im Kern beschrieben (Matzke und Birchler, 2005). Auch bei Säugerzellen sind im Experiment Ago-abhängige RNAi-Effekte im Nukleus nachgewiesen worden (Janowski *et al.*, 2005 & 2006; Kim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Robb *et al.*, 2005; Abschnitt 2.4.1). Gleichfalls lässt sich Ago bei Zellextraktpräparationen sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Fraktion detektieren (Meister *et al.*, 2004 (b); Robb *et al.*, 2005). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass Ago aufgrund einer Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum (Cikaluk *et al.*, 1999; Tahbaz *et al.*, 2001) bzw. der äußeren Kernmembran Bestandteil des Zellkernextraktes ist. Mit der erfolgreichen Generierung eines Antikörpers gegen das humane Ago2-Protein konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit die Kernlokalisierung für das endogene Ago2-Protein in Immunfluoreszenz-Mikroskopiestudien bestätigt werden (Rüdel *et al.*, 2008). Zudem wurde kürzlich mit Imp8 ein mögliches, funktionales Bindeglied zwischen der zytoplasmatischen miRNP/RISC-Assemblierung und einer mutmaßlichen Funktion von Ago im Kern identifiziert (Weinmann *et al.*, 2009; Abschnitt 2.5).

## 2.6.2 **Processing Bodies:**

### **Zytoplasmatische, granuläre Strukturen in somatischen Zellen**

*Processing bodies* (engl. für Prozessierungskörperchen; *P-bodies* oder kurz: PBs) in Säugerzellen werden auch als *GW-bodies* (GWBs; Eystathioy *et al.*, 2002) bezeichnet, da sie einerseits wie PBs in *S. cerevisiae* reich an RNA-Abbauenzymen sind, andererseits aber GW182-Proteine (Abschnitt 2.5.1.) enthalten, für die kein Homologes in der Bäckerhefe existiert. Tatsächlich ist noch unklar, in welchem entwicklungsgeschichtlichen und/oder funktionalen Zusammenhang diese einander ähnelnden Strukturen stehen (Eulalio *et al.*, 2007 (b)). Im Folgenden wird der Begriff „PB“ synonym zu „GWB“ für die Strukturen in Säugetierzellen verwendet.

PBs sind 100-300 nm große, in Anzahl und Größe dynamische (Eystathioy *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004) RNA-Protein-Aggregate im Zytoplasma von Eukaryoten, deren Assemblierung vom Zellzyklus bestimmt und durch eine Inaktivierung der Translation gefördert wird (Yang *et al.*, 2004; Eulalio *et al.*, 2007 (b)). Ihre Feinstruktur wird als dicht und feinfaserig beschrieben (Souquere *et al.*, 2009). Die Detektion erfolgt bis heute ausschließlich über mikroskopische Methoden. Allerdings wird vermutet, ob es sich bei den in Zellextrakten von *Drosophila*-Embryonen beobachteten und als „Pseudo-Polysomen“ bezeichneten mRNPs möglicherweise um PB-ähnliche Partikel handeln könnte (Thermann und Hentze, 2007).

PBs enthalten keine Komponenten des Translationsapparates, weder Ribosomen noch Initiationsfaktoren, mit Ausnahme von eIF4E (Andrei *et al.*, 2005; Kedersha *et al.*, 2005). Neben Ago-Proteinen sind zahlreiche, mit diesen direkt oder indirekt interagierende Proteine in PBs präsent, zum Beispiel GW182 bzw. TNRC6-Proteine, der *Decapping*-Komplex Dcp1/Dcp2 und der Deadenylierungskomplex CAF1/CCR4/NOT. Darüber hinaus sind auch die 5'-3'-Exonuklease Xrn1 und die Proteine LSM1 bis LSM7, die gemeinsam im RNA-Abbau involviert sind, sowie miRNAs und translationsinaktive mRNAs in PBs nachgewiesen worden (van Dijk *et al.*, 2002; Ingelfinger *et al.*, 2002; Eystathioy *et al.*, 2003; Cougot *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005 (a); Meister *et al.*, 2005; Sen und Blau, 2005; Pillai *et al.*, 2005;

Behm-Ansmant *et al.*, 2006 (a); Bhattacharyya *et al.*, 2006; Chu und Rana, 2006; Pauley *et al.*, 2006).

Manipulationen des miRNA-Signalweges wirken sich auf PBs aus. Die Depletion der miRNA-Prozessierungsenzyme Droscha und Dicer (Abschnitt 2.2) durch siRNAs (Pauley *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007 (c)) hat ebenso wie die Depletion von Ago1 und Ago2 oder GW182 bzw. TNRC6A (Yang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005 (b); Eulalio *et al.*, 2007 (c)) eine Abnahme mikroskopisch erkennbarer PBs zur Folge. Eine Ago2-Mutante mit defektem miRNA-Bindungsverhalten lokalisiert nicht in PBs (Liu *et al.*, 2005 (a)). Auch die Stabilisierung von Polysomen durch Cycloheximid verhindert, dass die betroffenen mRNAs zu PBs rekrutiert werden (Cougot *et al.*, 2004; Brengues *et al.*, 2005). All diese Befunde belegen einen Zusammenhang zwischen PBs und dem miRNA-Signalweg. Nichtsdestotrotz liegen nur 1,3% der zytoplasmatischen Ago2-Moleküle in PBs vor (Leung *et al.*, 2006). Zudem ist die miRNA- und siRNA-induzierte *target*-RNA-Repression auch in Abwesenheit sichtbarer PBs zu beobachten. PBs scheinen daher eher eine Folge als eine Voraussetzung für die Funktionalität von si/miRNPs zu sein (Liu *et al.*, 2005 (b); Rehwinkel *et al.*, 2005; Chu und Rana, 2006; Eulalio *et al.*, 2007 (c)).

Die Beobachtung, dass die durch miR-122 translationsinhibierte CAT-1-mRNA in PBs nachweisbar ist und von dort nach Stressauslösung wieder zum translationsaktiven mRNA-Pool rekrutiert wird, lässt vermuten, dass es sich bei PBs um zelluläre Lagerstätten für translationsinaktive mRNAs handeln könnte (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Allerdings ist unverständlich, warum es dabei trotz der räumlichen Nähe zu zahlreichen RNA-Abbauenzymen nicht zur vollständigen Degradation der Transkripte kommt. PBs gelten als Ort des aktiven RNA-Abbaus (Eulalio *et al.*, 2007 (b)). Eine mögliche Erklärung lieferte kürzlich eine Studie, in der gezeigt wurde, dass nicht jede granuläre Zellstruktur, in der GW182-Proteine vorkommen, gleichzeitig auch PB-Komponenten enthält. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei PBs und GWBs eventuell um distinkte zytoplasmatische Strukturen handelt, deren Unterscheidung bislang vernachlässigt wurde (Gibbings *et al.*, 2009).

## 2.7 Regulation zellulärer Vorgänge durch posttranslationale Modifikation von Proteinen

Die bisherigen Ausführungen machen deutlich, dass die miRNA-vermittelte Expressionsregulation ein räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Faktoren erfordert. Um das zu gewährleisten sind Regulationsmechanismen unerlässlich. Eine Möglichkeit der Steuerung stellt die posttranslationale Modifikation von Proteinen dar. Das enzymatische Anfügen von Zuckern, Fetten, kleinen Proteinen wie Ubiquitin oder chemischen Gruppen wie Methyl-, Ethyl-, Hydroxyl- und vor allem Phosphatresten kann die physikalischen, chemischen und/oder biologischen Eigenschaften eines Proteins verändern und so seine Stabilität, Protein-Protein-Interaktionen, die Lokalisierung und/oder enzymatische Aktivität beeinflussen (Deribe *et al.*, 2010).

### 2.7.1 Posttranslationale Modifikation der Proteine des miRNA-Signalweges

TNRC6A wird *in vivo* phosphoryliert (Eystathioy *et al.*, 2002; Abschnitt 2.5.1). Die funktionellen Konsequenzen dessen sind jedoch noch unerforscht. Möglicherweise liefert die Phosphorylierung eine Erklärung dafür, dass die expressionsreprimierenden Effekte des TNRC6A-Proteins von einem Sequenzabschnitt ausgehen, der nur wenig konserviert und anhand der Aminosäuresequenz als unstrukturiert einzuordnen ist. Allerdings beinhaltet er relativ viele Serinreste (Eulalio *et al.*, 2009 (c)). Die Seitenketten von Serinen sind häufig von Phosphorylierungsereignissen betroffen (Paradela und Albar, 2008).

Vier Serinreste von TRBP, dem Cofaktor des zytoplasmatischen RNase III-Enzyms Dicer, werden ebenfalls phosphoryliert (Paroo *et al.*, 2009). Versuche mit Aminosäureaustauschmutanten, die diese Modifikation nachahmen (Ser→Asp) bzw. verhindern (Ser→Ala), sprechen dafür, dass die Phosphorylierung eine Zunahme der zellulären TRBP-Konzentration bedingt, vermutlich aufgrund einer gesteigerten Stabilität des Dicer-TRBP-Prozessierungskomplexes. Auch eine Zunahme von miRNAs mit positivem Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellproliferation wurde in Folge der Serinphosphorylierung beobachtet (Paroo

*et al.*, 2009). Mit der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Erk lässt sich die posttranslationale Modifikation von TRBP *in vitro* rekonstituieren. Das Ergebnis konnte mittels chemischer Manipulation des MKK1/Erk-Signalweges *in vivo* bestätigt werden. Diese Studie von Paroo *et al.* (2009) demonstriert somit erstmals eine molekulare Verknüpfung zwischen dem miRNA-Signalweg und dem extrazellulären Raum. Sie ordnet die miRNA-vermittelte Expressionsregulation damit in ein umfassenderes Regel- und Signalnetz der Zelle ein.

Erst kürzlich wurde von der Phosphorylierung einer Komponente des nukleären miRNA-Prozessierungskomplexes berichtet. Demnach ist die Phosphorylierung von Serin-300 und/oder Serin-302 des humanen Drosha-Proteins für dessen Kernlokalisierung erforderlich (Tang *et al.*, 2010).

### **2.7.2 Posttranslationale Modifikationen von Argonaute-Proteinen**

Auch von Argonaute-Proteinen sind in den letzten Jahren posttranslationale Modifizierungen bekannt geworden. Konservierte Argininreste im N-terminalen Bereich von PIWI-Proteinen werden durch PRMT5 (engl.: *protein arginine methyltransferase*) in symmetrischer Weise methyliert (Chen *et al.*, 2009; Kirino *et al.*, 2009; Nishida *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Vagin *et al.*, 2009). Die Methylierung ermöglicht die Interaktion von PIWI-Proteinen mit Vertretern der TDRD-Proteinfamilie (Abschnitt 2.4.2; Reuter *et al.*, 2009; Vagin *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2009 (a); Kirino *et al.*, 2010). Wird diese Wechselwirkung blockiert, kommt es zu Störungen im piRNA-Stoffwechsel, wobei die zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge noch weitgehend unverstanden sind. Eine mögliche Funktion der TDRD-Proteine wird in der subzellulären Lokalisierung der PIWI-Proteine gesehen (Siomi *et al.*, 2010).

Für das humane Ago2-Protein sind verschiedene Modifizierungen nachgewiesen worden. Eine davon ist die Hydroxylierung des Prolinrestes an Position 700 der Primärsequenz (Qi *et al.*, 2008). Die Identifikation erfolgte massenspektrometrisch. Die funktionale Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation wird in der Stabilisierung von Ago2 gesehen, da die

zelluläre Konzentration von Ago2 und infolgedessen auch die RISC-Aktivität (Abschnitt 2.4.4) abnimmt, wenn die Modifizierung durch eine P700A-Mutation oder siRNA-basierte Depletion der Typ I Kollagen Prolyl-4-Hydroxylase (C-P4H(I)) verhindert wird (Qi *et al.*, 2008). Grundsätzlich ist die Prolin-Hydroxylierung für die RISC-Aktivität von Ago2 jedoch nicht erforderlich (Abschnitt 2.4.4; Rivas *et al.*, 2005). In Folge der C-P4H(I)-Depletion wurde auch eine reduzierte PB-Lokalisierung von Ago2 beobachtet (Qi *et al.*, 2008). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine Begleiterscheinung der verringerten Ago2-Konzentration handelt (Qi *et al.*, 2008).

Einen destabilisierende Effekt übt demgegenüber die Polyubiquitinierung von Ago2 aus, durch die das Protein für den Abbau durch das Proteasom gekennzeichnet wird (Rybak *et al.*, 2009). Die Autoren dieser Studie entdeckten, dass humanes Ago2 mit murinem Lin-41-Protein interagiert. Dieses ist auch als Trim71 bekannt und zeigt ebenso wie andere TRIM-Domänen-Proteine E3-Ligase-Aktivität (Rybak *et al.*, 2009). E3-Ligasen gehören zum Ubiquitinierungssystem und katalysieren den finalen Transfer von Ubiquitin auf das Empfängerprotein. Tatsächlich führt die chemisch induzierte Inhibierung des Proteasoms ebenso wie die Depletion von Trim71 durch siRNAs zu einer erhöhten Ago2-Konzentration in der Zelle, während bei Überexpression von Trim71 erwartungsgemäß die Ago2-Polyubiquitinierung und -Abbauraten zunimmt (Rybak *et al.*, 2009).

Mit dem ersten Hinweis auf eine Phosphorylierung von humanem Ago2 gab eine Studie, in der eine Abhängigkeit des Ago2-Expressionsniveaus vom MAPK-Kaskade-Signalweg beobachtet wurde (Adams *et al.*, 2009; Epub Sept. 2008). Eine Phosphorylierung des Proteins wurde dabei jedoch nicht nachgewiesen (Adams *et al.*, 2009). MAPK-Signaltransduktionskaskaden stellen ein zentrales Element bei der Über- und Umsetzung extrazellulärer Reize in intrazelluläre dar (Deribe *et al.*, 2010). Die Bestätigung der vermuteten Phosphorylierung von Ago2 kam durch die Arbeit von Zeng und Kollegen (2008). Sie konnten zeigen, dass erstens Serin-387 *in vivo* phosphoryliert wird und zweitens, dass diese Modifikation nach Stresseinwirkung über den p38-MAPK-Signaltransduktionsweg verstärkt wird. Die

Ergebnisse mikroskopischer Analysen mit Aminosäureaustauschmutanten von Ago2 lassen vermuten, dass sich die Serin-387-Phosphorylierung positiv auf die PB-Lokalisierung von Ago2 auswirkt, auch in Abwesenheit von Zellstress. Experimente zu Auswirkungen der Modifikation auf den Ago2-Expressionsspiegel finden sich keine (Zeng *et al.*, 2008).

### 3. Ziel der Arbeit

Ago-Proteine nehmen in der posttranskriptionalen, durch kleine RNAs vermittelten Genexpressionsrepression eine zentrale Rolle ein. Eine Regulation von Ago, dem Bindeglied zwischen den regulatorischen RNAs und den Effektorproteinen, die das weitere Schicksal der *target*-RNA bestimmen, scheint daher notwendig.

Bislang ist noch vieles unverstanden. So ist nicht geklärt, ob eine Funktionsteilung zwischen den humanen Ago-Proteinen besteht, und falls ja, welche. Sind die vier Proteine in ihrer Rolle im miRNA-Signalweg austauschbar? Warum ist Ago2 endonukleolytisch aktiv, aber nicht Ago3, obgleich beide über die katalytische DDH-Triade verfügen? Wenn Ago durch die Beladung mit einer kleinen RNA „aktiviert“ wird, erfolgt auch eine Deaktivierung? Wie? Ago scheint nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Kern funktionale Bedeutung zu haben. Wie wird die Lokalisierung des Proteins gesteuert? Von der Bindung der kleinen RNA bis zur *target*-RNA-Regulation ist Ago Bestandteil distinkter RNA-Protein-Komplexe. Welche Signale steuern die räumlich und zeitlich korrekte (Re-/De-)Assemblierung dieser RNPs?

Ziel dieser Arbeit war es, die humanen Ago-Proteine auf posttranslationale Modifikationen hin zu untersuchen und deren Auswirkungen auf Ago und den miRNA-Signalweg zu studieren. Nach massenspektrometrischer Identifizierung der modifizierten Aminosäureseitenketten waren geeignete Punktmutanten zu generieren. Mittels biochemischer und zellbiologischer Methoden sollten Eigenschaften der Mutanten, wie das Interaktionsvermögen gegenüber Proteinen sowie kleinen RNAs und *target*-RNAs *in vitro* und *in vivo* analysiert werden. Darüber hinaus war zu ergründen, ob die Modifikation die subzelluläre Lokalisierung von Ago2 beeinflusst und welche Auswirkungen sie auf die Funktionalität von Ago hat (siehe Publikation Rüdell *et al.*, 2010).

Für den Nachweis der posttranslationalen Modifikation und ihrer physiologischen Relevanz *in vivo* wurde ein Ago-Antikörper benötigt. In einem weiteren Projekt war daher die Generierung und umfassende Charakterisierung eines monoklonalen Ago-Antikörpers zu verfolgen (siehe Publikation Rüdell *et al.*, 2008).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vorbereitende Arbeiten

Die Untersuchung posttranslationaler Modifikationen von Ago-Proteinen und deren Bedeutung erforderte folgende Vorarbeiten: Erstens wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Vektoren abgeändert, um ein unkompliziertes und zeitsparendes Klonieren zu ermöglichen. Zweitens wurde ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Ago2 generiert und charakterisiert, um das endogene Ago2-Protein spezifisch adressieren zu können.

#### 4.1.1 Klonierungskompatible Vektoren

Die übliche Vorgehensweise beim *de novo*-Klonieren ist die Amplifikation des Gens, dessen Restriktionsverdau und die anschließende Ligation in einen Vektor, beispielsweise zur Expression des kodierten Proteins. Je nach Expressionssystem oder gewünschtem Fusionsanhang, wie zum Beispiel GST, und ob dieser C- oder N-terminal positioniert sein soll, werden verschiedene Expressionsvektoren benötigt. Diese sind nur in Ausnahmefällen hinsichtlich ihrer *multiple cloning sites* (MCS) miteinander kompatibel. Meist erfordert jeder Vektor eine andere Restriktionsenzymkombination für die Klonierung des Gens von Interesse und damit auch spezifische Primer zum Einbringen der erforderlichen Erkennungssequenzen bei der *in vitro* Amplifikation des Gens. Um diese Problematik zu umgehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene, im Labor häufig genutzte Vektoren um die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *FseI* und *Ascl* ergänzt.

Für den Umbau der Vektoren wurden kurze DNA-Oligonukleotide konstruiert, die am 5'- und 3'-Ende über Erkennungssequenzen verfügen, die anschließend die Insertion in die MCS des zu modifizierenden Vektors erlauben. Während sich die konstruierten DNA-Oligonukleotide in den terminalen Bereichen je nach Zielvektor voneinander unterscheiden, sind sie im mittleren Abschnitt, der die *FseI*- und *Ascl*-Erkennungssequenzen umfasst, identisch. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

**Tabelle 4.1**  
**Oligonukleotidsequenzen zur Generierung von Vektoren mit Fsel- und Ascl-Erkennungssequenzen**

Zielvektor	FA-Klonierungskassetten	Klonierung via
pET-28a	ata GGA <b>TCC</b> tat tat agG CCG GCC att aat agG CCG GCC ata tat GAA TTC tat tat CCT AGG ata ata tCC GGC CGG taa tta tCC GCG CGG tat ata CTT AAG ata	BamHI / EcoRI
pGEX-6p1	ata GGA <b>TCC</b> tat tat agG CCG GCC att aat agG CCG GCC ata tat GAA TTC tat tat CCT AGG ata ata tCC GGC CGG taa tta tCC GCG CGG tat ata CTT AAG ata	BamHI / EcoRI
VP5	at agC GGC CCG tat tat agG CCG GCC att aat agG CCG GCC ata tat aGA ATT Cta t ta tCG CCG GCG ata ata tCC GGC CGG taa tta tCC GCG CGG tat ata tCT TAA Gat a	NotI / EcoRI
pCS2-FA	AAT TCa agG CCG cag gCc TC Gt tCC GGC CGG gtc cGg AGA GCT	EcoRI / XhoI

Überblick über die hybridisierten DNA-Oligonukleotide (Spalte 2), die zur Modifizierung der Zielvektoren (Spalte 1) eingesetzt wurden. Die Erkennungssequenzen der verschiedenen Restriktionsenzyme sind in Großbuchstaben wiedergegeben. In Spalte 3 sind die zur Insertion der DNA-Oligonukleotide verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt.

pET-28a-FA:  
 Restriktionsenzym ... BamHI FseI FseI AscI AscI EcoRI SacI Sali HindIII ...  
 DNA-Sequenz ...cgc **GGA TCC** tat tat agG **CCG GCC** att aat agG **CCG GCC** ata tat **GAA TTC GAG CTC** cGT CGA **CAA GCT TGC**...  
 Aminosäuresequenz ...Arg Gly Ser Tyr Arg Pro Ala Ile Asp Arg Arg Ala Ile Tyr Glu Ser Glu Leu Arg Arg Glu Ala Cys...

pGEX-6p1-FA  
 Restriktionsenzym ... BamHI FseI FseI AscI EcoRI SmaI Sali XhoI NotI ...  
 DNA-Sequenz ...ctg **GGA TCC** tat tat agG **CCG GCC** att aat agG **CCG GCC** ata tat **GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG** Cat...  
 Aminosäuresequenz ...Leu Gly Ser Tyr Arg Pro Ala Ile Asp Arg Arg Ala Ile Tyr Glu Ser Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His...

VP5-FA  
 Restriktionsenzym ... NotI FseI FseI AscI AscI EcoRI  
 DNA-Sequenz ...gat tac gct agC **GGC CCG** tat tat agG **CCG GCC** att aat agG **CCG GCC** ata tat agA **ATT Cag tGG ATC Cac** tag ...  
 Aminosäuresequenz ...Asp Tyr Ala Ser Gly Arg Tyr Arg Pro Ala Ile Asn Arg Arg Ala Ile Tyr Arg Ile Gln Trp Ile His STOP...

pCS2-FAME  
 Restriktionsenzym ... EcoRI FseI XhoI AscI ...  
 DNA-Sequenz ...ttg **AAT TCa agG CCG GCC** cag gcc tCT CGA **GGG CCG GCC** tct...  
 Aminosäuresequenz ...Leu Asn Ser Arg Pro Ala Gln Ala Ser Arg Gly Arg Ala Ser...

**Abbildung 4.1**  
**MCS der klonierungskompatiblen Vektoren mit eingefügten Fsel-/Ascl-Erkennungssequenzen**  
 Fett gedruckt oder unterstrichen, Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen

In der Praxis wurden die Oligonukleotide miteinander hybridisiert, einem Restriktionsverdau unterzogen und schließlich in den ebenfalls verdauten Vektor ligiert. DNA-Oligonukleotide von ca. 20-30 Nukleotiden (nt) Länge entsprachen konstruktionsbedingt nach der Hybridisierung bereits dem Endprodukt des Restriktionsverdau. Dadurch erübrigte sich die Aufreinigung der DNA-Oligonukleotide, die aufgrund der geringen Länge mit den handelsüblichen Kitsystemen nicht ohne weiteres möglich ist. Beide Strategien funktionierten gleichermaßen gut. Die MCS der generierten klonierungskompatiblen Vektoren sind Abbildung 4.1 zu entnehmen.

#### 4.1.2 Monoklonaler $\alpha$ -hsAgo2-Antikörper

Bislang wurden Ago-Proteine für biochemische Untersuchungen über Co-Präzipitation mit biotinylierter kleiner RNA aus Zelllysaten isoliert (Martinez *et al.*, 2002, Robb und Rana, 2007), durch Assoziation mit anderen Proteinfaktoren bei deren Reinigung gewonnen (Mourelatos *et al.*, 2002; Gregory *et al.*, 2005) oder als Fusionsprotein überexprimiert (Maniataki und Mourelatos, 2005; Meister *et al.*, 2005; Höck *et al.*, 2007), weil ein spezifischer Antikörper für das endogene Ago2-Protein lange Zeit nicht verfügbar war. Ein von Chan und Kollegen untersuchtes Antiserum erkennt zwar ein Protein von 100 kD in Western-Blotexperimenten mit humanem Zelllysaten und färbt GW-*bodies* (Abschnitt 2.6.2) in Immunfluoreszenzversuchen an. Doch bei Immunopräzipitationen von *in vitro*-translatiertem humanen Ago-1-4 zeigte sich, dass das Antiserum mit allen vier Vertretern reagiert (Jakymiw *et al.*, 2006). Unklar ist, ob es auch zu Kreuzreaktivitäten mit Ago-Proteinen anderer Spezies kommt und ob der Antikörper für Immunopräzipitationen aus Totallysaten geeignet ist. Ein anderer Antikörper, der ebenfalls Ago1, 2, 3 und 4 zugleich erkennt, kreuzreagiert mit dem Actin-bindenden Protein Radixin, was seine Anwendbarkeit in Immunfluoreszenzversuchen einschränkt. Zudem erkennt er ebenso murines Ago (Nelson *et al.*, 2007). Parallel zur vorliegenden Arbeit gelang es in der Arbeitsgruppe Siomi monoklonale Antikörper herzustellen, die die individuellen humanen Ago-Proteine erkennen. Für Immunopräzipitationsexperimente erwiesen sich letztlich der  $\alpha$ -Ago2- und der  $\alpha$ -Ago3-Antikörper als geeignet (Azuma-Mukai *et al.*, 2008).

Zu Beginn des Projektes „Posttranslationale Modifikationen humaner Ago-Proteine“ herrschte jedoch ein Mangel an spezifischen Antikörpern. Für die Bearbeitung der Thematik war es entscheidend diesen Mangel zu beheben.

##### 4.1.2.1 Spezifität des $\alpha$ -hsAgo2-Antikörpers in Western-Blotexperimenten

Die Primärsequenzen der humanen Ago1-4 Proteine unterscheiden sich im N-terminalen Bereich am stärksten voneinander. Daher wurde ein den ersten 15 N-terminalen Aminosäu-

ren von Ago2 entsprechendes Peptid synthetisiert (Abb. 4.2) und zur Antikörpergenerierung in Ratten injiziert.

hsAgo2	NM_012154	1	<b>M</b> <b>Y</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>P</b> PPPIQGYAFKPPRPD	30
hsAgo1	NM_012199	1	<b>M</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>P</b> PPLQOVFQAPRRPGIG	30
hsAgo3	NM_024852	1	<b>M</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>G</b> <b>S</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>O</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>M</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>P</b> <b>I</b>	30
hsAgo4	NM_017629	1	<b>M</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>O</b> <b>P</b> PPRRPGLGTVGKPIRL	30
Hili	NM_018068	1	<b>M</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>I</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>C</b> <b>O</b> <b>A</b> <b>V</b> <b>R</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>O</b>	30
Hiwi	NM_004764	1	<b>M</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>O</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>Q</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>O</b> <b>P</b>	30
Hiwi2	NM_152431	1	<b>M</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>S</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>P</b>	30
btAgo2	NM_205794	1	<b>M</b> <b>Y</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>P</b> PPPIQGYAFKPPRP	30
mmAgo2	NM_153178	1	<b>M</b> <b>Y</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>V</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>P</b> TTSPIPGYAFKPPRP	30
rnAgo2	NM_021597	1	<b>M</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>V</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>P</b> TTSPIPGYAFKPP	30

#### Abbildung 4.2

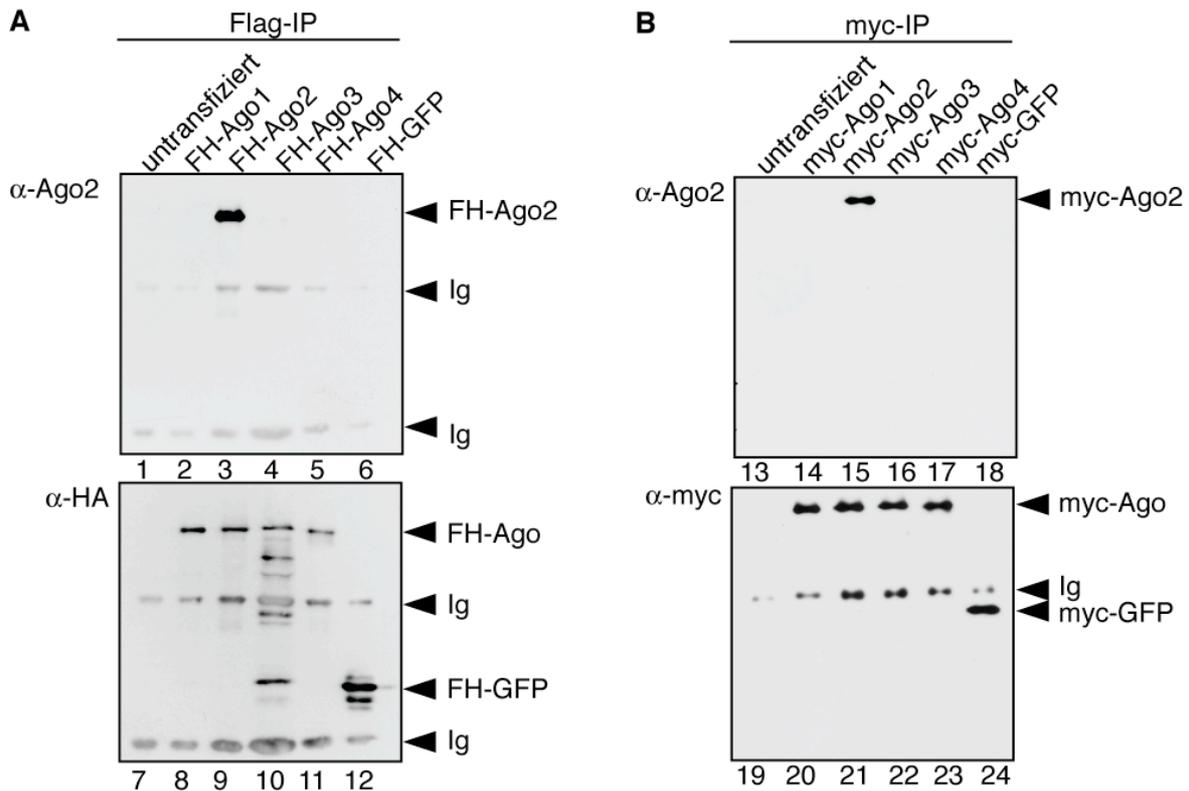
#### Vergleich der ersten 30 N-terminalen Aminosäuren verschiedener Argonaute-Proteine inklusive der Sequenz des zur Antikörpergenerierung synthetisierten Ago2-Peptids

Aufgelistet sind die N-Termini mehrerer Argonaut-Proteine verschiedener Spezies. Die für die Sequenzinformationen herangezogenen NCBI-Datenbankeinträge sind ausgewiesen. Die Aminosäuren des zur Antikörpergenerierung verwendeten Peptids sind grau unterlegt und fettgedruckt. Abkürzungen: hs, *Homo sapiens*; bt, *Bos taurus*; mm, *Mus musculus*; rn, *Rattus norvegicus*

Die Produktion von monoklonalen Antikörpern erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Elisabeth Kremmer (damals Gesellschaft für Strahlenforschung, heute Helmholtz-Zentrum München). Der Hybridomaklon 11A9 lieferte gute Ergebnisse im initialen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (engl.: *enzyme-linked immunosorbent-Assay*; kurz: ELISA-Test; E. Kremmer, persönliche Mitteilung). Daraufhin wurde der antikörperhaltige Zellkulturüberstand dieser Hybridomalie ungereinigt ausführlicher charakterisiert.

Zuerst wurde die Spezifität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers gegenüber den übrigen humanen Ago-Proteinen in der Western-Blotanalyse getestet. Zu diesem Zweck wurde FLAG/HA-Ago1-4

(FH-Ago1-4) und FH-GFP in HEK 293 Zellen überexprimiert und aus den Totallysaten mittels  $\alpha$ -FLAG-Immunopräzipitation isoliert. Lysat untransfizierter Zellen wurde zur Kontrolle unspezifischer Hintergrundsignale mitgeführt. Die Immunopräzipitate wurden schließlich via SDS-PAGE aufgetrennt und im *semi-dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.



**Abbildung 4.3**

**Ago2-Spezifität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers gegenüber überexprimierter Fusionsproteine im Western-Blotexperiment**

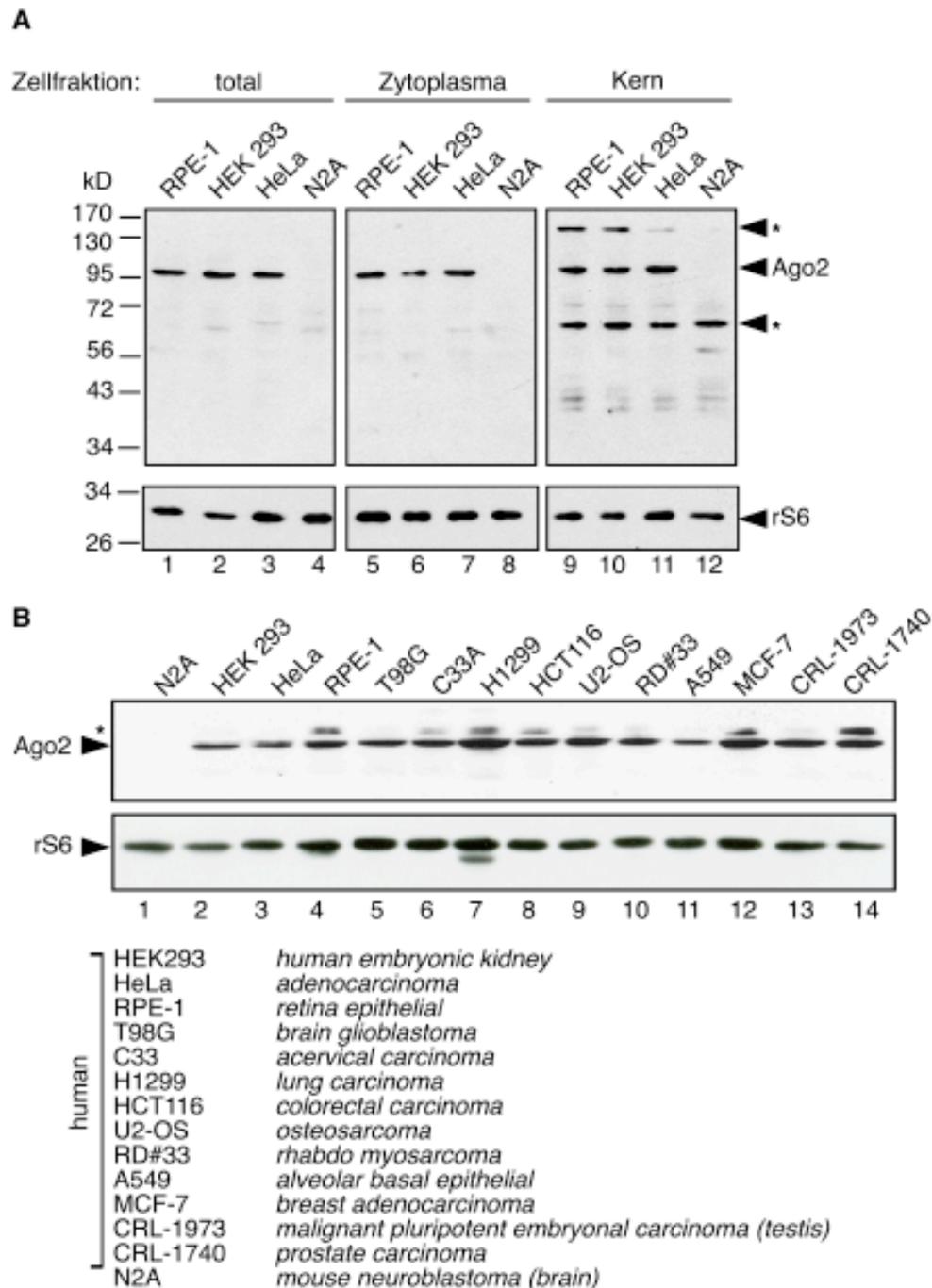
Die in HEK 293 Zellen überexprimierten Fusionsproteine FH-Ago1-4 und FH-GFP (A; Spur 2-6 und 8-12) bzw. myc-Ago1-4 und myc-GFP (B; Spur 14-18 und 20-24) wurden mit  $\alpha$ -FLAG- (A) bzw.  $\alpha$ -myc-Antikörper (B) immunopräzipitiert, via SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die erste Behandlung erfolgte mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper (A und B oben), die anschließende mit  $\alpha$ -HA- (A unten) bzw.  $\alpha$ -myc-Antikörpern (B unten). Lysat untransfizierter HEK 293 Zellen diente als Hintergrundkontrolle (Spur 1, 7, 13 und 19). Die Identitäten der Signale sind jeweils rechterhand ausgewiesen. „Ig“ bezeichnet die schweren und leichten Ketten der Immunglobuline.

Mit dem  $\alpha$ -Ago2-antikörperhaltigen Hybridoma-Zellkulturüberstand wurde in der Tat ausschließlich für FH-Ago2 ein Signal detektiert (Abb. 4.3 A, Spur 3). Wie die anschließende Behandlung der Membran mit  $\alpha$ -HA-Antikörpern zeigte, waren dabei FH-Ago1, -3 und -4 in

äquivalenten Mengen präsent (Abb. 4.3 A, Spur 8-11). Das Ergebnis konnte mit myc-Ago1-4 bestätigt werden (Abb. 4.3 B). Auch hier war keine Kreuzreaktivität des Antikörpers zu den übrigen humanen Ago-Proteinen zu beobachten.

Der Hybridomaklon 11A9 produziert ergo einen Antikörper, der überexprimiertes humanes Ago2-Protein im Western-Blot erkennt, ohne Kreuzreaktivität gegenüber hsAgo1, -3 oder -4 aufzuweisen. N-terminale Fusionspeptide wie FH oder myc stören die Epitop-erkennung dabei nachweislich nicht.

Nachdem die Ago2-Spezifität des generierten Antikörpers anhand überexprimierter Fusionsproteine abgesichert war, wurde untersucht, ob er auch endogenes Ago2-Protein im Western-Blot erkennt. Dazu wurden von verschiedenen humanen Zelllinien, namentlich RPE-1, HEK 293 und HeLa Zellen, Totallysate hergestellt und via Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle fungierte die Mauszelllinie N2A. Das Epitop des murinen Proteins ist nicht identisch mit dem humanen, so dass hier keine Antigen-Antikörper-Reaktion zu erwarten war. Tatsächlich wurde mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper für alle humanen Zelllinien ein Signal von ca. 100 kD detektiert, was der erwarteten Laufhöhe von endogenem Ago2 entspricht. Das Signal trat nicht in der Spur auf, in der murines Lysat geladen worden war (Abb. 4.4 A, links). Der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper zeigte folglich keine Kreuzreaktivität mit dem Mausprotein. Schließlich wurde die grobe subzelluläre Verteilung von endogenem Ago2 adressiert (Abschnitt 2.6). Dazu wurden die Zytoplasma- und Kernfraktionen getrennt via Western-Blot untersucht. Ago2 ließ sich nicht nur in den Zytoplasma-, sondern ebenso in den Kernfraktionen nachweisen (Abb. 4.4 A, Mitte und rechts).



**Abbildung 4.4**  
**Spezifität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers gegenüber endogenem humanem Ago2-Protein im Western-Blotexperiment**

(A) Von den humanen Zelllinien RPE-1, HeLa und HEK 293 (Spur 1-3, 5-7, 9-11) sowie der murinen Zelllinie N2A (Spur 4, 8, 12) wurden Totallysate (Spur 1-4) und Extrakte von Zytoplasma- (Spur 5-8) und Kernfraktion (Spur 9-12) hergestellt und via Western-Blot analysiert. (B) Auch von zehn weiteren humanen Zelllinien wurden Totallysate erstellt und ebenfalls via Western-Blot analysiert. Die Zelllinien sind namentlich aufgeführt. Zwei davon stehen in Zusammenhang mit den männlichen Keimdrüsen (Spur 13, 14). Für die SDS-PAGE wurden jeweils 30  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Western-Blotanalyse erfolgte mit  $\alpha$ -Ago2- (A, B oben) und  $\alpha$ -rS6-Antikörper (A, B unten). Das ribosomale Protein S6 fungierte als Ladekontrolle, die N2A-Lysate als Negativkontrollen für den  $\alpha$ -Ago2-Antikörper. Der Stern \* kennzeichnet Signale unbekannter Identität.

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass humanes Ago2 auch im Zellkern bzw. in kernassoziierten Kompartimenten, wie beispielsweise dem Endoplasmatischen Retikulum, eine Rolle spielt (Tahbaz *et al.*, 2001; Weinmann *et al.*, 2009).

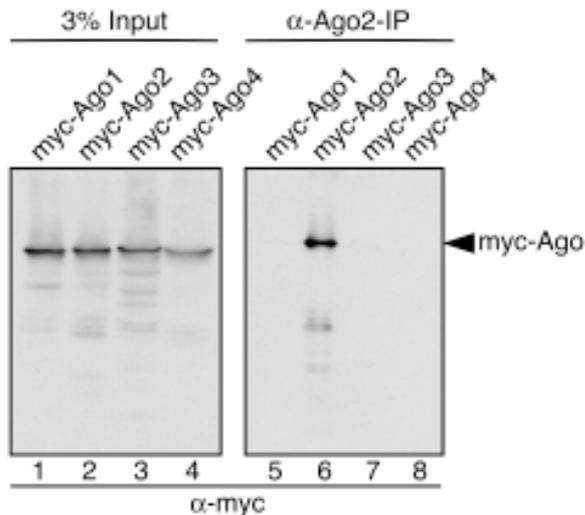
Es wurden weitere humane Zelllinien auf Ago2-Expression via Western-Blotanalyse untersucht (Abb. 4.4 B). In allen war Ago2 nachweisbar. Allerdings zeigte sich bei einigen Totallysaten neben dem 100 kD-Signal ein zweites, höhermolekulares (Abb. 4.4 B, \* in Spur 4, 6-9, 12 und 14).

Es ist festzuhalten, dass der generierte monoklonale  $\alpha$ -Ago2-Antikörper die spezifische Detektion des endogenen humanen Ago2-Proteins in Western-Blotexperimenten gestattet. Bereits drei Aminosäureaustausche im murinen Ago2-Protein (Abb. 4.2) führen zum gänzlichen Verlust der antigenen Eigenschaft des Proteins gegenüber dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper. Dennoch besteht wahrscheinlich zu mindestens zwei weiteren Kernproteinen eine Kreuzreaktivität, die in Western-Blotanalysen von Kernextrakten bedeutsam wird.

#### 4.1.2.2 Spezifität des $\alpha$ -hsAgo2-Antikörpers in Immunopräzipitationsversuchen

Der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper zeigt eine hohe Spezifität für endogenes humanes Ago2-Protein in Western-Blotansätzen. Für verschiedene andere biochemische Untersuchungen, wie z.B. Affinitätschromatographietechniken, ist allerdings die spezifische Erkennung des nativen Proteins in Lösung wünschenswert. In den nachfolgenden Experimenten wurde geprüft, ob der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper 11A9 das endogene Ago2-Protein immunopräzipitieren kann.

In einem ersten Ansatz wurden dazu myc-Fusionsproteine der vier humanen Ago-Proteine in HEK 293 Zellen überexprimiert und Totallysate hergestellt. Parallel dazu wurde der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper an eine Protein G-Sepharosematrix gekoppelt und zusammen mit den Totallysaten inkubiert. Nach 2 Stunden langsamer Rotation bei 4°C erfolgten mehrere Waschschriffe, bevor die Immunopräzipitate in SDS-Probenpuffer aufgenommen wurden. Die Analyse der Proben erfolgte mittels  $\alpha$ -myc-Western-Blot (Abb. 4.5).



**Abbildung 4.5**  
**Spezifische Immunopräzipitation von myc-Ago2 mit dem monoklonalen  $\alpha$ -Ago2-Antikörper**

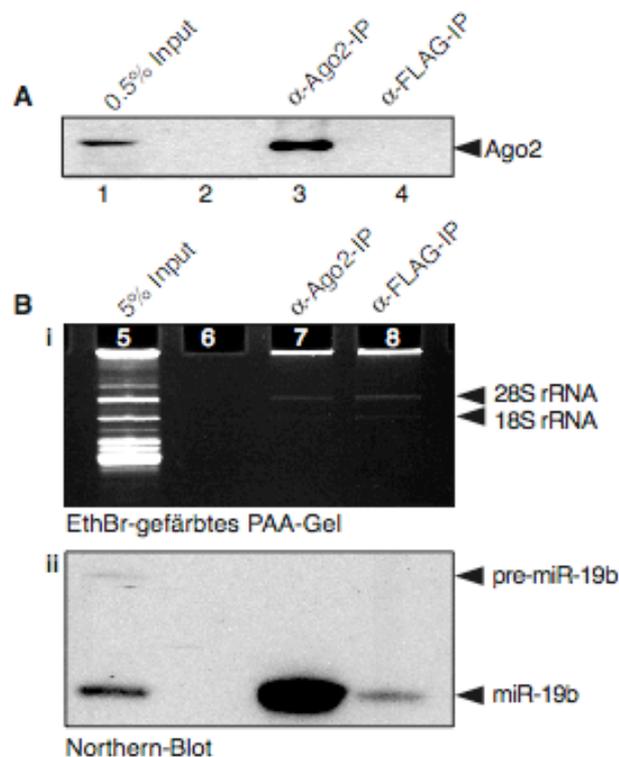
Myc-Ago1-4 wurde in HEK 293 Zellen überexprimiert und die Totallysate mit dem an Protein G-Sepharose gekoppelten  $\alpha$ -Ago2-Antikörper zusammen inkubiert. Das Experiment wurde via  $\alpha$ -myc-Western-Blot analysiert. Spur 1-4: 3% des eingesetzten Lysatvolumens (Input); Spur 5-8:  $\alpha$ -myc-Immunopräzipitate; IP, Immunopräzipitation.

Durch den  $\alpha$ -Ago2-Antikörper wurde ausschließlich und effizient myc-Ago2 immunopräzipitiert und keines der anderen myc-Ago-Proteine. Die N-terminale Fusion mit sechs myc-Peptiden stellte dabei kein Hindernis für die Epitoperkennung in Lösung dar. Ergo erfüllt der monoklonale Antikörper die Anforderung, Ago2 auch in Lösung spezifisch zu erkennen.

Analog zur Antikörpercharakterisierung bezüglich Western-Blotanalysen (Abschnitt 4.1.2.1) war nun die Frage zu beantworten, ob der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper auch mit dem im Vergleich zum überexprimierten Fusionsprotein weniger abundanten endogenen Ago2-Protein in Lösung reagieren kann. Für die  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitation ( $\alpha$ -Ago2-IP) wurde Totallysat untransfizierter HEK 293 Zellen eingesetzt. Als Kontrolle diente an Protein G-Sepharose gekoppelter  $\alpha$ -FLAG-Antikörper. Tatsächlich bekundet der  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot, dass der gegen Ago2 gerichtete Antikörper auch das endogene Protein spezifisch und effizient zu präzipitieren vermag (Abb. 4.6 A). Ein Ago2-Signal war nur im eingesetzten Lysat (Spur 1) und im  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat (Spur 3) zu detektieren, nicht aber in dem des Kontrollantikörpers (Spur 4).

Argonaute-Proteine repräsentieren die zentralen Proteinkomponenten aller durch kleine RNAs vermittelten Genregulationswege. Sie interagieren direkt mit diesen kleinen

RNAs. Um herauszufinden, ob der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper tatsächlich funktionales, mit microRNA- (miRNA-) beladenes Ago2-Protein erkennt, wurden die Immunopräzipitate auf die Anwesenheit von miRNAs untersucht. Aus den Proben wurde die RNA isoliert, für die Northern-Blotanalyse aufbereitet und in einem denaturierenden, 15%igen Urea-Polyacrylamidgel aufgetrennt.



**Abbildung 4.6**  
**Spezifische Immunopräzipitation von miRNA-beladenem, endogenem Ago2-Protein mit monoklonalem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper**

Monoklonaler  $\alpha$ -Ago2- bzw.  $\alpha$ -FLAG-Antikörper wurde an Protein G-Sepharose gekoppelt und mit Zelllysät unbehandelter HEK 293 Zellen inkubiert. Im Anschluss an die Immunopräzipitation (IP) wurde eine Hälfte jeder Probe via  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot analysiert (A), von der anderen Hälfte wurde die RNA isoliert und mittels Northern-Blot auf ihren Gehalt an microRNA-19b (miR-19b) untersucht (B). Dazu wurden die im denaturierenden, 15%igen Urea-Polyacrylamidgel (Urea-PAA-Gel) aufgetrennten Nucleinsäuren mit Ethidiumbromid (EthBr) angefärbt (B,i), auf eine Nylonmembran transferiert und schließlich mit einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde gegen miR-19b inkubiert. Das Autoradiogramm ist in B,ii gezeigt. Spur 1 und 5 (i,ii): 0,5% und 5% des für die IP eingesetzten Lysatvolumens; Spur 2 und 6 (i,ii): unbeladen; Spur 3 und 7 (i,ii): Immunopräzipitat der  $\alpha$ -Ago2-IP; Spur 4 und 8 (i,ii): Immunopräzipitat der  $\alpha$ -FLAG-IP. Die  $\alpha$ -FLAG-IP dient der Kontrolle auf unspezifische Signale. rRNA...ribosomale RNA; pre-miR-19b...miR-19b-Vorläufermolekül, miR-19b...reife miR-19b

Das Gel wurde anschließend zur RNA-Qualitätskontrolle mit Ethidiumbromid angefärbt. Dabei werden hauptsächlich in großer Quantität auftretende, partiell doppelsträngige und

langkettige Nukleinsäuren, wie mRNA und rRNA detektiert. Deswegen unterscheiden sich die Bandenmuster der  $\alpha$ -Ago2- bzw.  $\alpha$ -FLAG-Immunopräzipitate nicht voneinander (Abb. 4.6 B, i). Die distinkten 18S- und 28S-rRNA-Banden sprechen dafür, dass bei der Probenvorbereitung keine Ribonukleaseaktivität (RNase-Aktivität) aufgetreten ist. Die aus den Proben isolierten Nukleinsäuren sind folglich von vergleichbarer und guter Qualität. Der anschließende Transfer aus dem Gel auf die Nylonmembran erfolgte im *semi-dry*-Blotverfahren. Für die Detektion wurde eine gegen microRNA-19b (miR-19b) gerichtete, radioaktiv-markierte DNA-Sonde eingesetzt. Aufgrund ihres vergleichsweise hohen Expressionslevels in HEK 293 Zellen ist miR-19b eine häufig adressierte Modell-miRNA in diesem Zellsystem und wurde auch in diesem Versuch stellvertretend für die Bestätigung der miRNA-Präsenz in Ago2-Immunopräzipitaten ausgewählt.

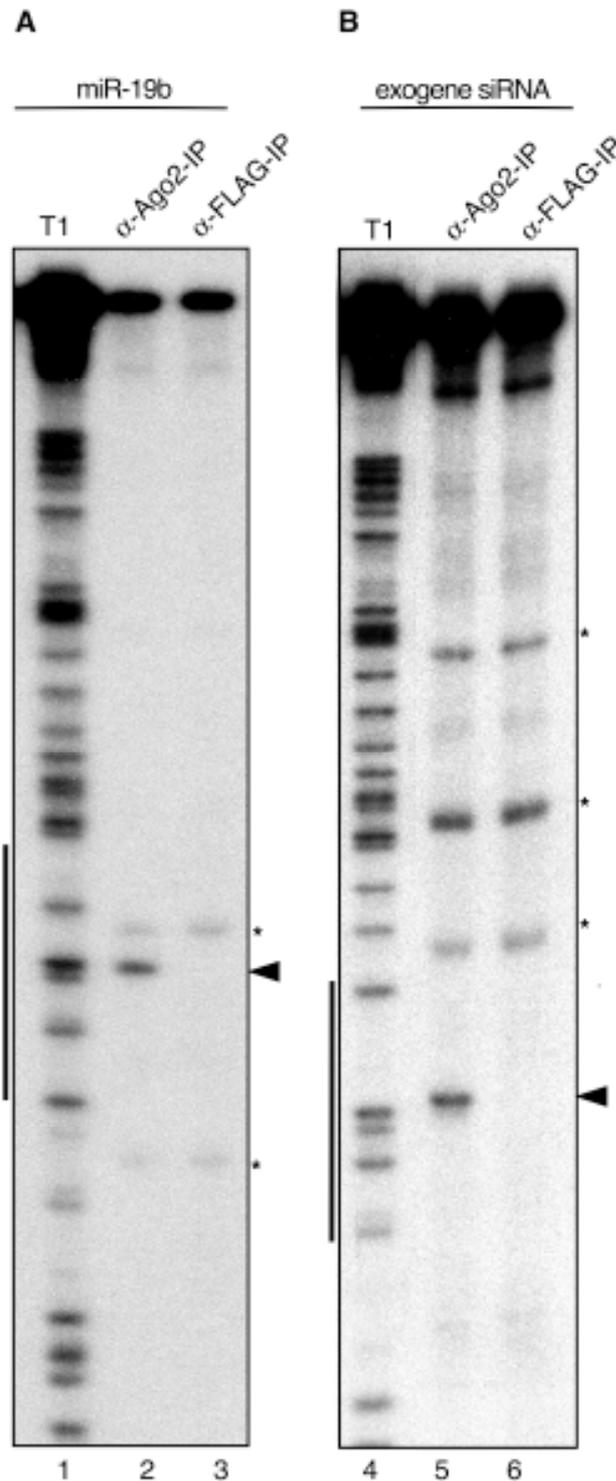
Der miR-19b-Northern-Blot belegt eindeutig die Gegenwart und Anreicherung von miRNA-19b im  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat (Abb. 4.6 B, ii Spur 7). Infolge der  $\alpha$ -FLAG-IP ist ebenfalls ein miR-19b-Signal zu detektieren (ii, Spur 8), allerdings von weit geringerer Intensität. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hier um unspezifisch mit dem Trägermaterial assoziierte Moleküle. In nachfolgenden Arbeiten konnten weitere miRNAs spezifisch im  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend gilt, dass der monoklonale  $\alpha$ -Ago2-Antikörper für die spezifische und effiziente Immunopräzipitation auch von mit miRNA-beladenem, endogenem Ago2-Protein einsetzbar ist.

Eine besondere Fähigkeit von Ago2 ist es, die Spaltung einer zur gebundenen kleinen RNA perfekt komplementären *target*-RNA zu katalysieren (Abschnitt 2.4.4). Deshalb testeten wir, ob der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper eine Reinigung des aktiven RNA-induzierten Repressorkomplex (engl.: *RNA-induced silencing complex*, kurz: RISC) gestattet. Dazu wurden *in vitro* RISC-Assays durchgeführt, deren experimenteller Ablauf in Abschnitt 2.4.4, Abbildung 2.3 erläutert ist. Endogenes Ago2-Protein wurde mittels  $\alpha$ -Ago2-IP aus Totallysat von HEK 293 Zellen isoliert. Zur Identifikation unspezifischer Hintergrundsignale wurde eine Kontrolle mit

$\alpha$ -FLAG-Antikörper mitgeführt. Da immunopräzipitierte Ago2-Moleküle zumindest anteilig miR-19b gebunden haben (Abb. 4.6), wurden die Proben mit einer  $^{32}\text{P}$ -*target*-RNA inkubiert, die über eine perfekt komplementäre Bindungsstelle für miR-19b verfügt. Nach dem Stoppen der Spaltungsreaktion (engl.: *cleavage*) wurde die RNA isoliert, gereinigt und im denaturierenden Harnstoffgel der Größe nach aufgetrennt. Für den Größenstandard wurde die  $^{32}\text{P}$ -*target*-RNA einem partiellen RNase T1-Verdau unterzogen. Diese Riboendonuklease katalysiert die Hydrolyse von Phosphorsäurediesterbindungen 3' von Guaninresten und liefert daher ein sequenzspezifisches Bandenmuster im Radiogramm (Abb. 4.7 A, Spur 1). Der Bereich, der der integrierten miR-19b-Bindungsstelle entspricht, ist neben dem Radiogramm durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet (Abb. 4.7). Die Frage, ob das  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat enzymatisch aktiven RISC enthält, bejahte das Experiment eindeutig: Ausschließlich in Folge der  $\alpha$ -Ago2-IP ist das erwartete 5'-Fragmente der RISC-spezifischen Endonukleolyse zu detektieren (Abb. 4.7 A, Spur 2). Im Kontrollansatz mit dem  $\alpha$ -FLAG-Antikörper sind lediglich die unspezifischen Signale zu erkennen (Abb. 4.7 A, Spur 2 und 3).

In einem weiteren Experiment wurde die *in vitro* Rekonstitution von RISC (Abb. 2.3 B) aus  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat und einer nachträglich von außen zugesetzten kleinen RNA getestet. Abbildung 4.7 B ist zu entnehmen, dass auch bei diesem Ansatz das erwartete 5'-Fragment spezifisch infolge der  $\alpha$ -Ago2-IP auftritt (Spur 5).

Mit dem monoklonalen  $\alpha$ -Ago2-Antikörper (11A9) ist es folglich möglich, natives Ago2-Protein zu präzipitieren, das endonukleolytisch aktiv ist und mit exogenen, einzelsträngigen siRNAs beladen werden kann. Der Antikörper erfüllt somit die grundsätzlichen Bedingungen, um bei der biochemischen Charakterisierung von endogenen Ago2-Komplexen wertvolle Dienste zu leisten.

**Abbildung 4.7****Spezifische Immunopräzipitation von enzymatisch aktivem RISC durch den monoklonalen  $\alpha$ -Ago2-Antikörper**

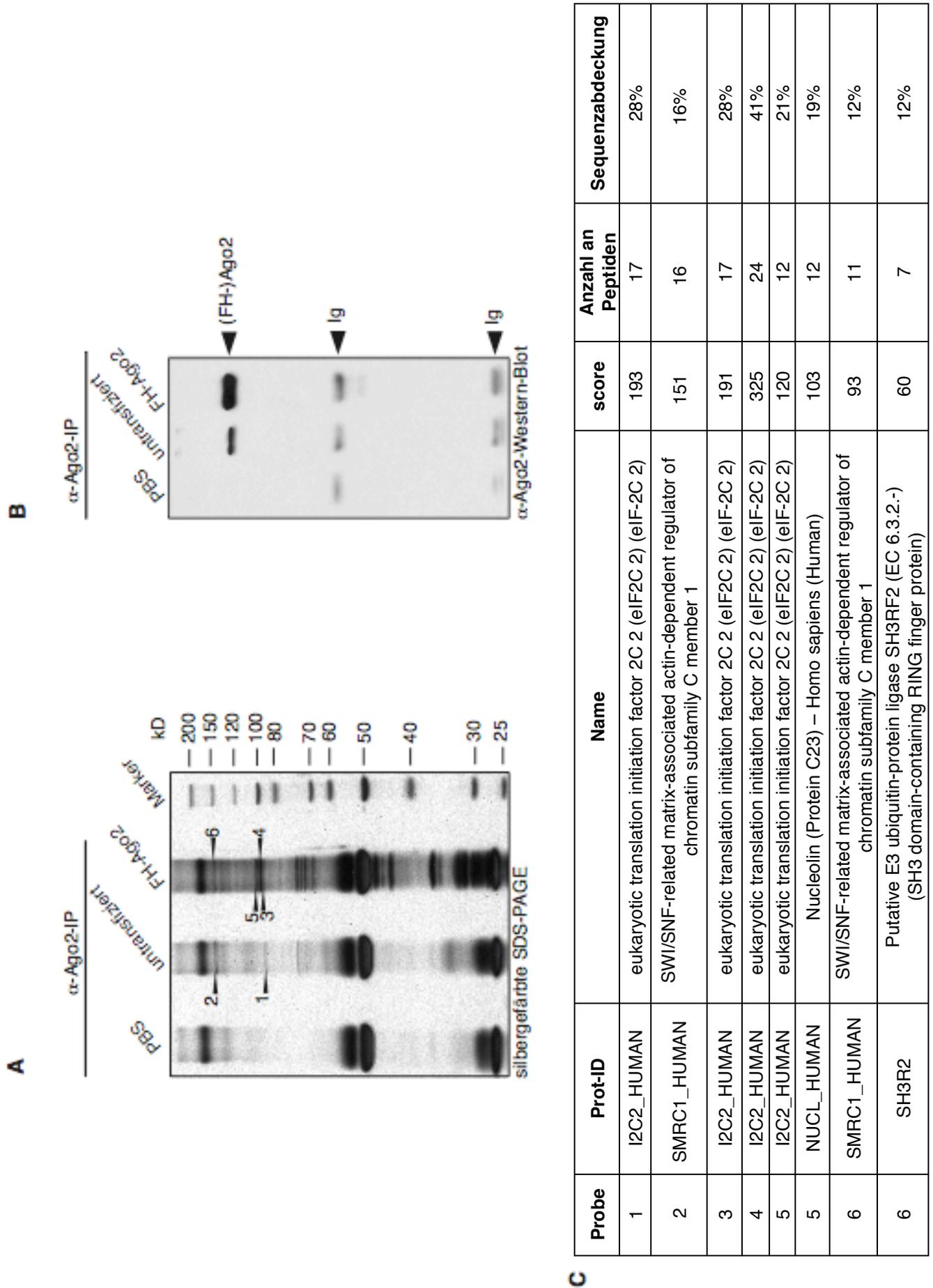
Monoklonaler  $\alpha$ -Ago2- bzw.  $\alpha$ -FLAG-Antikörper wurde an Protein G-Sepharose gekoppelt und mit Totallysat un behandelter HEK 293 Zellen inkubiert. Die  $\alpha$ -FLAG-IP diente als Negativkontrolle. (A) Die Immunpräzipitate wurden mit einer  $^{32}\text{P}$ -*target*-RNA inkubiert, die eine perfekt komplementäre Bindungsstelle für miR-19b enthält. Schließlich wurde die Reaktion gestoppt, die gereinigte RNA auf einem denaturierenden Harnstoffgel der Größe nach aufgetrennt und anhand der  $^{32}\text{P}$ -Markierung autoradiographisch sichtbar gemacht. (B) Die Immunpräzipitate wurden mit der exogenen, einzelsträngigen siRNA 21.27 zur *in vitro* Rekonstitution von RISC inkubiert, bevor die korrespondierende  $^{32}\text{P}$ -*target*-RNA dazugegeben wurde. Die Analyse erfolgte wie unter (A) beschrieben. Als Größenstandard diente ein partieller RNase T1-Verdau der eingesetzten  $^{32}\text{P}$ -*target*-RNA (Spur 1 und 4). Die Proben der  $\alpha$ -Ago2-IP sind in Spur 2 und 5, die der  $\alpha$ -FLAG-IP in Spur 3 und 6 geladen. Unspezifische Signale sind mit einem Stern gekennzeichnet (\*), die RISC-spezifischen mit einem Pfeil. Die schwarzen Balken links der Autoradiogramme markieren den Bereich, der der miRNA- bzw. siRNA-Bindungsstelle entspricht.

Alle experimentellen Befunde sprechen für die Spezifität des generierten  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers: Er erkennt das überexprimierte Ago2-Fusionsprotein und vor allem endogenes Ago2-Protein sowohl in Western-Blot- wie auch in Immunopräzipitationsexperimenten, ohne Kreuzreaktivität(en) zu den anderen drei humanen Argonaute-Proteinen zu offenbaren. In

den  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitaten lassen sich darüber hinaus die typischen Charakteristika funktionaler, katalytisch aktiver Ago2-Komplexe nachweisen, namentlich die Bindung von miRNAs und Endonukleaseaktivität. Außerdem eignen sich die Immunopräzipitate zur *in vitro* Rekonstitution von RISC.

Trotzdem besteht der Verdacht einer Kreuzreaktivität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers (Abb. 4.4 A). Das  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat sollte aus diesem Grund massenspektrometrisch analysiert werden. Dazu wurde der Antikörper an Protein G-Sepharose gekoppelt und wie folgt eingesetzt: Erstens für die IP von endogenem Ago2-Protein (Inkubation mit Totallysat unbehandelter HEK 293 Zellen), zweitens für die IP von überexprimiertem FH-Ago2 (Inkubation mit Totallysat von FH-Ago2-überexprimierenden HEK 293 Zellen) und drittens für eine Schein-IP (Inkubation mit PBS). Die erhaltenen Immunopräzipitate wurden einer 10%igen SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung unterzogen (Abb. 4.8 A). Zur Qualitätskontrolle wurde ein kleiner Teil der Proben im  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot analysiert (Abb. 4.8 B). Das bislang als Ago2-spezifisch ausgelegte Signal trat erwartungsgemäß ausschließlich in den Ansätzen mit Lysat auf und deutlich stärker im Zusammenhang mit überexprimiertem FH-Ago2 (Abb. 4.8 B, Spur 5 und 6). Die Silberfärbung dokumentiert die Co-Immunopräzipitation weiterer Proteine (Abb. 4.8 A, Spur 2 und 3). Proteinbanden, die von den Antikörpern herrühren, treten auch in der PBS-Probe auf und können daher in allen Proben gut identifiziert werden (Abb. 4.8 A, Spur 1). Für die massenspektrometrische Analyse sind ausschließlich die übrigen Signale interessant. Das Ergebnis ausgewählter Proteinbanden ist der Tabelle in Abbildung 4.8 C zu entnehmen. Es belegt, dass es sich bei dem 100 kD-Signal, das in Folge der  $\alpha$ -Ago2-IP auftritt, in der Tat um Ago2 handelt (Abb. 4.8 A und C, Bande 1). Die Banden 3, 4 und 5 in der Probe mit überexprimiertem FH-Ago2 enthalten ebenfalls Ago2-Protein.

Abbildung 4.8



**Abbildung 4.8****Massenspektrometrischer Beweis der Spezifität des generierten Antikörpers für Ago2 in Western-Blotanalysen und Immunopräzipitationen**

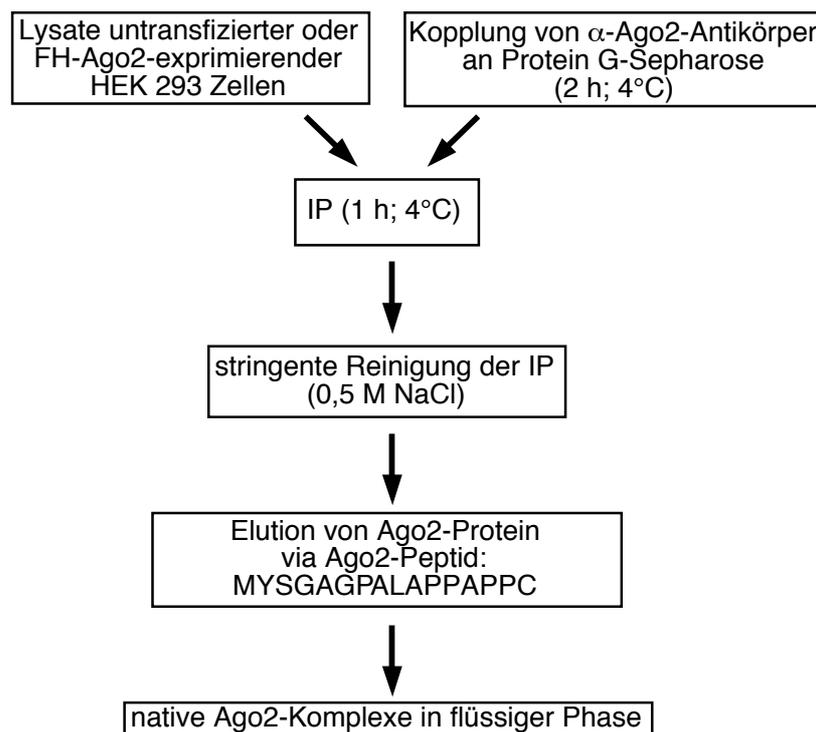
Monoklonaler  $\alpha$ -Ago2-Antikörper wurde an Protein G-Sepharose gekoppelt und mit PBS (Spur 1 und 4), mit Lysat unbehandelter (Spur 2 und 5) oder Lysat von FH-Ago2-überexprimierenden HEK 293 Zellen (Spur 3 und 6) inkubiert. (A) 10%ige SDS-PAGE der Immunopräzipitate mit anschließender Silberfärbung. Massenspektrometrisch analysierte Banden sind mit nummerierten Pfeilen gekennzeichnet. (B)  $\alpha$ -Ago2-Western-Blotanalyse der Proben aus (A). (C) Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der Banden 1-6 aus (A). Ig, Immunglobulin

Für Bande 3 sind die massenspektrometrischen Parameter „score“, „Anzahl der Peptide“ und „Sequenzabdeckung“ nahezu identisch mit denen von Bande 1, was nahelegt, dass es sich bei Bande 3 um endogenes Ago2 Protein handelt, während Bande 4 mit den deutlich größeren Datenwerten höchstwahrscheinlich auf das Fusionsprotein FH-Ago2 zurückzuführen ist, das bedingt durch das Fusionspeptid „FLAG/HA-“ geringfügig langsamer im Gel migriert. Entscheidend für das Spezifitätsurteil des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers ist jedoch das Ergebnis der Banden 2 und 6. Die massenspektrometrische Analyse identifizierte in diesen zwei Proben das nukleäre Protein „*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 1*“ (SMRC1, Q92922 UniProtKB). In dem massenspektrometrischen Parameter „score“ zeigt sich interessanterweise eine Abnahme für SMRC1 bei Ago2-Überexpression (Abb. 4.8 C, Probe 2 und 6). Das lässt vermuten, dass es sich bei SMRC1 um kein spezifisch mit Ago2 interagierendes Protein handelt, denn in dem Fall würde man keine Veränderung oder sogar eine Zunahme des „score“-Wertes erwarten.

Es ist festzuhalten, dass mittels Massenspektrometrie die Erkennung von Ago2 durch den generierten Antikörper für Western-Blotanalysen und Immunopräzipitationen bewiesen werden konnte. Allerdings erhärtet sich der Eindruck einer Kreuzreaktivität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers, der offenbar ebenso das Kernprotein SMRC1 in IP-Ansätzen nicht aber in Western-Blotanalysen erkennt (Abb. 4.8 A/C gegenüber B).

#### 4.1.2.3 Isolierung von enzymatisch-aktivem RISC und Elution mit Ago2-Peptid

Um Fragestellungen wie kinetische Charakterisierungen oder auch Proteomik-Ansätze experimentell adäquat adressieren zu können, ist es erforderlich, RISC in weitestgehend reiner Form, frei von Fremdproteinen und in Lösung vorliegen zu haben. Der monoklonale  $\alpha$ -Ago2-Antikörper wurde gegen ein Peptid generiert (Abb. 4.2), das folglich ebenso ein Epitop für den Antikörper darstellt wie der N-Terminus des kompletten Ago2-Proteins. Bei Zugabe des Peptids zu einem  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat resultiert eine Konkurrenz zwischen Ago2-Peptid und Ago2-Protein um die Antikörperbindung. Darauf aufbauend ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen, ein Protokoll für die peptidinduzierte Elution von immunopräzipitiertem Ago2-Protein zu etablieren.



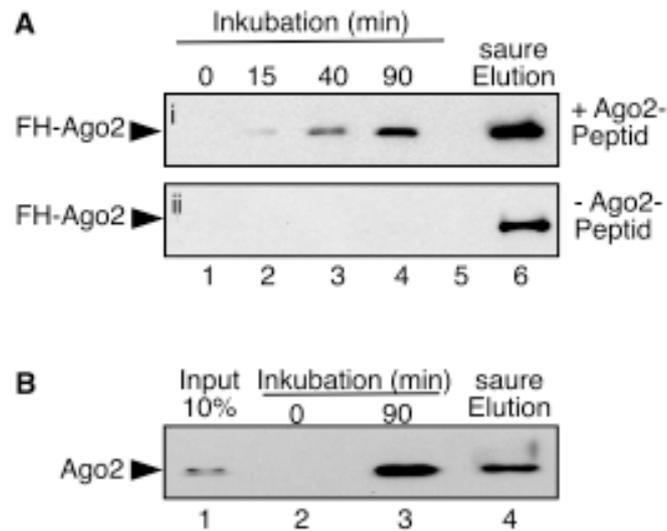
**Abbildung 4.9**  
**Flussdiagramm zur peptidinduzierten Ago2-Elution**

Die IP von endogenem Ago2-Protein aus Zelllysat erfolgt mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper (11A9). Das Immunopräzipitat wird stringent gewaschen und zusammen mit dem zur Generierung des  $\alpha$ -Ago2-Antikörper verwendeten Ago2-Peptid inkubiert. Die Konkurrenz von Peptid und dem immunopräzipitierten Protein um die Antikörperbindung bedingt die Elution von Ago2.

Abbildung 4.9 illustriert den Ablauf: Endogenes Ago2-Protein wird mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper (11A9) immunopräzipitiert und stringent gewaschen. Im Anschluss wird das Präzipitat zusammen mit einer hohen Konzentration an Ago2-Peptid inkubiert, wobei es zum Austausch von Protein und Peptid an der Antikörpermatrix kommt. Schließlich wird das in die flüssige Phase entlassene Ago2-Protein vom Trägermaterial mit den  $\alpha$ -Ago2-Antikörper-Peptid-Komplexen separiert. Die gewonnene Lösung enthält RISC und überschüssiges Ago2-Peptid, das jedoch durch Dialyse entfernt werden kann. Auf diesem Weg lässt sich Ago2 aus Zelllysaten reinigen und steht für nachfolgende Untersuchungen in isolierter Form zur Verfügung.

Im ersten Vorversuch wurden die Kompetitoreigenschaften des Ago2-Peptids getestet: FH-Ago2 wurde mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper aus Totallysat von HEK 293 Zellen immunopräzipitiert und bei 4°C mit und ohne Peptid inkubiert. Das überexprimierte FH-Protein wurde im Überschuss angeboten, so dass die maximal mögliche Absättigung der von der Antikörpermatrix bereitgestellten Bindungsstellen angenommen werden konnte. Der flüssige Phase, sprich dem Eluat, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine Probe entnommen. Im letzten Schritt wurden alle an der Antikörpermatrix verbliebenen Proteine durch eine denaturierende Säurebehandlung in Lösung gebracht. Die Analyse der Proben erfolgte via  $\alpha$ -HA-Western-Blot (Abb. 4.10 A).

Während ohne Zugabe von Ago2-Peptid kein FH-Ago2-Signal zu detektieren war (Abb. 4.10 A, ii), nimmt die Signalstärke in Gegenwart des Peptides mit Länge der Inkubationsdauer stetig zu (Abb. 4.10 A, i). Allerdings war auch nach 1,5 Stunden ein Großteil von FH-Ago2 noch immer an die Antikörpermatrix gebunden und konnte erst mit der Säurebehandlung eluiert werden (Abb. 4.10 A, i, Spur 6). Das könnte auf einen Überschuss von FH-Ago2 gegenüber dem Ago2-Peptid zurückzuführen sein und sollte optimiert werden.

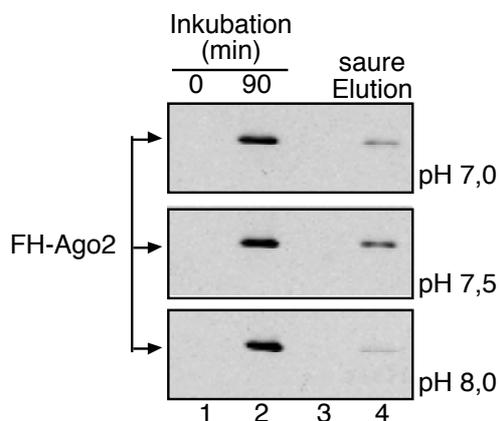
**Abbildung 4.10****Elution von immunpräzipitiertem Ago2-Protein durch Peptidkompetition**

(A) FH-Ago2 wurde in HEK 293 Zellen überexprimiert, mit  $\alpha$ -Ago2-Antikörper immunopräzipitiert und anschließend mit (i) und ohne (ii) Ago2-Peptid inkubiert. Zu den in Minuten angegebenen Zeitpunkten wurden Proben vom Eluat entnommen (Spur 1 bis 4). Alle am Trägermaterial verbliebenen Proteine wurden schließlich durch eine denaturierende Säurebehandlung eluiert (Spur 6). Die Analyse der Proben erfolgte via  $\alpha$ -HA-Western-Blot. Spur 5 wurde bei der Beladung des Gels ausgespart. (B) Aus Totallysat unbehandelter HEK 293 Zellen wurde endogenes Ago2-Protein mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper immunopräzipitiert und nachfolgend 90 Minuten mit dem Ago2-Peptid inkubiert, bevor eine abschließende Säurebehandlung durchgeführt wurde. Spur 1: 10 % der IP vor der Peptidkompetition; Spur 2 und 3: flüssige Phase der IP vor und nach 90 Minuten Inkubation mit Ago2-Peptid; Spur 4: Eluat der Säurebehandlung. Die Analyse der Proben erfolgte via  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot.

Vorab jedoch wurde das Experiment mit endogenem Ago2-Protein wiederholt (Abb. 4.10 B). Auch in diesem Versuch konnte das immunpräzipitierte Ago2-Protein mit dem Peptid erfolgreich freigesetzt werden (Abb. 4.10 B, Spur 3). Zudem scheint dieses Ergebnis die Vermutung zu bestätigen, dass im vorherigen Experiment mit FH-Ago2 ungünstiger Mengenverhältnisse zugrunde lagen. Anders als beim Fusionsprotein FH-Ago2 ist es nun mit der unveränderten Peptid-Menge durchaus möglich, den Großteil an immunpräzipitiertem, endogenem Ago2 zu eluieren (Abb. 4.10 B, Spur 3 und 4). Zusammenfassend bestätigt dieses erste Experiment, dass mit dem Ago2-Peptid die Elution von Ago2 von einer  $\alpha$ -Ago2-Antikörpermatrix möglich ist. Das gilt für FH-Ago2 wie auch für endogenes Ago2-Protein.

Es galt nun die Elutionseffizienz zu steigern. Im ersten Optimierungsschritt wurde die Menge an Ago2-Peptid titriert. Mit größeren Peptidmengen konnte mehr Ago2-Protein eluiert werden (Daten nicht gezeigt). 100 µg Ago2-Peptid je 25 µl Antikörpermatrix wurden fortan als Standardkonzentration festgesetzt. Im zweiten Schritt wurde die Ago2-Elution bei 25°C statt bei 4°C durchgeführt, was den Anteil an freiem Ago2-Protein zusätzlich steigerte (Daten nicht gezeigt). Diese beiden Neuerungen verschoben das Verhältnis von antikörpergebundenem zu freiem Ago2-Protein deutlich in Richtung des freien Proteins (Abb. 4.11, Mitte).

Der dritte Optimierungsansatz adressierte den Einfluss des pH-Wertes. Standardmäßig wurde die Elution bislang bei pH 7,5 durchgeführt (Abb. 4.11, Mitte). Mit einer Absenkung auf pH 7,0 konnte eine leichte Effizienzsteigerung erreicht werden (Abb. 4.11, oben). Die Verschiebung ins schwach Alkalische auf pH 8,0 erlaubte dagegen eine nahezu vollständige Loslösung des Ago2-Proteins vom Antikörper (Abb. 4.11, unten). Es stellt keinen Widerspruch dar, dass mit konträren Veränderungen tendenziell identische Effekte erzielt wurden. Möglicherweise reagieren jeweils andere Aminosäureseitenketten auf die pH-Änderung, doch bedingt das in beiden Fällen nichtsdestotrotz eine Destabilisierung der Antigen-Antikörper-Interaktion und erhöht somit die Elutionseffizienz.



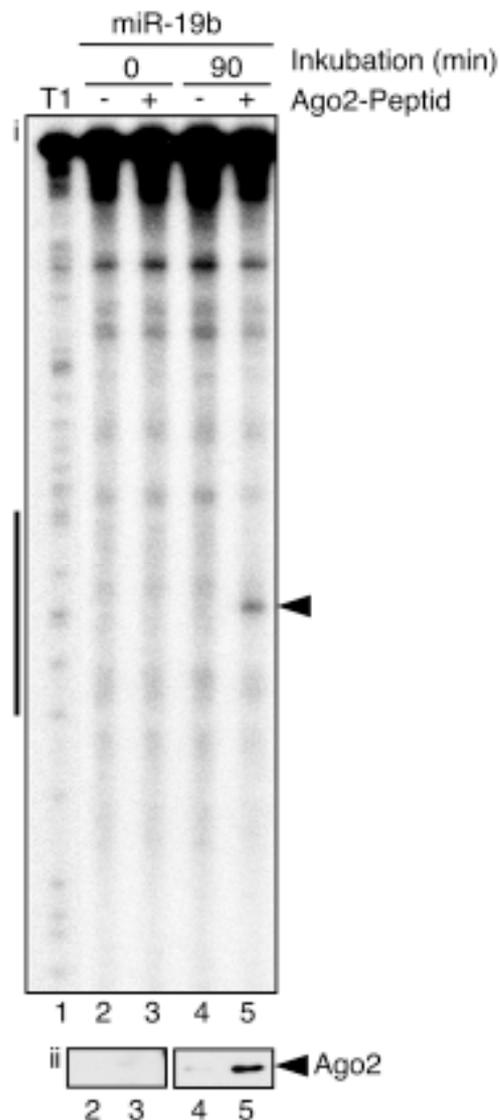
**Abbildung 4.11**

**Einfluss des pH-Wertes auf die peptid-induzierte Elution von antikörpergebundenem Ago2-Protein**

FH-Ago2 überexprimiert in HEK 293 Zellen wurde mit  $\alpha$ -Ago2-Antikörper aus dem Zelllysate immunopräzipitiert und anschließend parallel bei pH 7,0 (oben), pH 7,5 (Mitte) oder pH 8,0 mit Ago2-Peptid für 90 Minuten bei 25°C inkubiert. Zu Beginn (Spur 1) und Ende der Inkubation (Spur 2) wurden der flüssigen Phase Proben entnommen. Nach der spezifischen Elution wurde die IP-Matrix mit Säure denaturierend behandelt (Spur 4). Die Analyse erfolgte via  $\alpha$ -HA-Western-Blot.

Das Schlüsselexperiment bei der peptidinduzierten Ago2-Elution ist der Nachweise der Funktionalität des freigesetzten Proteins. Funktionales Ago2-Protein ist mit kleinen RNAs beladen und endonukleolytisch aktiv. Um das zu überprüfen, wurden *in vitro* RISC-Assays durchgeführt (Abb. 2.3). Endogenes Ago2-Protein wurde dazu mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper immunopräzipitiert und schließlich für 90 Minuten bei 25°C mit bzw. ohne Ago2-Peptid inkubiert. Proben wurden zu Beginn und Ende der Kompetition aus allen Ansätzen entnommen und schließlich im *in vitro* RISC-Assays sowie via Western-Blot auf aktives Ago2-Protein hin untersucht (Abbildung 4.12). Die eingesetzte *target*-RNA verfügte über eine perfekt komplementäre Bindungsstelle für miR-19b. Tatsächlich konnte nach 90 Minuten Inkubation mit dem Peptid RISC-Aktivität beobachtet werden (Abb. 4.12 i, Spur 5), nicht aber mit der Probe, bei der kein Peptid zugegeben worden war (Abb. 4.12 i, Spur 3). Dieses Ergebnis ging konform mit der Western-Blotanalyse, die eine signifikante Ago2-Menge nur in jener Probe belegte (Abb. 4.12 ii, Spur 5). Damit ist erwiesen, dass Ago2 im Zuge der RISC-Aufreinigung sowohl mit miRNA beladen als auch enzymatisch aktiv bleibt.

Das zur Peptidelution von immunopräzipitiertem endogenem Ago2-Protein entwickelte Protokoll erlaubt ergo die Rückgewinnung von nativem, gereinigtem und funktionalem RISC aus dem  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat und öffnet damit die Tür zu weiteren viel versprechenden Studien von RISC, wie beispielsweise kinetischen Betrachtungen.

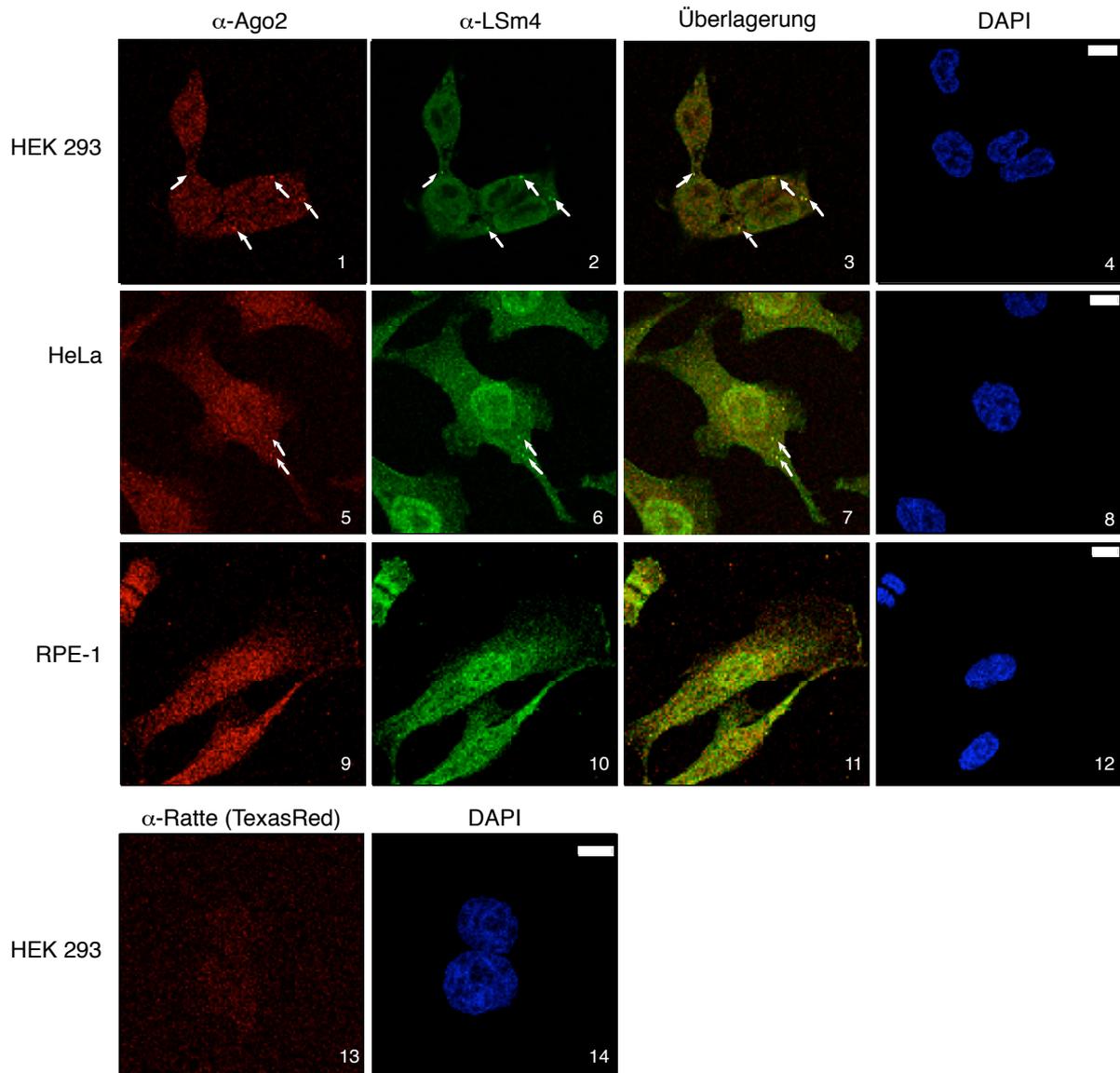
**Abbildung 4.12****Reinigung von nativem RISC durch peptidinduzierte Elution von immuno-präzipitiertem Ago2-Protein**

Endogenes Ago2-Protein wurde mit monoklonalem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper immunopräzipitiert und anschließend wie angegeben mit (Spur 3 und 5) und ohne (Spur 2 und 4) Ago2-Peptid inkubiert. Zu Beginn und Ende der Competition wurden Proben für den *in vitro* RISC-Assays (i) und die  $\alpha$ -Ago2-Western-Blotanalyse (ii) entnommen. Die 5'-<sup>32</sup>P-markierte *target*-RNA des *in vitro* RISC-Assays enthält eine perfekt komplementäre Bindungsstelle für miR-19b. Spur 1 zeigt den partiellen RNase T1-Verdau des RNA-Substrates. Das RISC-spezifische Spaltprodukt ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

**4.1.2.4 Eignung des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers für Immunfluoreszenzversuche**

Nachdem die Anwendbarkeit und hohe Qualität des monoklonalen  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers für verschiedene *in vitro*-Anwendungen nachgewiesen werden konnte, interessierte uns abschließend, ob er auch *in situ*, bei der immunfluoreszenz-basierten Untersuchung fixierter Zellen eingesetzt werden könnte. Für die Immunfluoreszenzversuche wurden fixierte HEK 293, HeLa und RPE-1 Zellen mit dem generierten  $\alpha$ -Ago2- und  $\alpha$ -LSm4-Antikörper behandelt. LSm4 ist ein Vertreter der LSm-Proteine und sowohl Bestandteil des nukleären LSm2-8-Rings, der zum Spleißosom gehört, als auch des zytoplasmatischen LSm1-7-Rings, der im Zusammenhang mit mRNA-Abbau steht. LSm4 lokalisiert daher neben anderen

mRNA-Abbaufaktoren in mRNA *processing bodies* (PBs; Abschnitt 2.6.2) und fungiert im Experiment als PB-Markerprotein. Die Färbung erfolgte indirekt durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper.



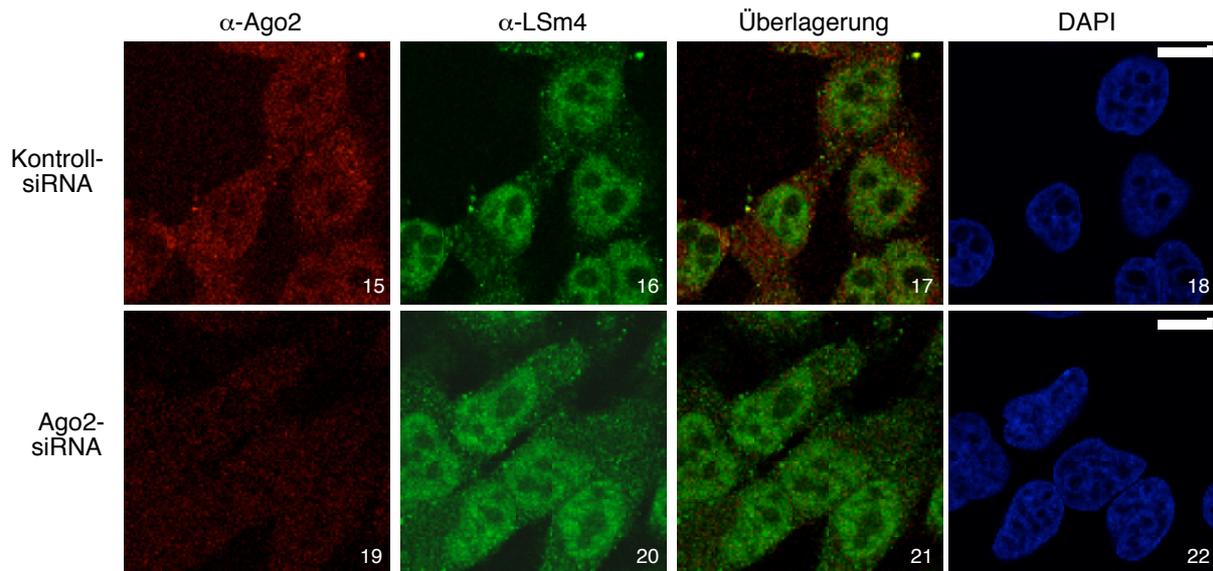
**Abbildung 4.13**

**Anwendung des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers im Immunfluoreszenzexperiment**

HEK 293 (Box 1-4 und 13-14), HeLa (Box 5-8) und RPE-1 (Box 9-12) Zellen wurden fixiert, mit den Primärantikörpern gegen endogenes Ago2- und LSm4-Protein und anschließend mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte an einem konfokalen *laser scanning*-Mikroskop. Box 13 und 14 repräsentieren den Kontrollansatz, bei dem der Primärantikörper ausgespart wurde. DNA wurde mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht (Box 4, 8, 12, 14). Die Ergebnisse der Ago2- und LSm4-Färbung wurden nachträglich übereinandergelegt (Box 3, 7, 11). Die Pfeile verweisen auf PBs mit Ago2-Protein. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

Abbildung 4.13 zeigt die Aufnahmen, die an einem konfokalen *laser-scanning*-Mikroskop entstanden sind. Für den  $\alpha$ -Ago2-Antikörper ergibt sich in allen drei Zelllinien ein Muster, demnach das endogene Ago2-Protein gleichmäßig zwischen Kern und Zytoplasma verteilt ist (Abb. 4.13, Box 1, 5, 9). Vereinzelt sind größere granuläre Strukturen erkennbar (Box 1 und 5, Pfeile). Die Co-Lokalisierung von LSM4 in diesen Strukturen spricht dafür, dass es sich hierbei um zytoplasmatische PBs handelt (Box 3 und 7). Das Signal des mit rotem Fluoreszenzmarker gekoppelten sekundären Antikörpers für die Ago2-Detektion ist insgesamt schwach, aber spezifisch. Das beweist die praktische Abwesenheit eines Signals im Kontrollansatz, bei dem auf den Primärantikörper verzichtet wurde (Abb. 4.13, Box 13).

Erstaunlicherweise lässt sich mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper nicht nur für das Zytoplasma, sondern ebenso für den Kern ein klares Signal detektieren. Da die  $\alpha$ -Ago2-Western-Blotanalyse humaner Kernextrakte (Abb. 4.4 A) und die massenspektrometrische Analyse des  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitates (Abb. 4.8) eine Kreuzreaktivität des Antikörpers unter anderem mit dem nukleären Faktor SMRC1 (Abb. 4.8 C) nahe legen, besteht die Möglichkeit, dass das hier detektierte Kernsignal auf einer Kreuzreaktivität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers basiert. Aus diesem Grund wurde der Versuch in Kombination mit einer Ago2 Depletion durch siRNAs (*Ago2-knock-down*; Meister *et al.*, 2005) wiederholt. Nur bei den unbehandelten HeLa Zellen konnte mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper erneut das gleichmäßige Signal in Zytoplasma und Nukleus beobachtet werden, nicht aber bei den Ago2-depletierten Zellen (Abb. 4.14, Box 15 und 19). Demzufolge gehen die mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper (11A9) detektierten Fluoreszenzsignale auf endogenes Ago2-Protein zurück, das zum Teil tatsächlich im Kern lokalisiert zu sein scheint. Kreuzreaktivitäten des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers spielen bei Immunofluoreszenzversuchen keine signifikante Rolle.



**Abbildung 4.14**

**Beweis der Ago2-Spezifität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers in Immunfluoreszenzexperimenten**

HeLa Zellen wurden mit einer gegen Ago2 gerichteten (Box 19-22) oder mit einer Kontroll-siRNA (Box 15-18) transfiziert, schließlich fixiert und mit  $\alpha$ -Ago2- und  $\alpha$ -LSm4-Antikörpern sowie den dazugehörigen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern inkubiert. Das Ergebnis wurde an einem konfokalen *laser scanning*-Mikroskop aufgenommen. DNA wurde mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht (Box 18, 22). Die Ergebnisse der Ago2- und LSm4-Färbung wurden nachträglich übereinander gelegt (Box 17, 21). Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

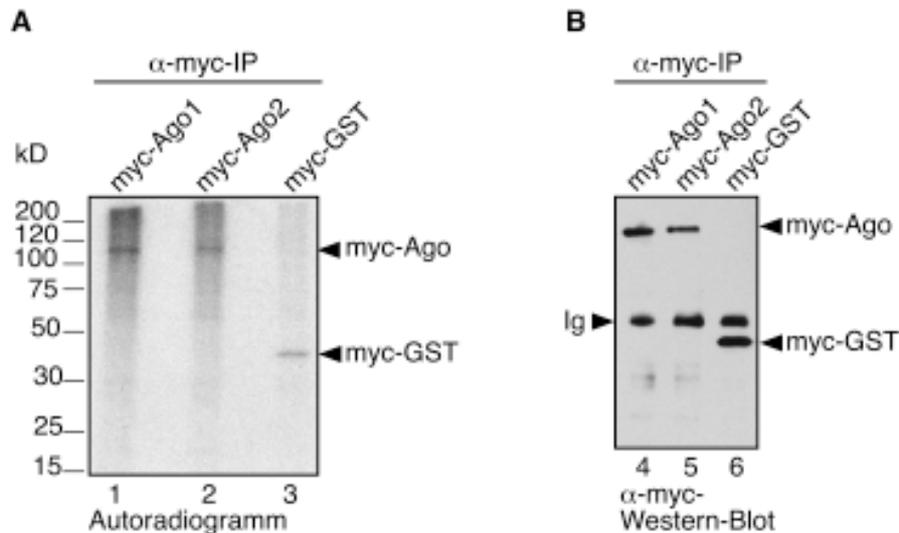
Die Vorarbeiten zur Untersuchung posttranslationaler Modifikationen humaner Argonaute-Proteine brachten neben einem Set klonierungskompatibler Vektoren vor allem einen sehr spezifischen und effizienten monoklonalen Antikörper gegen humanes Ago2-Protein hervor. Dieser ist für ein breites Spektrum antikörperbasierter Anwendungen wie Western-Blotanalysen, Immunopräzipitationen und Immunfluoreszenzexperimente geeignet. Die Anwendung des Antikörpers interferiert mit keiner der bekannten Funktionen von Ago2. Sowohl miRNA-Bindung, Endonukleaseaktivität und *de novo* RISC-Assemblierung konnten nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde ein Protokoll etabliert, das die Aufreinigung von nativem humanem RISC aus Zelllysaten erlaubt. Die Ergebnisse dieser umfangreichen  $\alpha$ -Ago2-Antikörpercharakterisierung wurden veröffentlicht (Rüdel *et al.*, 2008).

## 4.2 Posttranslationale Modifikation von Argonaute-Proteinen in Säugerzellen

Die vier humanen Vertreter der Ago-Unterfamilie sind in ihrer Primärsequenz zu  $\frac{3}{4}$  identisch (Carmell *et al.*, 2002). Dennoch konnte bislang nur Ago2 mit der Entdeckung seiner endonukleolytischen Aktivität im Zusammenhang der RNA Interferenz (RNAi) eine spezifische Funktion zugeordnet werden (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004). Die das katalytisch aktive Zentrum bildenden Aminosäureseitenketten sind zu 100% in Ago3 konserviert (Abb. 2.2). Dennoch weist dieses Protein im physiologischen Milieu keine RISC-Aktivität auf (Abschnitt 2.4.4). Posttranslationale Modifikationen stellen eine Möglichkeit der Regulation *in vivo* dar. Sie beeinflussen die Aktivität, die Interaktionseigenschaften oder die räumliche Verteilung der betroffenen Proteine. Dabei werden Aminosäureseitenketten enzymatisch mit chemischen Gruppen wie Phosphoryl-, Methylgruppen oder auch mit kleinen Proteinen wie Ubiquitin versehen. Ob derartige Regulationsmechanismen auch bei Ago-Proteinen auftreten - und falls ja, welche - sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

### 4.2.1 Identifizierung der Phosphorylierung humaner Argonaute-Proteine

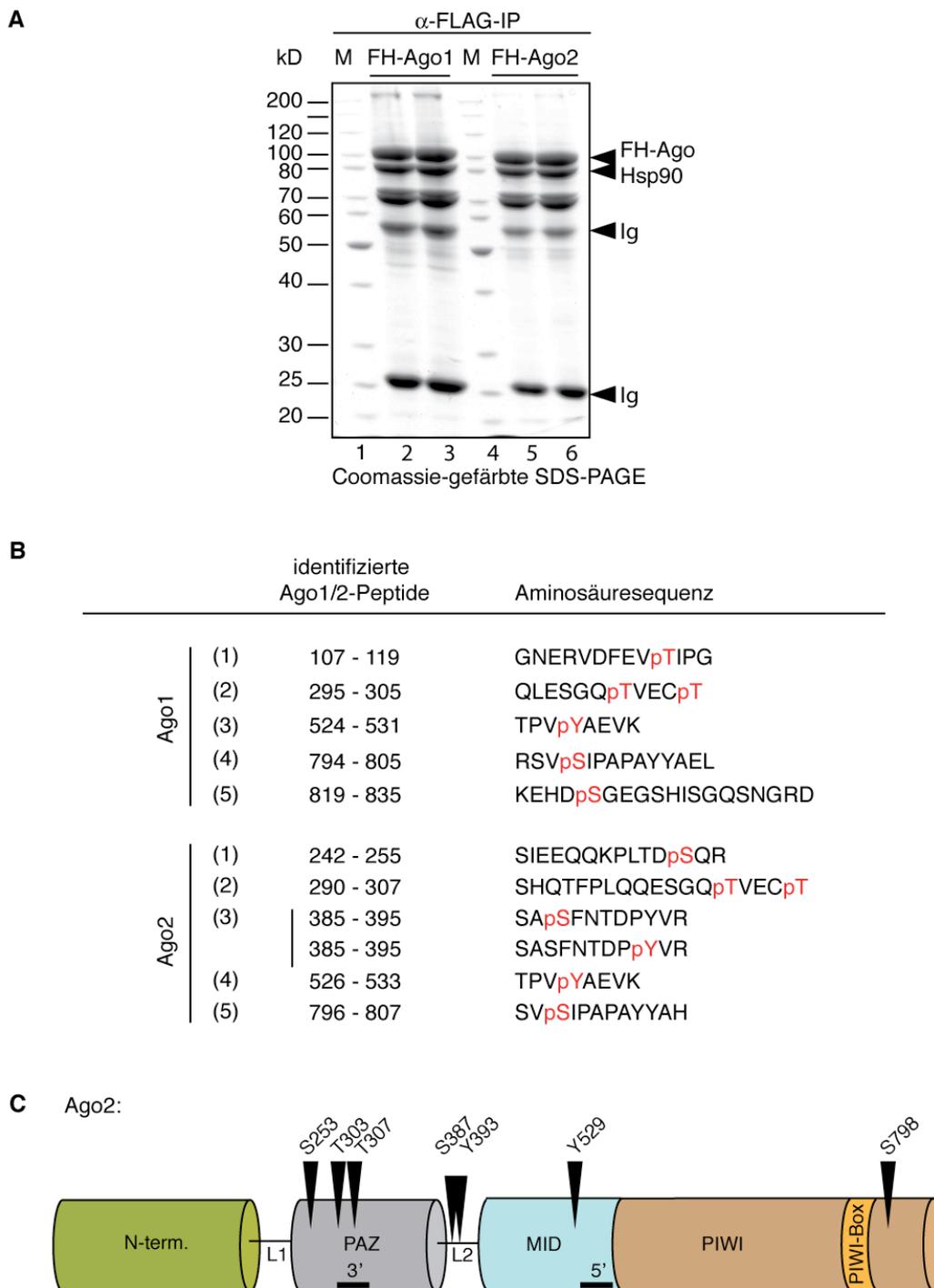
Eine bekannte posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Phosphorylierung. In radioaktiven Markierungsversuchen wurde der Frage nachgegangen, ob auch humane Ago-Proteine *in vivo* phosphoryliert werden. Dazu wurden myc-Fusionsproteine in HEK 293 Zellen überexprimiert und die Zellen vier Stunden vor der Ernte in Gegenwart von radioaktivem  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat kultiviert. Die Zellyse und anschließende  $\alpha$ -myc-Immunopräzipitation ( $\alpha$ -myc-IP) wurde in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren durchgeführt. Die Immunopräzipitate wurden mit Proteinprobenpuffer versetzt und via SDS-PAGE aufgetrennt. Das Autoradiogramm des Proteingelees belegt, dass die myc-Fusionsproteine tatsächlich radioaktiv markiert worden sind (Abb. 4.15).



**Abbildung 4.15**  
**Radioaktiver Nachweis der Ago-Phosphorylierung mit myc-Fusionsproteinen**  
*in vivo*

Myc-Ago1 (Spur 1 und 4), -Ago2 (Spur 2 und 5) und -GST (Spur 3 und 6) wurden in HEK 293 Zellen überexprimiert und die Zellen vier Stunden vor der Lysatpräparation in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat kultiviert. Die Proteine wurden schließlich mit  $\alpha$ -myc-Antikörper immunopräzipitiert. (A) Analyse des Immunopräzipitates mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie. (B) Analyse des Immunopräzipitates mittels  $\alpha$ -myc-Western-Blot. „Ig“ bezeichnet die schweren Ketten der Immunglobuline.

Es wurde auch für myc-GST ein Signal detektiert (Abb. 4.15, Spur 3). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass allein das myc-Peptid phosphoryliert wurde. Aus diesem Grund wurden Ago1 und Ago2 massenspektrometrisch untersucht. Die Methode erlaubt zugleich die Identifizierung der modifizierten Aminosäuren. Dazu wurden FLAG-HA-(FH-)Ago1 und FH-Ago2 in HEK 293 Zellen exprimiert und die Zellen in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren lysiert. Die immunopräzipitierten Fusionsproteine wurden via SDS-PAGE aufgetrennt, die mit Coomassie angefärbten Banden von FH-Ago1 und FH-Ago2 ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse aufbereitet, die in Zusammenarbeit mit Roman Körner (MPIB, Martinsried) erfolgte.

**Abbildung 4.16****Massenspektrometrische Identifizierung phosphorylierter Aminosäureseitenketten von Ago1 und Ago2**

(A) Die in HEK 293 Zellen überexprimierten und mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunpräzipitierten Fusionsproteine FH-Ago1 (Spur 2 und 3) und -Ago2 (Spur 5 und 6) wurden nach der SDS-PAGE mit Coomassie angefärbt. „Ig“ bezeichnet die schweren Ketten der Immunglobuline, „M“ kennzeichnet den Größenstandard (Spur 1 und 4). (B) Auflistung der massenspektrometrisch identifizierten Phosphopeptide von FH-Ago1 und -Ago2. Phosphorylierte Aminosäuren sind rot wiedergegeben. (C) Schematische Darstellung der Phosphorylierungsstellen von Ago2. Abkürzungen: N-term, N-Terminus; mid, Mitteldomäne; L, Verbindung (engl.: linker); PAZ und PIWI, PAZ- und PIWI-Domäne. Die Nummerierung der Aminosäuren in (A) und (B) erfolgte gemäß den NCBI-Datenbankeinträgen NP\_036331 (*Homo sapiens* Ago1) und NP\_036286 (*Homo sapiens* Ago2).

Das Ergebnis der Massenspektrometrie bestätigte, dass sowohl Ago1 als auch Ago2 *in vivo* phosphoryliert werden können (Abb. 4.16 A und B). Von dieser Modifikation betroffen sind vor allem Serin-, aber auch Threonin- und Tyrosinseitenketten. Dabei stimmen vier der nachgewiesenen sechs Ago1- bzw. der sieben Ago2-Phosphorylierungsstellen miteinander überein (Abb. 4.16 B). Phosphorylierte Aminosäureseitenketten treten vermehrt in der PAZ-Domäne und dem zweiten Domänen-verbindenden Sequenzabschnitt L2 auf. Jeweils eine Phosphorylierungsstelle konnte in der MID- und PIWI-Domäne nachgewiesen werden (Abb. 4.16 C). Ein Vergleich der Primärsequenzen der humanen Argonaute-Proteine untereinander als auch mit Vertretern anderer Spezies offenbarte, dass die phosphorylierten Aminosäuren weitgehend konserviert sind. Die zwei in der MID- und PIWI-Domäne - Y529 und S798 - sogar zu 100% (Abb. 4.17). Das lässt spekulieren, dass es sich bei den identifizierten Phosphorylierungen möglicherweise um einen allgemeingültigen Regulationsmechanismus von Argonaute-Proteinen handeln könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Serin-, Threonin- sowie Tyrosinseitenketten von FH-Ago1 und -Ago2 *in vivo* phosphoryliert werden können und die modifizierten Aminosäuren dabei einen zum Teil bemerkenswert hohen Konservierungsgrad aufweisen.

<b>hsAgo2</b>	<b>NP_036286</b>	<b>242.....255</b>	<b>290.....307</b>	
<b>hsAgo2</b>	<b>NP_036286</b>	<b>SIEEQKPLTDSQR</b>	<b>SHQTFPLQESGQTVECT</b>	
hsAgo1	NP_036331	NIDEQPKPLTDSQR	SHQTFPLQESGQTVECT	
hsAgo3	NP_079128	NIDEQPRPLTDSHR	SHQTFPLQLENGQTVERT	
hsAgo4	NP_060099	NINEQTKPLTDSQR	SHQTFPLQLENGQAMECT	
Hili	NP_001129193	AIYQONK---EHPQ	PKDSFTMSDGK---EIT	
Hiwi	NP_004755	HQTEEHK----FQ	PKSTFKKADGS---EVS	
Hiwi2	NP_689644	----QRTGLS----	PTHTF---QKRDG-TEIT	
mmAgo2	NP_694818	SIEEQKPLTDSQR	SHQTFPLQESGQTVECT	
rnAgo2	NP_067608	SIEEQKPLTDSQR	SHQTFPLQESGQTVECT	
dmAgo1	NP_725342	DINEQRKPLTDSQR	QMOSFPLQLENGQTVECT	
dmAgo2	NP_648775	AKINNTTNLDYSRR	SSETF---EHDGKKV--T	
ceAlg2	NP_871992	ALAE-RRALSDAQR	QTQTFPLQLETGTIECT	
spAgo	NP_587782	NVRD----LTRFDL	S-DSFFVRLNGBEQKIS	
atAgo1	NP_849784	S-----RPLSDADR	RELTFPVDERNTQK---S	
<b>hsAgo2</b>	<b>NP_036286</b>	<b>385.....395</b>	<b>526....533</b>	<b>796.....807</b>
<b>hsAgo2</b>	<b>NP_036286</b>	<b>SASFNT--DPYVR</b>	<b>TP-VYAE-VK</b>	<b>SVSIPAPAYYAH</b>
hsAgo1	NP_036331	NASYNL--DPYIQ	TP-VYAE-VK	SVSIPAPAYYAR
hsAgo3	NP_079128	SANYET--DPFVQ	TP-VYAE-VK	SVSIPAPAYYAH
hsAgo4	NP_060099	SNSMVGPPDPYLK	TP-VYAE-VK	SVSIPAPAYYAR
Hili	NP_001129193	-----	DD-LYGA-IK	TIRVPAPCKYAH
Hiwi	NP_004755	HKNDNV--QREL	KD-KYDA-IK	VIRVPAPCQYAH
Hiwi2	NP_689644	NARFEL--ETWGL	QK-TYYDSIK	IVSVPAPCQYAH
mmAgo2	NP_694818	SASFNT--DPYVR	TP-VYAE-VK	SVSIPAPAYYAH
rnAgo2	NP_067608	SASFNT--DPYVR	TP-VYAE-VK	SVSIPAPAYYAH
dmAgo1	NP_725342	RADFNN--DSYVQ	TP-VYAE-VK	SVSIPAPAYYAH
dmAgo2	NP_648775	YFQHNL--DPTIS	RI-SYDT-IK	SVSYPAPAYLAH
ceAlg2	NP_871992	KAELSA--DPFAH	TP-IYAE-VK	SVSIPAPAYYAH
spAgo	NP_587782	QMDWDT--DPYLT	SPEPYGS-IK	AVSLVPPVYYAH
atAgo1	NP_849784	LN DYAK--DN YAQ	NGSL YGD-LK	SVSIVPPAYYAH

Abbildung 4.17

#### Konserviertheitsgrad der phosphorylierten Aminosäuren zwischen hsAgo2 und weiteren Vertretern der Argonaute-Proteinfamilie

Die sieben massenspektrometrisch identifizierten FH-Ago2-Phosphopeptide wurden korrespondierenden Sequenzen der übrigen humanen Ago- und PIWI-Proteine sowie denen von Argonaute-Proteinen anderer Spezies gegenübergestellt. Die phosphorylierten Aminosäuren sind rot wiedergegeben. Die Datenbankeinträge der zugrunde gelegten Primärsequenzen sind in Form ihrer NCBI\_Identifikationsnummer angegeben. Abk.: hs, *Homo sapiens*; mm, *Mus musculus*; rn, *Rattus norvegicus*; dm, *Drosophila melanogaster*; ce, *Caenorhabditis elegans*; sp, *Schizosaccharomyces pombe*; at, *Arabidopsis thaliana*.

#### 4.2.2 Erste Untersuchungen zur Ago-Phosphorylierung anhand von Ago2-Mutanten

Bislang ist Ago2 das am umfassendsten charakterisierte humane Ago-Protein. Nicht zuletzt aufgrund seiner Endonukleaseaktivität ist es zudem verschiedenen funktionalen Analysen gut zugänglich. Aus diesem Grund beschränkten wir uns in der Erforschung der Phosphorylierung vorerst auf Ago2.

In einem ersten Ansatz wurden verschiedene Ago2-Punktmutanten generiert (Abb. 4.18). Phosphoserin wurde durch Austausch des jeweiligen Serins gegen Glutaminsäure (E) nachgeahmt. Umgekehrt wurde die Serinphosphorylierung durch einen Austausch der Aminosäure gegen Alanin (A) unterbunden. Die phosphorylierten Threonine T303 und T307 wurden ausschließlich durch Valin (V) substituiert. Valin ähnelt Threonin strukturell; nur trägt Valin eine Methylgruppe, die nicht phosphoryliert werden kann und keine Hydroxylgruppe wie Threonin. Die Tyrosinreste Y393 und Y529 wurden unter anderem durch Phenylalanin (F) substituiert. Phenylalanin ist strukturell identisch mit Tyrosin, bis auf die fehlende para-Hydroxylgruppe am Benzolringgerüst. Eine Phosphorylierung von Phenylalanin ist daher ausgeschlossen. Y393 und Y529 wurden zudem durch Alanin ersetzt. Ein Austausch gegen Alanin verhält sich hinsichtlich der Tertiärstruktur eines Proteins häufig neutral und stellt eine klassische, häufig gewählte Substitution dar.

Dagegen existiert keine geeignete natürliche Aminosäure zur Nachahmung von Phosphotyrosin. In Annäherung wurde Glutaminsäure (E) ausgewählt. Glutaminsäure verfügt über eine relativ lange Seitenkette, an deren Ende eine negativ geladene Säurefunktion steht, ähnlich wie bei einem phosphorylierten Tyrosinrest. Glutaminsäure nimmt allerdings im Gegensatz zum Benzolring des Tyrosins keine planare sondern eine gewinkelte Konformation ein. Um mögliche Auswirkungen dieser Strukturabweichung kontrollieren zu können, wurde schließlich noch eine Glutaminmutante (Q-Mutante) etabliert. Diese nimmt ebenfalls eine gewinkelte Konformation ein, verfügt aber nicht wie Glutaminsäure über eine endständige negative Ladung. Die Aminosäureaustausche sind in Abbildung 4.18 illustriert.

AS zur Nachahmung der phosphorylierten Variante	ursprüngliche AS	AS zur Nachahmung der unphosphorylierten Variante
Glutaminsäure (E) $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COO}^- \end{array}$	Serin (S)/Phosphoserin $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{HC}-\text{OH} / \text{OPO}_3^{2-} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Alanin (A) $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	Threonin (T)/Phosphothreonin $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{OH} / \text{OPO}_3^{2-} \end{array}$	Valin (V) $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{HC}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}</math>           Glutamin (Q)         </div>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COO}^- \end{array}$ Glutaminsäure (E)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{OH} / \text{OPO}_3^{2-} \end{array}$ Tyrosin (Y)/Phosphotyrosin
		$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ Phenylalanin (F)
		$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Alanin (A)

Abbildung 4.18

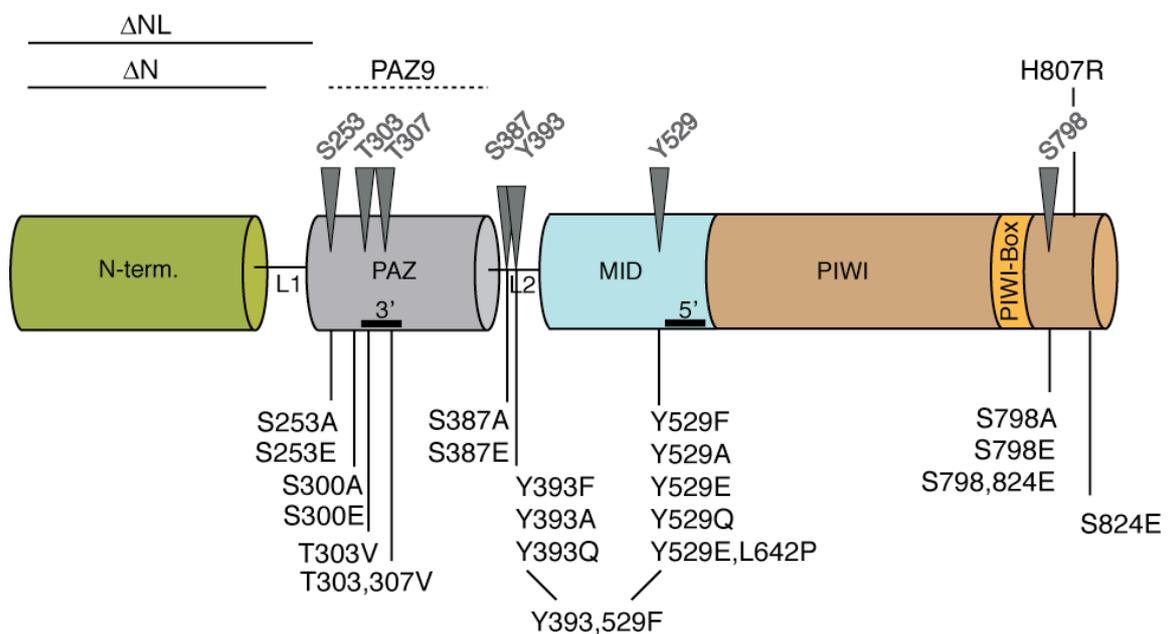
#### Graphische Darstellung der für die Generierung der Ago2-Phosphomutanten relevanten Aminosäuren

Grau unterlegt sind die als phosphoryliert identifizierte Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Ihre un- bzw. phosphorylierten Zustandsformen können durch andere natürliche Aminosäuren imitiert werden. Die zur Nachahmung der phosphorylierten Variante ausgewählten Aminosäuren sind der linken Spalte zu entnehmen, die zur Nachahmung der unphosphorylierten Variante der rechten. Glutamin dient zur Kontrolle aufgrund der großen strukturellen Divergenz von Glutaminsäure und Tyrosin und ist daher in Klammern aufgeführt. Im Zusammenhang mit der Phosphorylierung relevante chemische Gruppen sind orange, weitere strukturelle Besonderheiten grün unterlegt. Die zweidimensionalen Fischer-Projektionen der abgebildeten Aminosäuren wurden der Internetseite <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/aminosauren/prot-as.html> entnommen.

Neben den Phosphorylierungsmutanten wurden zudem die N-terminalen Deletionsmutanten Ago2- $\Delta$ N und - $\Delta$ NL erzeugt. Auch die aus der Literatur bekannten Ago2-Mutanten „PAZ9“ (Liu *et al.*, 2005 (a)) und „H807R“ (Rivas *et al.*, 2005) wurden in das Ago2-Mutanten-Set aufgenommen. Bei der PAZ9-Mutante sind verschiedene Aminosäuren in der Bindungstasche für das 3'-Ende der kleinen RNA gegen Alanin ausgetauscht. Es ist publiziert, dass das

Protein infolgedessen keine kleinen RNAs mehr binden kann und nicht länger in PBs (Abschnitt 2.6.2) zu finden ist. Jedoch interagiert es weiterhin mit GW182/TNRC6A (Liu *et al.*, 2005 (b)). Die Punktmutation „H807R“ betrifft die katalytische Triade von Ago2 und führt zu einem endonukleolytisch inaktivem Ago2-Protein (Rivas *et al.*, 2005).

Eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit generierten Ago2-Mutanten ist Abbildung 4.19 zu entnehmen.



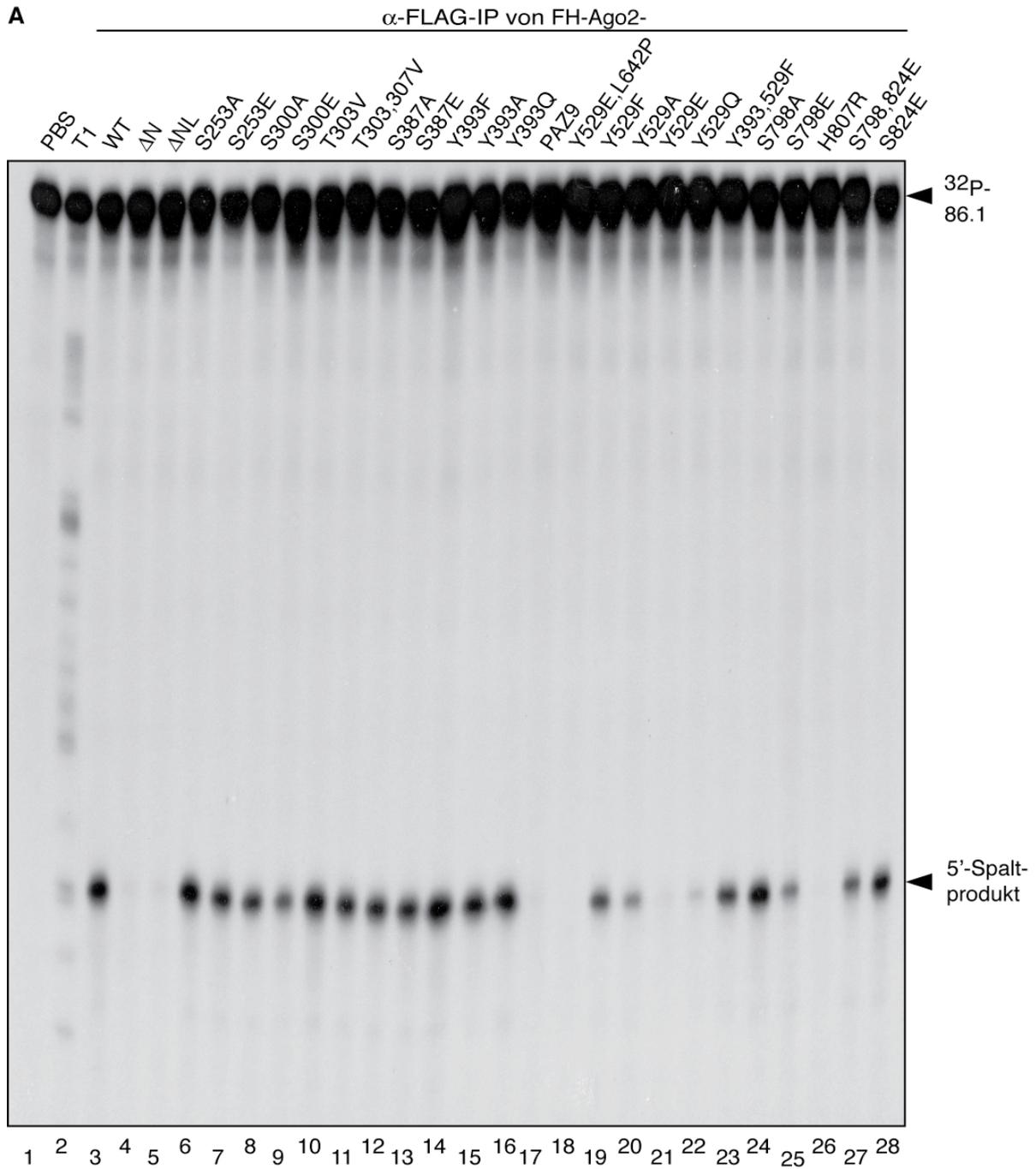
**Abbildung 4.19**  
**Schematische Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ago2-Mutanten**

Dargestellt ist die Domänenstruktur von Ago2 inklusive der identifizierten Phosphorylierungsstellen (graue Pfeile). Die davon abgeleiteten Punktmutanten sind unterhalb der Illustration aufgelistet. Darüber hinaus generierte Mutanten stehen oberhalb, wobei die von Veränderungen betroffenen Sequenzbereiche durch horizontale Linien kenntlich gemacht sind. Ago2-PAZ9 geht auf Liu *et al.*, 2005 (a) und -H807R auf Rivas *et al.*, 2005 zurück.

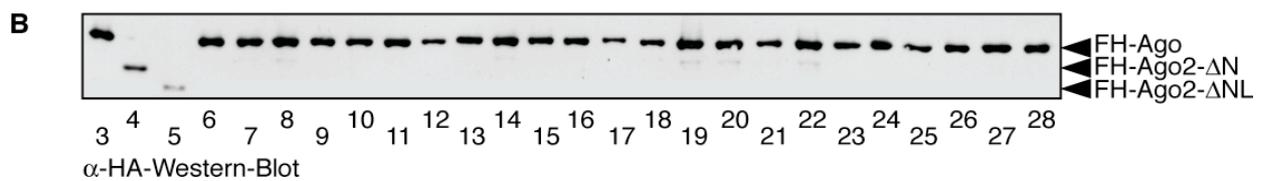
Für die erste funktionale Charakterisierung aller Ago2-Mutanten wurde ein *in vitro* RISC-Assay durchgeführt. Dieser Assay setzt nicht nur Endonukleaseaktivität, sondern auch eine funktionale *target*-RNA-Interaktion und miRNA-Bindung seitens der Mutante voraus. Er erlaubt daher mehrere Ago2-Eigenschaften zugleich zu adressieren.

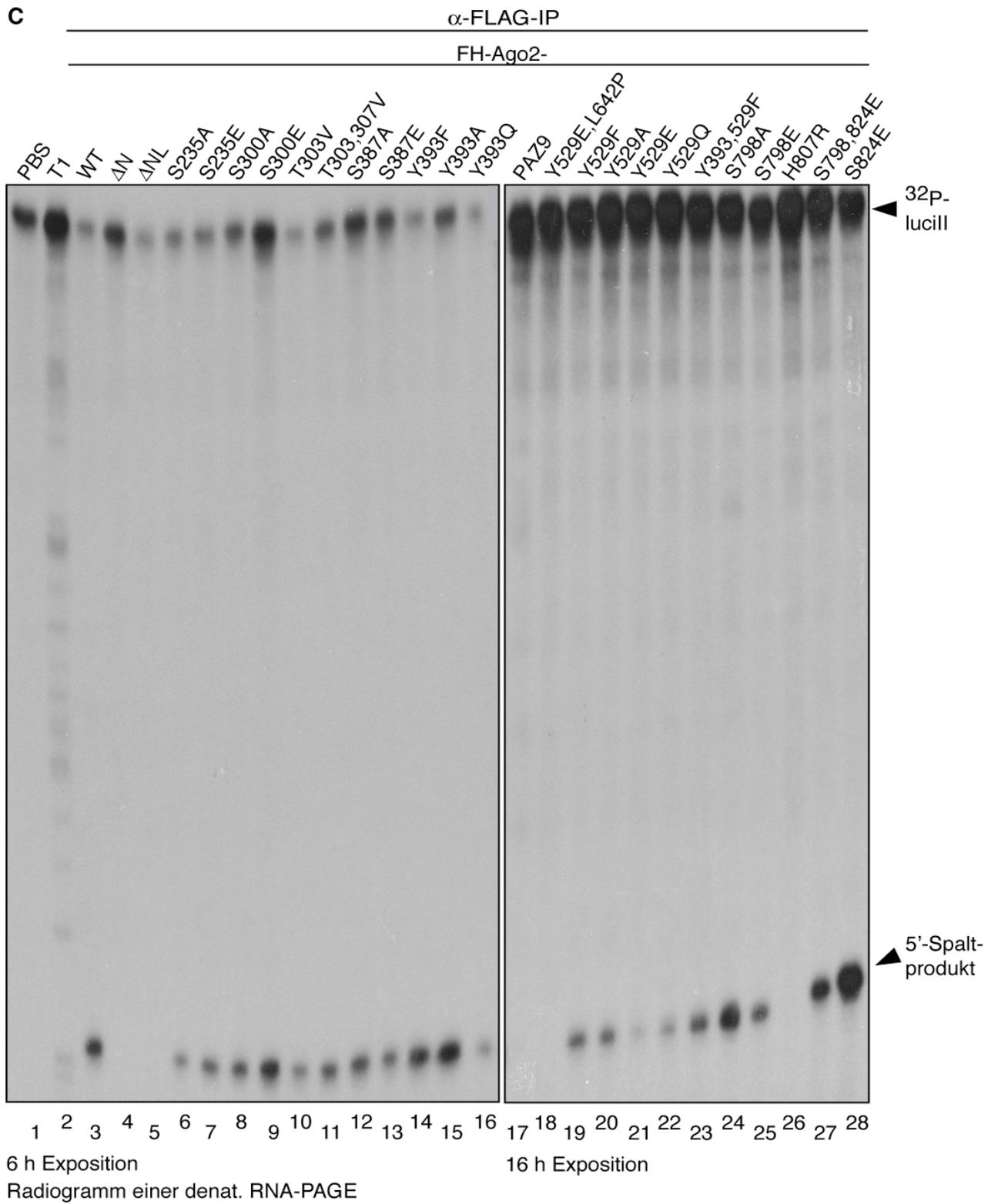
Die in HEK 293 Zellen überexprimierten FH-Konstrukte der Ago2-Mutanten wurden mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitiert und die Präzipitate anschließend gedrittelt. Ein Drittel wurde zur Dokumentation der Proteinmenge mittels  $\alpha$ -HA-Western-Blot eingesetzt (Abb. 4.20 B). Ein weiteres Drittel wurde für den *in vitro* RISC-Assay mit der *target*-RNA für miR-19b verwendet (Abb. 4.20 A) und das übrige Drittel jeder Probe wurde vor Zugabe der komplementären *target*-RNA *in vitro* mit der kleinen, einzelsträngigen RNA 21.27 beladen (Abb., 2.3 B; Abb. 4.20 C).

Im Experiment mit der miR-19b-*target*-RNA zeigte sich die Mehrheit der Ago2-Mutanten in ihrer Endonukleasefunktion intakt und war nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Das galt vor allem für Aminosäureaustausche in der N-terminalen Hälfte des Proteins (Abb. 4.20 A, Spuren 6-16). Allerdings führte die Deletion von 170 und mehr Aminosäuren am N-Terminus von Ago2 (Mutante Ago2- $\Delta$ N und- $\Delta$ NL) zum Verlust der *slicer*-Aktivität (Abb. 4.20 A, Spur 4 und 5). Auch für die Mutante Ago2-Y529E ließ sich kein spezifisches Spaltprodukt detektieren (Abb. 4.20 A, Spur 18 und 21), obgleich die eingesetzte Proteinmenge durchaus vergleichbar ist mit der von enzymatisch aktiven Mutanten (Abb. 4.20 B, vgl. Spur 12 für aktives Ago2-S387A mit Spur 18 für inaktives Ago2-Y529E). Der Austausch von Tyrosin-529 gegen Phenylalanin (F) hatte dagegen keine Auswirkung auf die Endonukleaseaktivität (Abb. 4.20 A, Spur 19). Auch das Einbringen eines Alaninrestes an Position 529 führte nur zu einer graduellen Verminderung der *slicer*-Aktivität (Abb. 4.20 A, Spur 20). Interessanterweise war selbst für Ago2-Y529Q eine höhere Katalyseleistung als für Ago2-Y529E zu beobachten (Abb. 4.20 A, Spur 22), trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit der eingebrachten Aminosäuren (Abb. 4.18). Schließlich wirkte sich auch die Mutation von Serin-798 auf die *slicer*-Aktivität aus: Während Ago2-S798A sich wie das Wildtyp-Protein verhielt, ließ sich für Ago2-S798E eine verminderte Enzymaktivität verzeichnen (Abb. 4.20 A, Spur 24, 25 und 27). Die publizierten Mutanten Ago2-PAZ9 und Ago2-H807R, die die Hydrolyse der *target*-RNA nachweislich nicht katalysieren (Liu *et al.*, 2005 (a)); Rivas *et al.*, 2005), dienten als Negativkontrolle.



Radiogramm einer denat. RNA-PAGE





**Abbildung 4.20****Verschiedene Punktmutationen vermindern die Endonukleaseaktivität von Ago2**

Die FH-Fusionskonstrukte der verschiedenen Ago2-Mutanten wurden in HEK 293 Zellen überexprimiert und mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden gedrittelt und in *in vitro* RISC-Experimenten eingesetzt (A und C) bzw. der Western-Blotanalyse zugeführt (B). WT steht für Wildtyp.

(A) Den Proben wurde die  $^{32}\text{P}$ -Cap-markierte *target*-RNA 86.1 zugesetzt, die eine perfekt komplementäre Sequenz zur endogenen miR-19b trägt. Die Reaktion wurde schließlich mit Proteinase K gestoppt, die RNA isoliert und auf einem 8%igen denaturierendem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gezeigt ist das Radiogramm des getrockneten Geles. Eine Reaktion wurde mit PBS anstelle von Immunpräzipitat angesetzt und gibt die Qualität der eingesetzten *target*-RNA wieder (Spur 1). Diese wurde zudem einem partiellen RNase T1-Verdau unterzogen. Das resultierende, sequenzspezifische Bandenmuster ist in Spur 2 gezeigt (T1). Die Signale der intakten *target*-RNA sowie die der 5'-Spaltprodukte sind rechter Hand vom Radiogramm ausgewiesen. (B) Ein Drittel jedes Immunpräzipitates wurde mit Proteinprobenpuffer versetzt und via  $\alpha$ -HA-Western-Blot analysiert. Die Beladung des Geles erfolgte in der gleichen Abfolge wie in (A); zum leichteren Verständnis wurden die Spuren entsprechend dem Radiogramm aus (A) beziffert. (C) Die Proben wurden zusammen mit der kleinen RNA 21.27 inkubiert und schließlich die  $^{32}\text{P}$ -Cap-markierte *target*-RNA luci II zugesetzt, die eine perfekt komplementäre Sequenz zu 21.27 trägt. Der weitere experimentelle Ablauf entspricht dem von (A). Für die N-terminalen Mutanten (Spuren 1-16) ist das Radiogramm nach 6 Stunden Exposition gezeigt, für die übrigen das nach 16 Stunden Exposition (Spuren 17-28), so dass schwächere Signale stärker hervortreten.

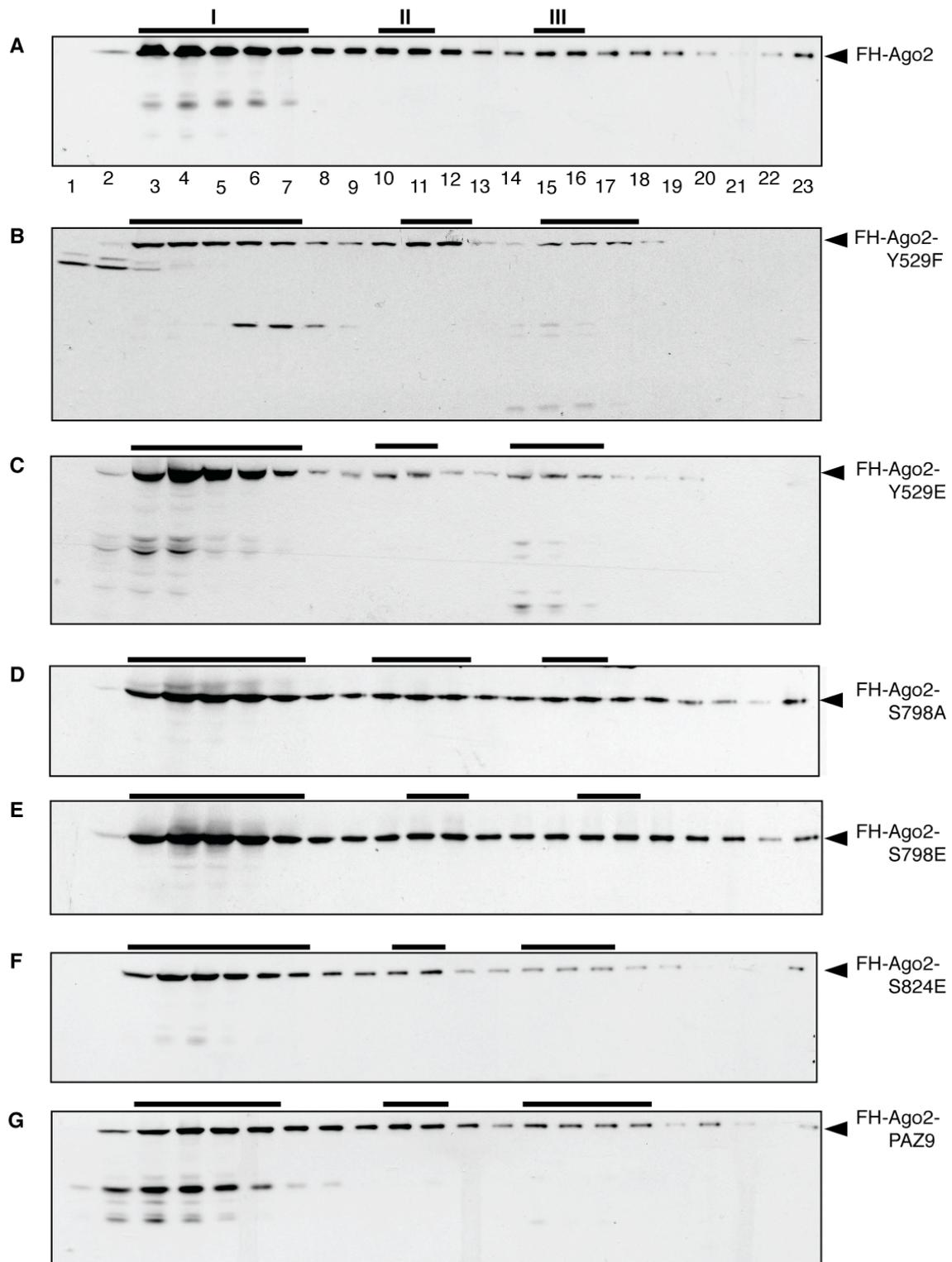
Im RISC-Experiment mit der vorangestellten Beladung der Ago2-Mutanten mit der kleinen RNA 21.27 ergab sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Mengen an zugesetzter *target*-RNA ein ähnliches Bild zu erkennen (Abb. 4.20 C). Auch hier zeigten Punktmutationen in der N-terminalen Hälfte keine Auswirkungen auf die Endonukleaseaktivität (Abb. 4.20 C, Spuren 6-16), die Deletionen des N-Terminus dagegen schon (Spur 4 und 5). Diese, wie auch die Aminosäuresubstitutionen Y529E und S798E und die Kontrollmutanten PAZ9 und H807R führten zu einer stark verminderten *slicer*-Aktivität, so dass nahezu kein Spaltprodukt zu detektieren war (Abb. 4.20 C, Spuren 4-5, 17-18, 21 und 25-27). Allerdings ist festzuhalten, dass in diesem Versuch nicht nur Ago2-Y529F, sondern auch Ago2-Y529A, keinen Unterschied zum Wildtyp-Protein erkennen lässt (Abb. 4.20 C, Spuren 19 und 20).

Von Höck *et al.* (2007) wurde das Migrationsverhalten von Ago-Proteinen in Dichtegradientenzentrifugationsexperimenten beschrieben (Abschnitt 2.5). Die Proteine treten in drei

distinkten Komplexen I, II und III auf, die sich unter anderem in ihren enzymatischen Aktivitäten unterscheiden (Höck *et al.*, 2007). Offensichtlich existieren verschiedenartige Ago-Ribonukleoprotein-Partikel (Ago-RNPs) in der Zelle, die in einem stufenlosen 15-55%-Saccharosegradienten voneinander separiert werden können. Während mit den zuvor beschriebenen *in vitro* RISC-Experimenten die enzymatischen Aktivitäten der Ago2-Mutanten untersucht wurden, erlauben solche Zentrifugationsexperimente einen Einblick in die Interaktionseigenschaften der Proteine. Daher wurden ausgewählte Ago2-Mutanten nachfolgend im Saccharosegradienten hinsichtlich ihres Migrationverhaltens untersucht. HEK 293 Zellen wurden dazu mit den FH-Konstrukten von Ago2, den Mutanten Y529F und Y529E, sowie S798A, S798E und S824E, als auch PAZ9 transfiziert. Die Totallysate wurden im stufenlosen 15-55%-Saccharosegradienten aufgetrennt, der anschließend in 23 Fraktionen von oben beginnend zerlegt wurde. Gleiche Volumina aller Fraktionen wurden im  $\alpha$ -HA-Western-Blot auf die Anwesenheit der Ago2-Mutanten untersucht (Abb. 4.21).

Es zeigte sich, dass alle Mutanten wie das Wildtypprotein in den drei Komplexen I, II und III migrieren. Allerdings war mit FH-S798A und -S798E die Abgrenzung der RNA-Protein-Komplexe II und III nur schwach ausgeprägt (Abb. 4.21 D, E). Wie im *in vitro* RISC-Assay verhielten sich FH-Ago2-Y529E und die PAZ9-Mutante auch im Saccharosegradienten ähnlich. In beiden Fällen schien der relative Anteil der in Komplex I migrierenden Proteine im Vergleich zum Wildtypprotein erhöht, wenn man bei Ago2-PAZ9 die aufgetretene partielle Proteolyse mitberücksichtigt (Abb. 4.21, C und G).

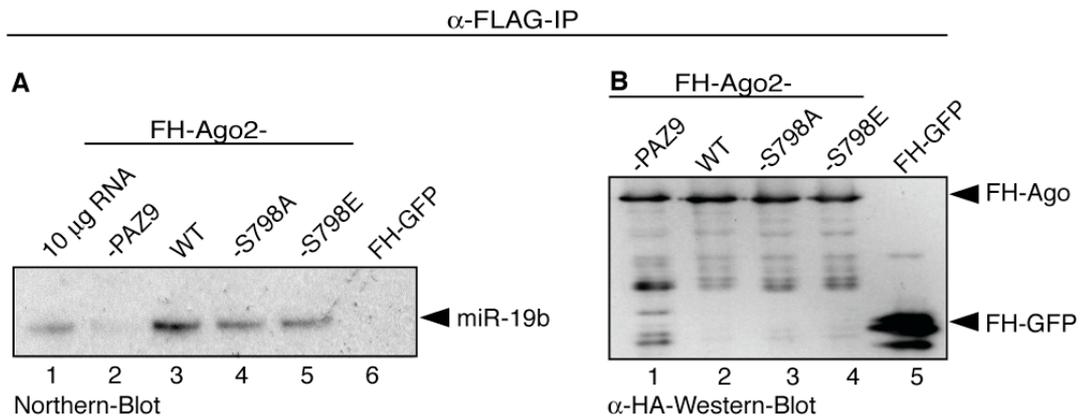
Es ist festzuhalten, dass sich keine gravierenden Unterschiede zwischen Wildtyp Ago2 und den Phosphoserinmutanten in Dichtezentrifugationsexperimenten detektieren ließen. Das deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von S798 und S824 keine Auswirkungen auf die Ago2-Interaktionseigenschaften hat. Die Y529-Phosphorylierung bedingt dagegen möglicherweise eine verminderte Ago2-RNP-Assemblierung.



**Abbildung 4.21**

**Nicht alle Ago2-Mutanten migrieren im Dichtegradienten wie das Wildtypprotein** FH-Ago2 (A), -Y529F (B), -Y529E (C), -S798A (D), -S798E (E), -S824E (F) und -PAZ9 (G) wurden in HEK 293 Zellen überexprimiert. Die Gesamtzelllysate wurden schließlich auf einen stufenlosen 15-55% Saccharosegradienten geladen und für 18 Stunden bei 30 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden von oben beginnend 23 Fraktionen abgetragen und gleiche Volumina davon via  $\alpha$ -HA-Western-Blot analysiert. Die RNA-Protein-Komplexe I, II und III (Höck *et al.*, 2007) sind durch horizontale Balken gekennzeichnet. Das untersuchte Protein ist rechter Hand jedes Western-Blots angegeben.

S798 ist mit Ausnahme von Hili und Hiwi bei allen Vertretern der humanen Argonaute-Proteine konserviert, ebenso wie bei Vertretern diverser weiterer Tier- und Pflanzenspezies (Abb. 4.17). Auch waren im *in vitro* RISC-Assay Auswirkungen des Aminosäureaustausches zu beobachten gewesen (Abb. 4.20) Daher wurde die Analyse der Mutanten Ago2-S798A und Ago2-S798E fortgesetzt. Der Aminosäurerest S798 von Ago2 lässt sich keiner funktionalen Einheit des Proteins zuordnen: Er ist weder Bestandteil des aktiven Zentrums (Liu *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2005), noch der PIWI-Box, der die Dicer-Interaktion zugeschrieben wird (Tahbaz *et al.*, 2004) oder einer der Bindungstaschen für die Enden der kleinen RNA (Ma *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2005). Da aber die Dichtezentrifugationsversuche auf intakte Interaktionseigenschaften der S798-Mutanten hindeuteten (Abb. 4.21), wurde dennoch zunächst das miRNA-Bindungsvermögen untersucht. Dafür wurden die FH-Konstrukte in HEK 293 Zellen überexprimiert und mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus den erstellten Totallysaten gereinigt. Die Hälfte jedes Immunopräzipitates wurde schließlich für die  $\alpha$ -HA-Western-Blotanalyse eingesetzt, während von der verbliebenen Probenhälfte die RNA isoliert und via Northern-Blot auf miR-19b-Präsenz untersucht wurde. Erwartungsgemäß konnte die miRNA im Immunopräzipitat des überexprimierten Wildtypproteins und in dem der S798A-Mutante nachgewiesen werden (Abb. 4.22 A, Spur 3 und 4). Bei den Negativkontrollen FH-Ago2-PAZ9 (Liu *et al.*, 2005 (a)) und FH-GFP, die beide keine miRNAs binden, war miR-19b nicht nachweisbar (Abb. 4.22 A, Spur 2 und 6). Das belegt die Spezifität der miRNA-Co-Präzipitation. Interessanterweise konnte miR-19b bei der endonukleolytisch nur eingeschränkt aktiven Glutaminsäuremutante ebenfalls detektiert werden und dazu in ähnlicher Quantität wie bei der Alaninmutante (Abb. 4.22 A, Spur 5). Offensichtlich interferiert die Mutation nicht mit der miRNA-Bindung, sondern direkt mit der *slicer*-Aktivität von Ago2.

**Abbildung 4.22****Ago2-S798A und -S798E zeigen gleiches miRNA-Bindungsverhalten**

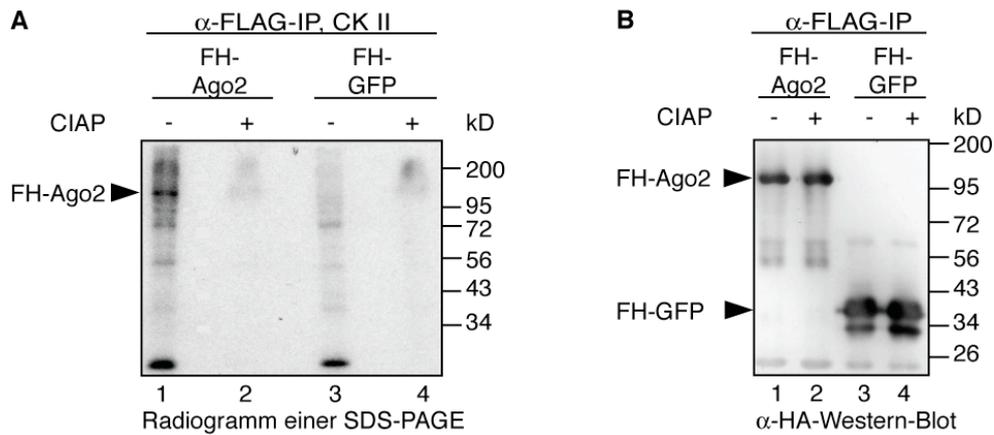
FH-Ago2, -S798A, -S798E und die Negativkontrollen FH-Ago2-PAZ9 und FH-GFP wurden in HEK 293 Zellen überexprimiert und via  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus den Zelllysaten immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden anschließend halbiert und der Northern-Blotanalyse (A) und der  $\alpha$ -HA-Western-Blotanalyse (B) zugeführt. (A) Die isolierte, co-präzipitierte RNA wurde extrahiert und für die Northern-Blotanalyse aufbereitet. Daneben wurden 10  $\mu$ g Gesamt-RNA aus HEK 293 Zellen geladen (Spur 1). Nach dem Transfer der Nukleinsäuren vom Gel auf die Membran erfolgte schließlich die miR-19b-Detektion mittels einer 5'-radioaktiv markierten DNA-Sonde. Gezeigt ist das Autoradiogramm. Das miR-19b-Signal ist ausgewiesen. (B)  $\alpha$ -HA-Western-Blotanalyse der Proben. Signale bekannter Identität sind gekennzeichnet.

### 4.2.3. Studien an Ago2 in Gegenwart verschiedener Kinasen

Neben der Analyse von Punktmutanten besteht die Möglichkeit, Auswirkungen der Ago-Phosphorylierung durch den Einsatz von Kinasen zu studieren. Ziel ist es, damit den Anteil phosphorylierten Proteins am Ago2-Gesamtpool signifikant zu erhöhen und dadurch vermeintliche Effekte der posttranslationalen Modifikation leichter zu detektieren. Ein klarer Nachteil dieses experimentellen Ansatzes ist, dass die *in vivo* für die Ago2-Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen unbekannt sind. Aus diesem Grund wurde auf kommerzielle und klonierte, transfizierbare Enzyme zurückgegriffen.

#### 4.2.3.1 Phosphorylierung von Ago2 durch Casein Kinase II

Für die forcierte Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten wurde FH-Ago2 aus HEK 293 Zellysate mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitiert und *in vitro* in Gegenwart von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-ATP mit Casein Kinase II (CK II) behandelt. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Serin- und in geringem Umfang auch von Threoninseitenketten. Als Haupterkennungsmotiv wird vom Hersteller die Sequenz **SXXD/E** angegeben. Daneben können saure Aminosäuren in den Positionen -2 bis +5 bezogen auf den zu modifizierenden Rest als Erkennungssequenz fungieren. Die Immunopräzipitate wurden nach der Inkubation mit CK II aufgeteilt. Nur eine Hälfte wurde mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (engl. *calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) behandelt. Diese enzymatische Entfernung der Phosphatgruppen sollte der Identifizierung spezifischer  $^{32}$ P-Signale im Radiogramm dienen. Schließlich wurden alle Proben sowohl einer  $\alpha$ -HA-Western-Blotanalyse als auch einer autoradiographischen Analyse unterzogen.

**Abbildung 4.23****Reversible *in vitro* Phosphorylierung von immunpräzipitiertem FH-Ago2 durch Casein Kinase II**

FH-Ago2 und FH-GFP wurden mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus HEK 293 Zelllysat immunopräzipitiert und in Gegenwart von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-ATP mit Casein Kinase II (CK II) inkubiert. Anschließend wurde eine Hälfte der Proben mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (engl. *calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) behandelt (+). Die einzelnen Proben wurden schließlich via  $\alpha$ -HA-Western-Blot (A) und Autoradiographie analysiert (B). Für letztere wurde das Proteingel getrocknet, bevor ein Film aufgelegt wurde. FH-GFP fungierte als Kontrollprotein.

FH-GFP ist zwar quantitativ überrepräsentiert, dennoch tritt eine deutliche Schwarzfärbung durch  $^{32}$ P-Phosphorylreste nur im FH-Ago2-Immunpräzipitat auf (Abb. 4.23 A und B, Spuren 1 und 3). Das belegt, dass in der Tat Ago2 und nicht das Fusionspeptid „FH-“ durch CK II phosphoryliert wurde. Die im Radiogramm neben FH-Ago2 sichtbaren Banden gehen vermutlich auf mit Ago2-co-immunopräzipitierte und ebenfalls durch CK II phosphorylierte Proteine zurück (Abb. 4.23 A, Spur 1). In Folge der CIAP-Behandlung sind nahezu keine  $^{32}$ P-Signale mehr detektierbar (Abb. 4.23 A, Spur 2 und 4). Die Phosphorylierung ist reversibel. Des Weiteren lässt sich dem Experiment entnehmen, dass die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten keinen Einfluss auf das SDS-PAGE-Migrationsverhalten von FH-Ago2 hat (Abb. 4.23 B, Spur 1 und 2).

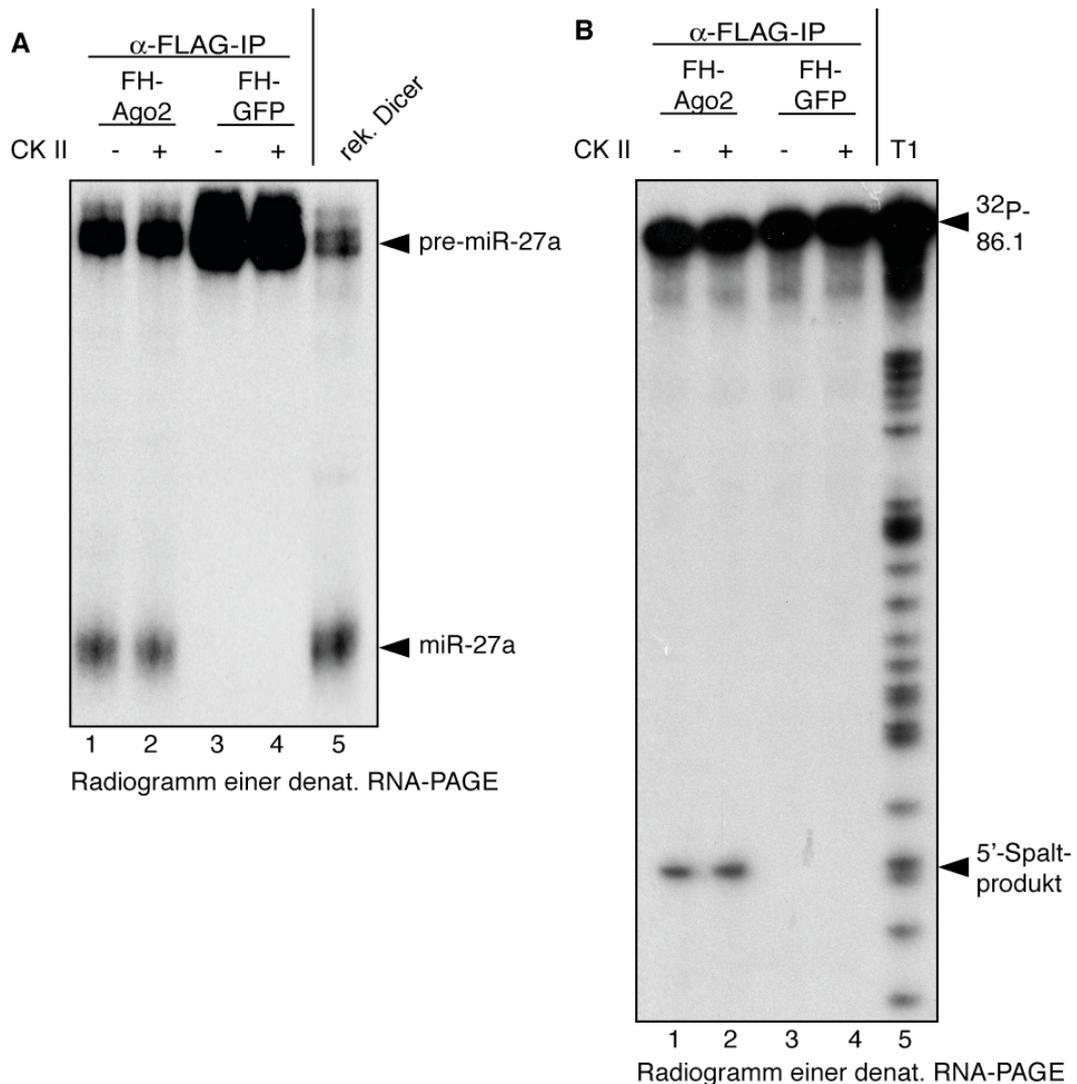
Auf diesem Ergebnis aufbauend, konnten nun funktionale Assays mit Serin-/Threoninphosphoryliertem Ago2-Protein durchgeführt werden. Dazu wurden FH-Ago2- und FH-GFP-

Immunopräzipitate mit nicht radioaktivem ATP in An- oder Abwesenheit von CK II inkubiert, die Reaktionsansätze anschließend halbiert und *in vitro* Dicer- und RISC-Experimenten zugeführt.

Das miRNA-Prozessierungsenzym Dicer interagiert und co-präzipitiert mit Ago2 (Gregory *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2005). Daher lassen sich über den Dicer-Assay mutmaßliche Auswirkungen der Ago2-Phosphorylierung auf die Ago2-Dicer-Interaktion untersuchen. Dicer katalysiert die Prozessierung von miRNA-Vorläufermolekülen, wie beispielsweise pre-miR-27a, zu reifen microRNAs, im Beispiel miR-27a. Diese enzymatische Aktivität ließ sich erwartungsgemäß mit FH-Ago2 beobachten, nicht jedoch mit der FH-GFP-Kontrolle (Abb. 4.24 A, vgl. Spur 1,2 mit 3,4). Entscheidender war allerdings, dass sich kein Unterschied in der Ago2-Dicer-Interaktion zwischen der CK II-unbehandelten und der CK II-behandelten und somit phosphorylierten Probe detektieren ließ (Abb. 4.24 A, Spur 1 und 2).

Das gleiche Resultat zeigt sich im *in vitro* RISC-Assay (Abb. 4.24 B). Auch hier hat die *in vitro* Phosphorylierung durch CK II keine Auswirkungen auf die *slicer*-Aktivität von Ago2 (Abb. 4.24 B, Spur 1 und 2).

Da keine Effekte der Serin-/Threoninphosphorylierung auf die Ago2-Dicer-Interaktion, die RNA-Spaltaktivität und damit auch nicht auf die miRNA-Bindung und *target*-RNA-Assoziation von Ago2 festgestellt werden konnten, wurde auf weitere Studien in Kombination mit einer CK II-Behandlung verzichtet.

**Abbildung 4.24****Die forcierte Phosphorylierung von FH-Ago2 durch CK II beeinflusst weder die Ago-Dicer-Interaktion noch die slicer-Aktivität von FH-Ago2**

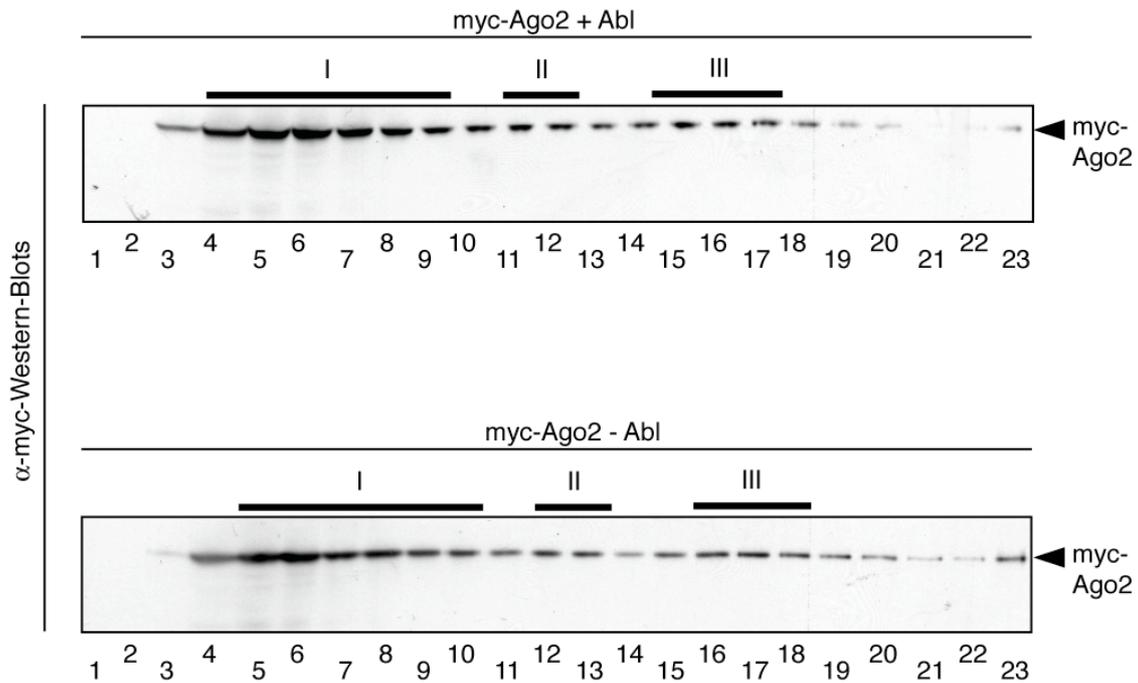
FH-Ago2 und das Kontrollprotein FH-GFP wurden mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus HEK 293 Zellysate immunpräzipitiert und mit („+“) oder ohne („-“) CK II in Gegenwart von nicht radioaktivem ATP inkubiert. (A) Anschließend wurde eine Hälfte jedes Reaktionsansatzes mit radioaktiv-markierter pre-miR-27a, dem Vorläufermolekül von miR-27a, inkubiert. Ein Ansatz wurde mit kommerziell erhältlichem, rekombinantem Dicer durchgeführt und diente als Reaktionsstandard (Spur 5). Die Reaktionen wurden mit Proteinase K gestoppt, die RNA gereinigt und nach Elektrophorese in einem 15%igen denaturierenden Harnstoffgel autoradiographisch analysiert. (B) Die andere Hälfte jeder Probe wurde einem *in vitro* RISC Assay zugeführt. Als *target*-RNA diente  $^{32}\text{P}$ -Cap-markierte 86.1-RNA mit komplementärer Sequenz zu miR-19b. T1 bezeichnet den partiellen RNase T1-Verdau der *target*-RNA (Spur 5). Intakte *target*-RNA und 5'-Spaltprodukt sind rechter Hand des Radiogramms ausgewiesen. Die Aufbereitung und Analyse der RNA erfolgte wie unter (A) beschrieben, nur dass ein 8%iges Gel verwendet wurde.

#### 4.2.3.2 Forcierte Phosphorylierung von Ago2 durch Co-Expression verschiedener Tyrosinkinasen

Die vier Tyrosinreste des FLAG-HA-Fusionspeptids werden *in vivo* phosphoryliert (eigene Beobachtungen) und infolge einer Phosphataseinhibitorbehandlung über die Zellyse hinaus konserviert. Da sich diese posttranslationale Modifikation auf die Interaktion mit dem  $\alpha$ -FLAG-Antikörper auswirkt, kann es bei der Gegenüberstellung einer unbehandelten und einer mit Phosphataseinhibitor behandelten Probe zu einer Beeinflussung des experimentellen Ergebnisses kommen. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente mit myc-Fusionskonstrukten durchgeführt. In der Aminosäuresequenz dieses Fusionspeptids ist kein Tyrosinrest enthalten.

Phosphotyrosin lässt sich nicht wie Phosphoserin durch einen geeigneten Aminosäureaustausch nachahmen (Abb. 4.18). Die Arbeitsgruppe A. Ullrich (MPIB, Martinsried) verfügt aber über eine Mutante der Abelson Tyrosinkinase (Abl) für die Expression in Säugerzellen, die sich durch die Mutation dauerhaft im aktivierten Zustand befindet und so Phosphorylierungsereignisse katalysiert. Mögliche Effekte der Ago2-Tyrosinphosphorylierung konnten nun durch Co-Expression dieser Kinase untersucht werden.

Im ersten Ansatz wurde geprüft, ob die Tyrosinphosphorylierung Auswirkungen auf die RNP-Bildung von myc-Ago2 hat (vgl. Abschnitt 4.2.2). Dazu wurde myc-Ago2 in HEK 293 Zellen mit und ohne co-transfizierter Abl-Kinase exprimiert. Von den Zellen wurden Totallysate hergestellt, mit denen eine Dichtegradientenzentrifugation wie oben beschrieben durchgeführt wurde. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte via Western-Blot.



**Abbildung 4.25**

**Die Co-Expression von konstitutiv aktiver Abelson Tyrosinkinase (Abl) wirkt sich nicht auf die Verteilung von myc-Ago2 im Dichtegradienten aus**

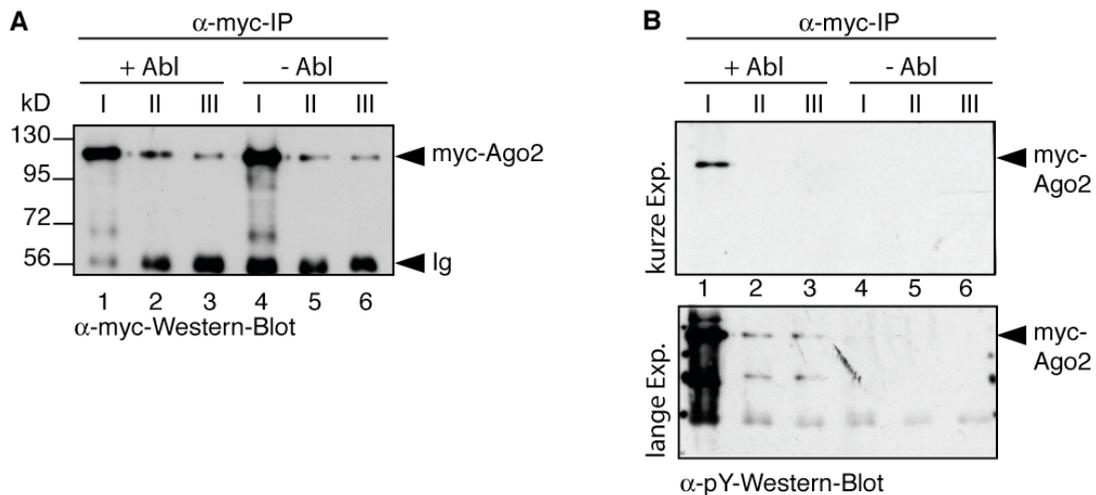
Myc-Ago2 wurde in HEK 293 Zellen mit (oben) und ohne (unten) co-transfizierter, konstitutiv aktiver Abl-Kinase exprimiert. Die Gesamtzelllysate davon wurden schließlich auf einen stufenlosen 15-55%-Saccharosegradienten geladen und für 18 Stunden bei 30 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden vom niedrigprozentigen Bereich beginnend Fraktionen abgetragen und gleiche Volumina jeder Fraktion via  $\alpha$ -myc-Western-Blot analysiert. Die RNA-Protein-Komplexe I, II und III (Höck *et al.*, 2007) sind durch horizontale Balken gekennzeichnet.

Wie Abbildung 4.25 zu entnehmen ist, hatte die Co-Expression der konstitutiv aktiven Abl-Mutante keinen detektierbaren Einfluss auf das Migrationsverhalten von myc-Ago2 im Saccharose-Dichtegradienten. Myc-Ago2 ließ sich unabhängig von den Expressionsbedingungen in allen drei von Höck *et al.* (2007) beschriebenen Ago-Komplexen I, II und III detektieren (Abb. 4.25 oben und unten). Auch die Verteilung von myc-Ago2 auf die einzelnen Komplexe war unverändert (Abb. 4.25, Fraktionen 4-8, 11-12 und 15-17 oben gegenüber Fraktionen 5-9, 12-13 und 16-18 unten).

Mit Co-Expression von Abl erfolgte auch eine Zunahme der Ago2-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 4.26, B). Entweder beeinflusst diese das Migrationsverhalten im Dichtegradienten tatsächlich nicht oder die Auswirkungen werden von einer unphosphorylierten Ago2-

Spezie verdeckt (Abb. 4.25). Um herauszufinden, ob sich die phosphorylierte Ago2-Population im 15-55%-Saccharosegradienten in besonderer Weise verteilt, wurden die Fraktionen der einzelnen Komplexe vereinigt und myc-Ago2 via  $\alpha$ -myc-IP isoliert und zugleich konzentriert. Die  $\alpha$ -myc-Western-Blotanalyse der Immunopräzipitate bestätigte den Eindruck einer von den Expressionsbedingungen unabhängigen Verteilung von myc-Ago2 auf die Komplexe I, II und III (Abb. 4.26 A im Vergleich zu Abb. 4.25). Phosphotyrosinreste konnten jedoch ausschließlich bei der Probe mit co-exprimierter Abl-Mutante nachgewiesen werden (Abb. 4.26 B, Spur 1-3 gegenüber 4-6). Die Mengenverhältnisse sprechen für ein bevorzugtes Auftreten von phosphoryliertem myc-Ago2-Protein in Komplex I (Abb. 4.26 B). Dieser Komplex spiegelt den Pool an „freiem“ Ago2-Protein wider: Zwar ist auch hier miRNA-beladenes Ago2-Protein präsent, mRNAs und tRNAs und somit größere Ago2-RNPs gehören Komplex I jedoch nicht an (Höck *et al.*, 2007). Erst nach längerer Expositionszeit ließ sich phosphoryliertes Ago2-Protein in geringem Umfang auch in Komplex II und III nachweisen (Abb. 4.26 B, unten im Vergleich zu A, Spur 1-3). Das Ergebnis lässt vermuten, dass die durch Abl-Co-Expression forcierte Tyrosinphosphorylierung hauptsächlich freie Ago2-Moleküle betrifft und möglicherweise den Einbau von Ago2 in höhermolekulare RNPs blockiert.

Darüber hinaus belegt die Resultate, dass neben der Serin-/Threonin- auch die Tyrosinphosphorylierung keinen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit von Ago2 im denaturierenden Proteingel hat (Abb. 4.23 B, Spur 1 und 2; Abb. 4.26 A, Spur 1 gegenüber 4-6).

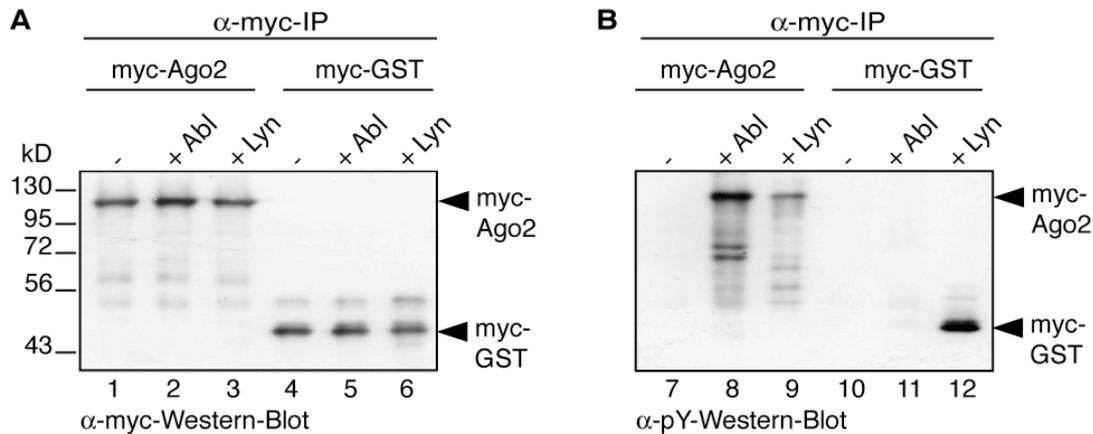
**Abbildung 4.26****myc-Ago2 mit phosphorylierten Tyrosinresten migriert im Dichtegradienten bevorzugt im mRNA- und tRNA-freien Komplex I**

myc-Ago2 wurden in HEK 293 Zellen mit (+Abl) und ohne (-Abl) aktivierter Abl-Kinase-mutante exprimiert und einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen, deren Ergebnis Abbildung 4.25 zu entnehmen ist. Die Fraktionen 4-8 (Komplex I), 11-12 (II), 15-17 (III) mit Abl-, sowie die Fraktionen 5-9 (I), 12-13 (II) und 16-18 (III) ohne Abl-Co-Expression wurden jeweils vereinigt und myc-Ago2 via  $\alpha$ -myc-IP isoliert. Von den verschiedenen Immunopräzipitaten wurden gleiche Volumina - nicht Proteinmengen - analysiert. (A)  $\alpha$ -myc-Western-Blotanalyse; (B)  $\alpha$ -pY-Western-Blotanalyse. Gezeigt ist oben das Ergebnis einer kurzen, unten einer langen Expositionszeit (Exp.).

„I“, „II“ und „III“ kennzeichnen die Komplexe aus Abb. 4.25. „Ig“ bezeichnet die schweren Ketten der Immunglobuline. Das myc-Ago2-Signal ist ausgewiesen.

Als nächstes wurde der Einfluss der Abl-induzierten Tyrosinphosphorylierung auf die Endonuklease-Aktivität von Ago2 in *in vitro* RISC-Assays untersucht. Zusätzlich zu Abl wurde für diese Experimente eine ebenfalls im aktivierten Zustand gehaltene Mutante der Tyrosinkinase Lyn aus der Arbeitsgruppe A. Ullrich (MPIB, Martinsried) eingesetzt. Myc-Ago2 bzw. das Kontrollprotein myc-GST wurden dazu allein oder in Gegenwart von Abl bzw. Lyn in HEK 293 Zellen exprimiert und mittels  $\alpha$ -myc-IP isoliert. Die Immunopräzipitate wurden geteilt und einerseits der Western-Blotanalyse, andererseits den *in vitro* RISC-Versuchen zugeführt. Die Signalintensitäten der  $\alpha$ -myc-Western-Blotanalyse belegen, dass alle Immunopräzipitate vergleichbare Mengen an myc-Fusionsprotein enthielten (Abb. 4.27 A), sich jedoch in der Quantität der Phosphotyrosinreste unterschieden (Abb. 4.27 B). Lediglich infolge der Abl- und Lyn-Co-Expression waren bei myc-Ago2 Phosphotyrosylgruppen nachweisbar (Abb.

4.27 B, Spur 8 und 9). Des weiteren scheint der durch Abl hervorgerufene Phosphorylierungsgrad von myc-Ago2 höher zu sein als der im Fall einer Co-Expression von Lyn (Abb. 4.27 B, Spuren 7-9). Umgekehrt ließ sich für myc-GST ausschließlich nach Lyn-Co-Expression ein Signal im  $\alpha$ -pY-Western-Blot detektieren (Abb. 4.27 B, Spur 10-12).

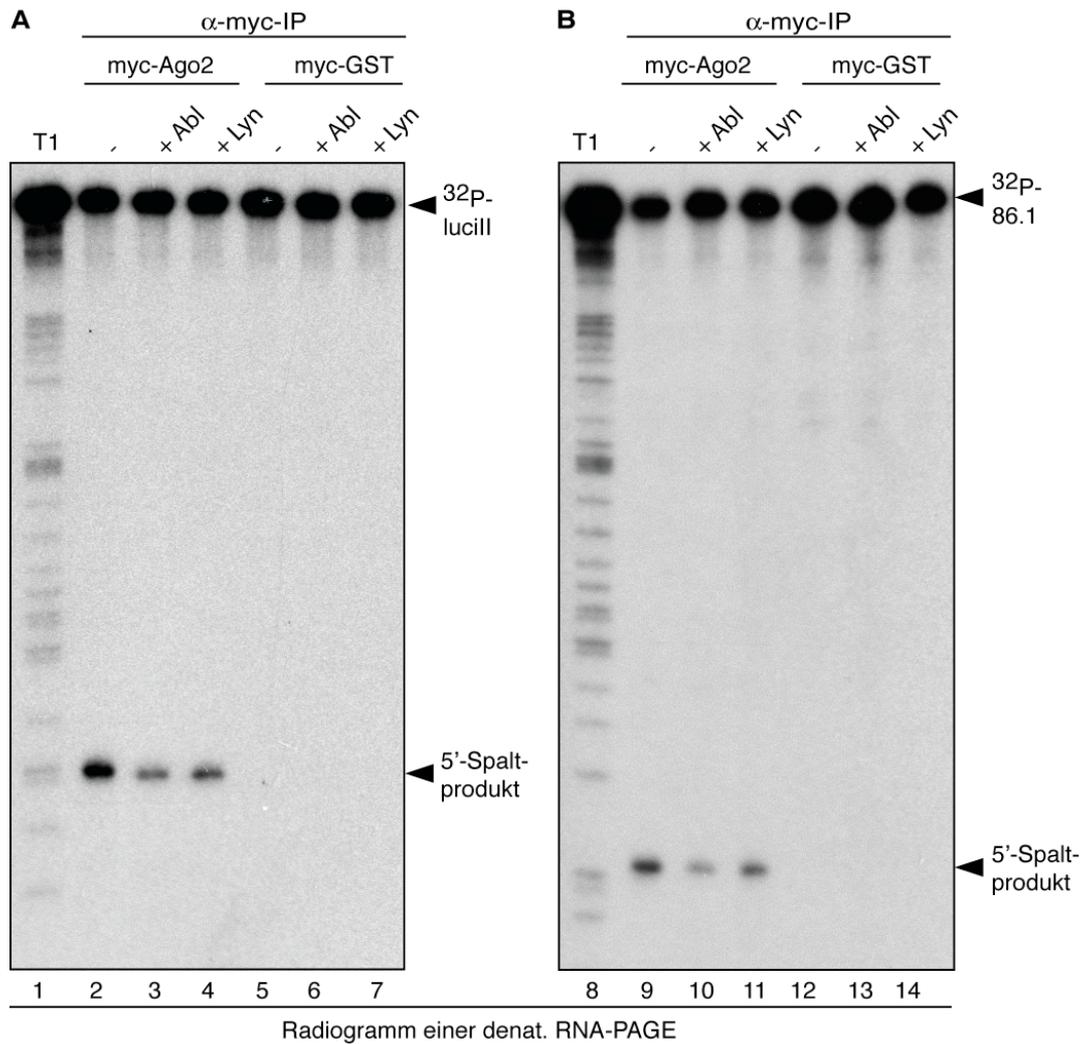


**Abbildung 4.27**

**Phosphorylierung von myc-Ago2 variiert in Abhängigkeit der co-exprimierten Tyrosinkinase**

Myc-Ago2 (Spuren 1-3 und 7-9) und das Kontrollprotein myc-GST (Spuren 4-6 und 10-12) wurden in HEK 293 Zellen ohne („-“) oder mit aktivierter Abl- („+Abl“) bzw. Lyn-Tyrosinkinase (mutante „+Lyn“) exprimiert. Nach Immunopräzipitation der myc-Fusionsproteine aus dem Totallysat dieser Zellen, wurden die Präzipitate via  $\alpha$ -myc-Western-Blot (A) oder via  $\alpha$ -pY-Western-Blot (B) analysiert. Die in der jeweiligen Probe überexprimierten Proteine sind oberhalb der Western-Blots aufgeführt. Die Signale von myc-Ago2 und -GST sind rechter Hand ausgewiesen.

Die Immunopräzipitate mit unterschiedlichem Phosphotyrosylgruppengehalt wurden parallel zur Western-Blotanalyse in *in vitro* RISC-Assays untersucht (Abb. 4.28). Während erwartungsgemäß keinerlei Endonukleaseaktivität in der myc-GST-Kontrolle nachweisbar war (Abb. 4.28 A, Spur 5-7), unterschieden sich die drei myc-Ago2-Proben tatsächlich in ihrer RISC-Aktivität: Je höher der Tyrosinphosphorylierungsgrad der Proteine (Abb. 4.27 B), desto geringer der Anteil an RISC-spezifischem 5'-target-RNA-Spaltprodukt (Abb. 4.28 A, Spur 2 bis 4). Ein ähnliches Resultat ergab sich im RISC-Experiment mit vorangegangener *in vitro* siRNA-Beladung der immunopräzipitierten Proteine (Abb. 4.28 B).

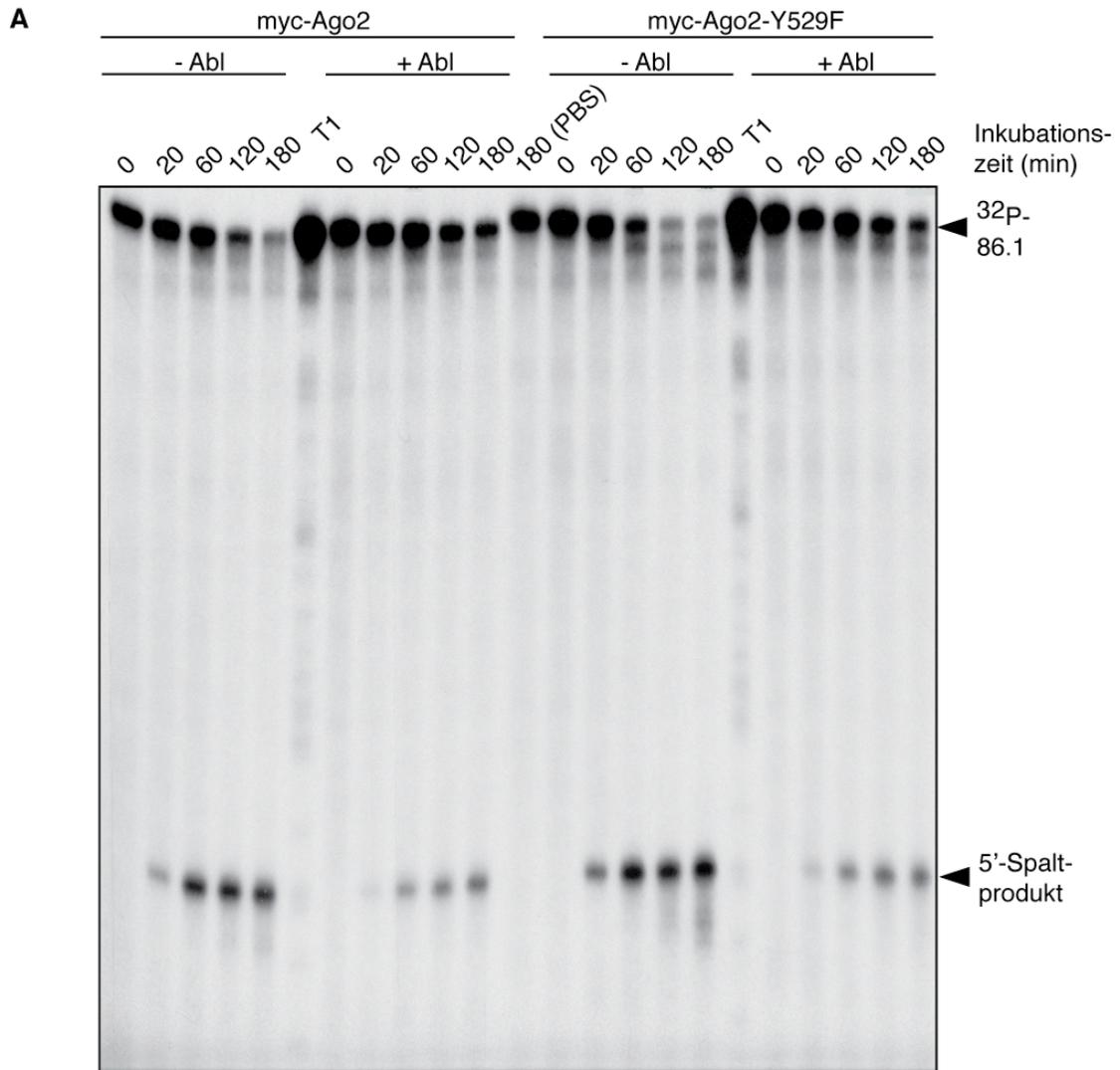
**Abb. 4.28**

#### **Verminderte *slicer*-Aktivität von myc-Ago2 korreliert mit einem höherem Tyrosinphosphorylierungsgrad**

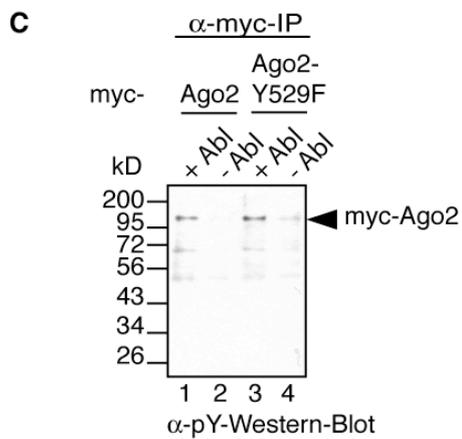
Zu den zurückbehaltenen Proben der verschiedenen myc-Ago2- und myc-GST-Immunopräzipitate aus Abb. 4.27 wurde eine  $^{32}\text{P}$ -markierte, spezifische *target*-RNA gegeben. Die Reaktionen wurden nach einstündiger Inkubation durch Proteolyse beendet. Für den Größenstandard wurde die *target*-RNA einem partiellen RNase T1-Verdau unterzogen („T1“). Die Analyse der gereinigten RNA erfolgte via denaturierender PAGE unter Verwendung eines 8%-igen Harnstoffgeles und anschließender Autoradiographie. (A) RISC-Assay mit der miR-19b-*target*-RNA (86.1). (B) RISC-Assay mit der *target*-RNA „lucill“. Die immunopräzipitierten Proteine wurden zur Beladung mit der kleinen RNA 21.27 20 Minuten inkubiert, bevor die *target*-RNA zugegeben wurde.

Die Resultate des RISC-Assays stützen die Vermutung, dass die artifiziell forcierte Tyrosinphosphorylierung von Ago2 in der Tat einen inhibierenden Einfluss auf dessen *slicer*-Aktivität ausübt. Allerdings können zu diesem Zeitpunkt anderweitige Ursachen für die reduzierte *slicer*-Aktivität nicht ausgeschlossen werden.

Um herauszufinden, ob die infolge der Kinasen-Co-Expression beobachteten Effekte eventuell der Phosphorylierung von Y529 zugeschrieben werden können, wurden die *in vitro* RISC-Experimente mit dem Wildtypprotein sowie der Ago2-Y529F-Mutante wiederholt. Ist die  *slicer*-Aktivität direkt mit dem Modifikationsstatus von Tyrosin 529 korreliert, so sollte sich mit Ago2-Y529F in Gegenwart der Kinase keine Abnahme der Endonukleaseaktivität detektieren lassen, da der Aminosäureaustausch eine Phosphorylierung verhindert. Zur experimentellen Überprüfung wurden myc-Ago2 und myc-Ago2-Y529F ohne und mit der Abl-Mutante in HEK 293 Zellen exprimiert und aus den Zelllysaten mittels  $\alpha$ -myc-Antikörper immunopräzipitiert. Mit Zugabe der radioaktiv markierten *target*-RNA wurden die RISC-Reaktionen gestartet und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Im Vergleich zur Endpunktmessung lieferte die Kinetik mehr Datenpunkte, so dass technisch-bedingte Schwankungen der relativen 5'-Spaltproduktmenge besser erkennbar waren. Zur Dokumentation des Phosphorylierungszustands der Fusionsproteine wurde eine zusätzliche Proteinprobe am Ende der RISC-Reaktion entnommen. Wie schon zuvor beobachtet, wurde infolge der Abl-Co-Expression über die Zeit weniger *target*-RNA durch myc-Ago2 gespalten als in Abwesenheit der Kinase (Abb. 4.29 A, Spur 1-11). Allerdings beobachtete man das gleiche auch mit myc-Ago2-Y529F (Abb. 4.29 A, Spur 13-23). Für eine objektivere Beurteilung wurden die Radiogramme von drei unabhängigen Experimenten quantitativ ausgewertet. Überexposition wurde dabei vermieden. Die Signalintensität des 5'-Spaltproduktes wurde relativ zur Gesamtradioaktivität der jeweiligen Probe - also der jeweiligen Gelspur - bestimmt. Tatsächlich zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen myc-Ago2 und der Mutante. In beiden Fällen nehmen die relativen 5'-Spaltproduktmengen durchschnittlich um 8% infolge der Abl-Co-Expression ab. Das bedeutet, dass die verringerte  *slicer*-Aktivität nicht allein auf die Phosphorylierung von Y529 zurückgeführt werden kann, sondern durch einen anderen bzw. andere Phosphotyrosinrest(e) bedingt sein muss.



Radiogramm einer denat. RNA-PAGE

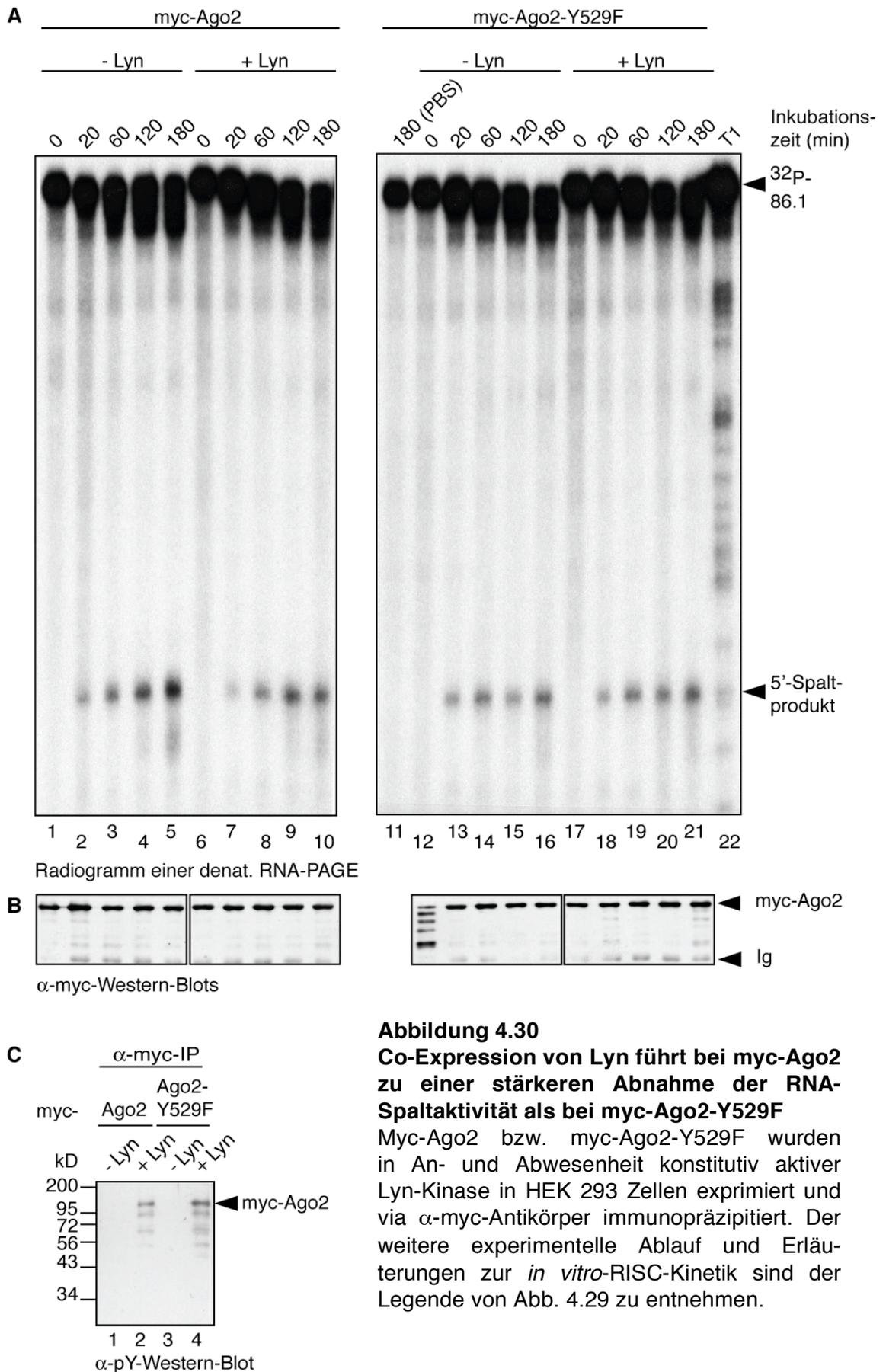


**Abbildung 4.29****Nach Co-Expression von Abl zeigt sowohl Wildtyp-Ago2 wie auch Ago2-Y529F verminderte *slicer*-Aktivität**

Myc-Ago2 bzw. myc-Ago2-Y529F wurden in An- und Abwesenheit konstitutiv aktiver Abl-Kinase in HEK 293 Zellen exprimiert und via  $\alpha$ -myc-Antikörper immunopräzipitiert. Zu den Proteinpräzipitaten wurde die  $^{32}\text{P}$ -Cap-markierte *target*-RNA (86.1) gegeben, die über eine perfekt komplementäre Bindungssequenz für miR-19b verfügt. Zu Beginn der *in vitro* RISC-Reaktion sowie nach 20, 60, 120 und 180 Minuten wurden Proben für die RNA- und Proteinanalyse entnommen. Zur Kontrolle unspezifischer RNA-Hydrolyse wurde eine Reaktion mit PBS anstelle von Immunopräzipitat angesetzt und für 180 Minuten inkubiert (Spur 12). (A) Radiogramm zur RNA-Dokumentation. Für die RNA-Analyse wurde die Hälfte jeder Probe sofort mit Proteinase K versetzt, die RNA schließlich gereinigt und via Harnstoff-PAGE und Autoradiographie ausgewertet. „T1“ (Spur 6 und 18) bezeichnet einen partiellen RNase T1-Verdau von „86.1“. (B)  $\alpha$ -myc-Western-Blot. Für die Proteinanalyse wurde die übrige Hälfte jeder Probe mit Proteinprobenpuffer versetzt und ein  $\alpha$ -myc-Western-Blot durchgeführt. Das Ladeschema entspricht dem des Radiogramms aus (A), so dass die RNA- und Proteinanalyseresultate einer Probe unmittelbar untereinander stehen. (C)  $\alpha$ -pY-Western-Blot. Für die Dokumentation des Tyrosinphosphorylierungsgrades wurde den Reaktionsansätzen nach 180 Minuten eine zusätzliche Probe für die  $\alpha$ -pY-Western-Blotanalyse entnommen.

Phosphoryliertes Y529 konnte via Massenspektrometrie bei myc-Ago2 sowohl in Ab- wie auch Anwesenheit von Abl während der Proteinexpression nachgewiesen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass eventuelle Auswirkungen der Y529-Phosphorylierung auf die *slicer*-Aktivität von Ago2 im vorangegangenen Experiment nicht erkennbar waren (Abb. 4.29), weil die von anderen phosphorylierten Tyrosinresten ausgehenden Effekte größer waren und sie infolgedessen überlagert wurden. Die Co-Expression der Lyn-Mutante hatte vergleichsweise geringe Auswirkung auf die RISC-Aktivität (Abb. 4.28), so dass ein eventueller Y529-spezifischer Einfluss mitunter besser zu detektieren wäre. Die vorangegangene RISC-Kinetik wurde daher mit Lyn wiederholt. Erwartungsgemäß akkumulierte infolge der Lyn-Expression auch hier weniger 5'-Spaltprodukt im Fall von myc-Ago2 (Abb. 4.30 A, Spur 1-10), doch schien die *slicer*-Aktivität der Mutante Y529F demgegenüber von der An- oder Abwesenheit der Kinase unbeeinflusst zu bleiben (Abb. 4.30 A, Spur 11-22). Tatsächlich ergab die Quantifizierung, dass sich die relativen RNA-Spaltproduktmengen für un- und phosphoryliertes myc-Ago2-Y529F zu jedem Zeitpunkt um  $\pm 1\%$  gleichen, während im Fall des Wildtypproteins mit der phosphorylierten Spezies durchschnittlich 2% weniger Produkt anfiel als mit der unphosphorylierten. Dies deutet darauf hin - wenngleich nur mäßig - dass die beobachtete Beeinträchtigung

gung der  *slicer*-Funktion von Ago2 in der Tat auch eine direkte Auswirkung der Modifikation von Y529 ist.



**Abbildung 4.30**

**Co-Expression von Lyn führt bei myc-Ago2 zu einer stärkeren Abnahme der RNA-Spaltaktivität als bei myc-Ago2-Y529F**

Myc-Ago2 bzw. myc-Ago2-Y529F wurden in An- und Abwesenheit konstitutiv aktiver Lyn-Kinase in HEK 293 Zellen exprimiert und via  $\alpha$ -myc-Antikörper immunopräzipitiert. Der weitere experimentelle Ablauf und Erläuterungen zur *in vitro*-RISC-Kinetik sind der Legende von Abb. 4.29 zu entnehmen.

Das Ergebnis der Y529F-Mutante für die RISC-Kinetik in Abhängigkeit einer Co-Expression von Lyn unterstützt zwar die Vermutung, dass die Phosphorylierung von Y529 zum Ausschalten der Endonukleasefunktion von Ago2 führt und daher in dieser Richtung weitergeforcht werden sollte. Jedoch sind die Quantifizierungsergebnisse - obgleich reproduzierbar - wenig überzeugend und die zugrunde liegenden experimentellen Bedingungen mit der Co-Expression der Tyrosinkinase zudem vergleichsweise artifiziell. Aus diesen Gründen wurde schließlich von der Charakterisierung der Ago2-Phosphorylierung durch Co-Expression willkürlich gewählter Tyrosinkinasen abgesehen.

Die mit Abl und Lyn gewonnenen Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die Co-Expression der Tyrosinkinase Abl oder Lyn erhöht den Anteil von Ago2 mit Phosphotyrosylgruppen am Gesamt-Ago2-Pool und ermöglicht damit überhaupt erst die Detektion von myc-Ago2 im  $\alpha$ -pY-Western-Blot. Der Phosphorylierungsgrad von Ago2 nach Abl-Expression ist höher als der nach Co-Expression von Lyn (Abb. 4.27 B und Massenspektrometriedaten). Zugleich existiert daneben weiterhin eine Ago2-Spezies ohne Phosphotyrosylgruppen (Abb. 4.26, Verhältnis von I zu II/III im  $\alpha$ -myc- bzw.  $\alpha$ -pY-Western-Blot). Im SDS-Polyacrylamidgel sind die verschiedenen Ago2-Spezies anhand ihrer Migrationsgeschwindigkeit nicht zu unterscheiden (Abb. 4.27).
- 2) Ago2 mit phosphorylierten Tyrosinseitenketten migriert bevorzugt in Komplex I im Saccharose-Dichtegradienten und scheint daher nicht mit mRNA- oder tRNA-haltigen RNPs assoziiert zu sein, sondern einen Pool von ungebundenem Ago2 zu repräsentieren (Abb. 4.26 B). Tatsächlich zeigt Ago2 infolge forcierter Tyrosinphosphorylierung eine verringerte RISC-Aktivität (Abb. 4.28).
- 3) RISC-Experimente mit co-exprimierter Lyn-Kinase und der Ago2-Mutante Y529F unterstützen die Arbeitshypothese, dass speziell die Phosphorylierung von Y529 die Ago2-*slicer*-Funktion negativ beeinflusst (Abb. 4.30)

#### 4.2.4 Funktionale Bedeutung der Phosphorylierung von Tyrosin-529

Tyrosinphosphorylierungen treten häufig im Zusammenhang mit Signaltransduktionskaskaden auf und stellen ein wichtiges regulatorisches Element im Zellstoffwechsel dar (Deribe *et al.*, 2010). Von den zwei ursprünglich bei Ago2 identifizierten Phosphotyrosinresten Y393 und Y529 (Abb. 4.16) verdient Y529 besondere Aufmerksamkeit, da es sich hierbei um eine zentrale Aminosäure der Bindungstasche für das 5'-Ende der kleinen RNA handelt, die zudem maßgeblich zur miRNA-Bindung und -Ausrichtung beiträgt (Parker *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005; Abschnitt 2.3.3.3). Vorangegangene Experimente lassen vermuten, dass sich die Phosphorylierung dieser Aminosäureseitenkette negativ auf die Assemblierung von Ago2-RNPs und die *slicer*-Aktivität auswirkt (Abb. 4.20, 4.21 und 4.30). Leider ist bis zu diesem Punkt kein Weg gefunden worden, Ago2-pY529 von Ago2-Y529 zu separieren, um beide Proteinspezies im Experiment einander gegenüber stellen zu können. Von den zwei experimentellen Strategien, willkürlich gewählte Tyrosinkinase oder aber verschiedene Ago2-Punktmutanten zur Charakterisierung der Y529-Phosphorylierung einzusetzen, erscheint letztere geeigneter: Erstens kann der Einfluss dieses einen Aminosäurerestes gezielter untersucht werden und zweitens machen Aminosäureaustauschmutanten den Einsatz des Phosphataseinhibitors Pervanadat zur Konservierung von Phosphotyrosinresten überflüssig. Die experimentellen Bedingungen entsprechen damit eher den physiologischen Normalbedingungen als im Fall einer Kinase-Co-Expression.

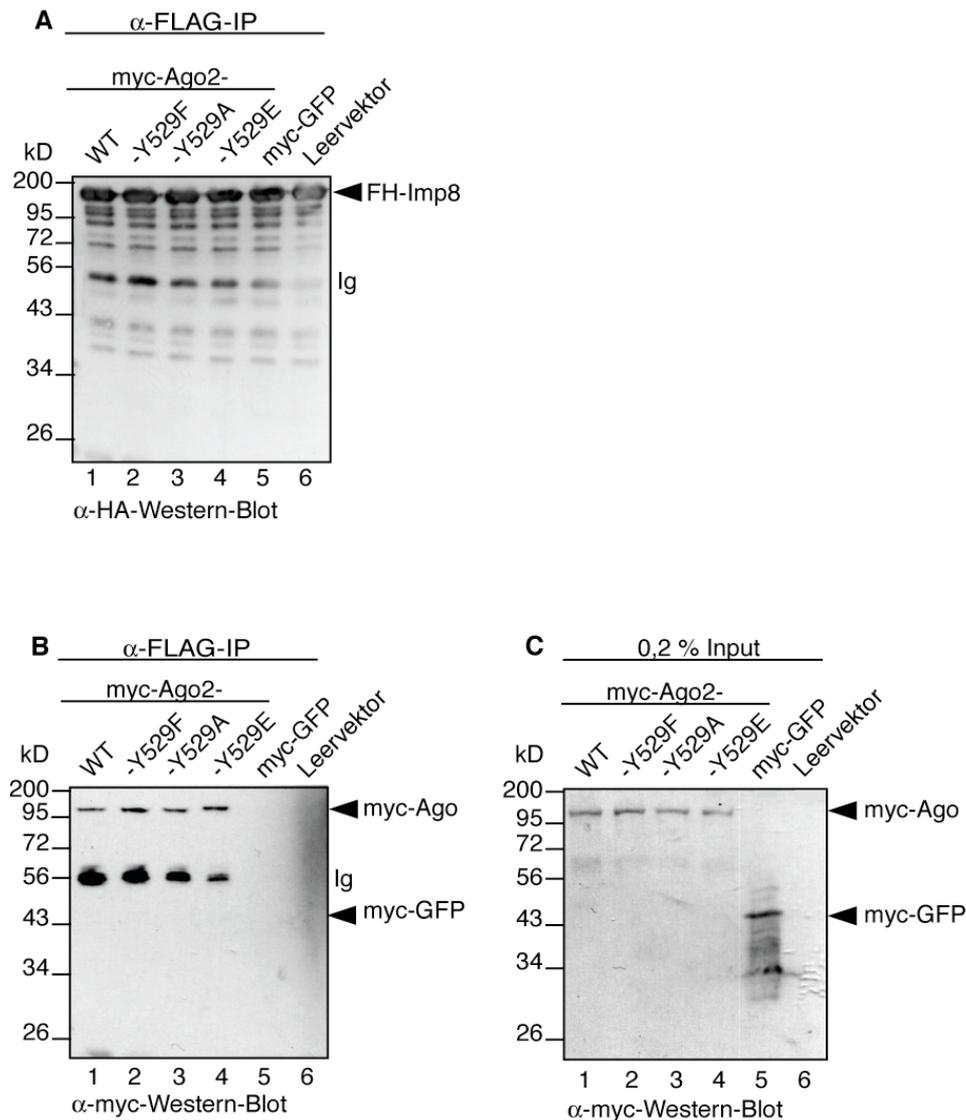
##### 4.2.4.1 Verifizierung der Funktionalität der Ago2-Y529-Mutanten

Keine der natürlichen Aminosäure eignet sich für eine akzeptable Nachahmung eines Phosphotyrosinrestes. Daher wurden verschiedene Y529-Punktmutanten generiert: Ago2-Y529F, -Y529A, -Y529E und -Y529Q (siehe Abschnitt 4.2.2 und Abb. 4.18). Jeder Aminosäureaustausch birgt potenziell das Risiko, die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur des Proteins zu stören. Solch eine Mutante würde folglich in funktionalen Assays Defizite zeigen, ohne

dass die substituierte Aminosäure eine spezielle Bedeutung für die untersuchte Funktion haben müsste. Daher wurde die strukturelle Integrität der Y529-Mutanten vorweg validiert:

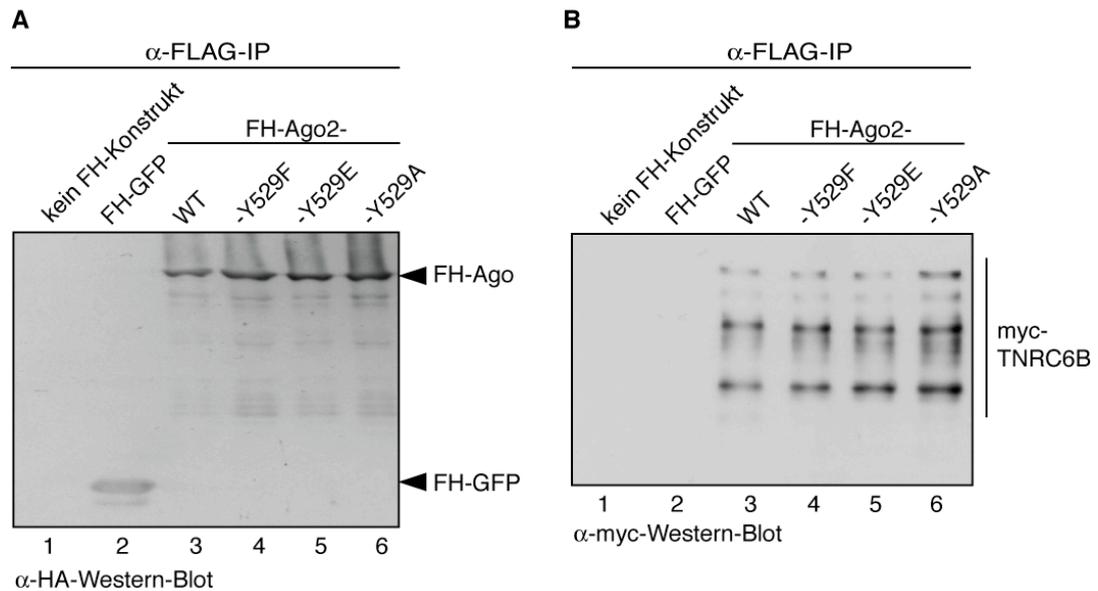
Es ist bekannt, dass Proteine wie Importin 8 (Imp8), Vertreter der TNRC6-Proteinfamilie und Dicer (Abschnitt 2.5) mit Ago2 assoziieren. Lassen sich diese Proteine auch zusammen mit den Ago2-Mutanten immunopräzipitieren und umgekehrt die Mutanten mit diesen Proteinen (Prinzip der Co-Immunopräzipitation, kurz: Co-IP), dann spricht das für die strukturelle Integrität und somit grundsätzliche Funktionalität der Punktmutanten. Für die mit Ago2 interagierenden Proteine waren keine Antikörper verfügbar. Deshalb wurden sie ebenso wie die Y529-Mutanten als Fusionsproteine in HEK 293 Zellen exprimiert.

Zuerst wurde die Interaktion mit Imp8 untersucht. Dazu wurden HEK 293 Zellen neben FH-Imp8 auch mit myc-Ago2, -Y529F, -Y529A, -Y529E oder den Negativkontrollen -GFP und dem Leervektor pCS2-FAME transfiziert. FH-Imp8 wurde schließlich in Gegenwart von Ribonuklease A (RNase A) mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus dem Zelllysate isoliert und die Anwesenheit der einzelnen Proteine mittels Western-Blotanalyse untersucht. Aus allen Lysaten wurden vergleichbare Mengen an FH-Imp8 immunopräzipitiert (Abb. 4.31 A). Neben FH-Imp8 konnten nicht nur alle myc-Ago2-Mutanten nachgewiesen werden, sondern bemerkenswerterweise sogar im gleichen Umfang wie das Wildtypprotein (Abb. 4.31 B, Spur 1-4). Die Negativkontrollen myc-GFP bzw. das myc-Fusionspeptid waren dagegen nicht detektierbar (Abb. 4.31 B, Spur 5-6), obwohl zumindest GFP nachweislich im Ausgangslysate präsent war (Abb. 4.31 C, Spur 5). Damit kann erstens die RNA-unabhängige Co-IP von Ago2 und Mutanten mit Imp8 als spezifisch angesehen werden; zweitens ist festzustellen, dass die Aminosäuresubstitutionen Y529F, Y529A und Y529E keinerlei Auswirkungen auf die Imp8-Ago2-Interaktion haben. Drittens ist infolgedessen anzunehmen, dass diese Mutanten korrekt strukturiert und prinzipiell funktionell sind.

**Abbildung 4.31****Die Substitution von Y529 hat keinen Einfluss auf die Interaktion von myc-Ago2 mit FH-Imp8**

myc-Ago2, -Y529F, -Y529A, -Y529E bzw. die Kontrollkonstrukte myc-GFP und der Leervektor pCS2-FAME wurden mit FH-Imp8 in HEK 293 Zellen co-exprimiert. Zwei Tage später erfolgte die Zellyse und FH-Imp8 wurde mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper in Gegenwart von 0,5 mg RNase A immunopräzipitiert. (A) Western-Blotanalyse des  $\alpha$ -FLAG-Immunopräzipitates mit  $\alpha$ -HA-Antikörper. Welches myc-Protein neben FH-Imp8 co-exprimiert worden war, steht oberhalb des Western-Blots, das FH-Imp8-Signal und das der schweren Ketten der Immunglobuline („Ig“) ist rechter Hand angegeben. (B) Western-Blotanalyse des  $\alpha$ -FLAG-Immunopräzipitates mit  $\alpha$ -myc-Antikörper. Die Probenbeladung entspricht der aus (A). Neben den Signalen der verschiedenen myc-Ago2-Proteine (Spur 1-4) und jenen der Immunglobuline ist ebenfalls angegeben, auf welcher Höhe das myc-GFP-Signal zu erwarten gewesen wäre (Spur 6). (C)  $\alpha$ -myc-Western-Blot von 0,2 Vol.-% der zur Immunopräzipitation eingesetzten Lysatmenge zum Nachweis der erfolgreichen Expression der cozupräzipitierenden myc-Fusionsproteine. Probenbezeichnung erfolgte gemäß (A). Die Signale der myc-Ago2-Proteine und das von myc-GFP sind gekennzeichnet.

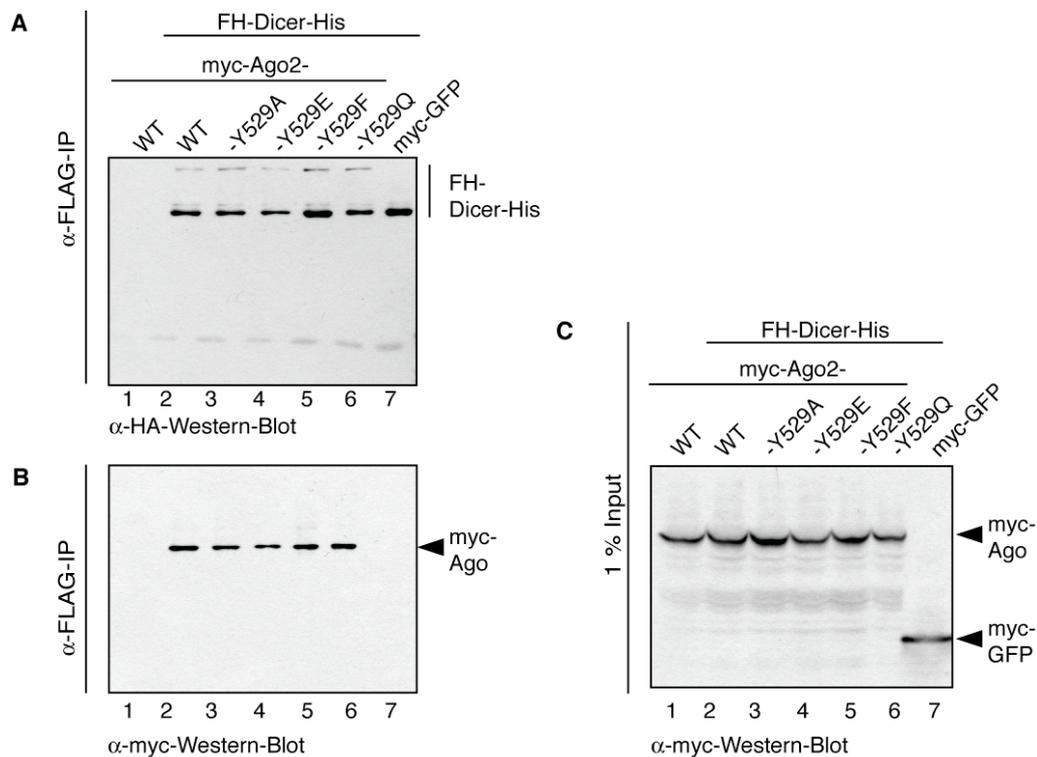
Um die Aussage zur strukturellen Integrität weiter abzusichern, wurde eine zusätzliche Protein-Protein-Interaktion untersucht, nämlich die zu TNRC6B (Meister *et al.*, 2005). Tyr-529 spielt eine wichtige Rolle bei dieser Wechselwirkung (Till *et al.*, 2007; Abschnitt 2.3.3.3). Ago2, die Mutanten Y529F, -E und -A sowie das Kontrollprotein GFP wurden für das Experiment als FH-Fusionsproteine zusammen mit myc-TNRC6B in HEK 293 Zellen exprimiert. Als weitere Kontrolle wurde ausschließlich myc-TNRC6B ohne ein FH-Konstrukt transfiziert. Im Anschluss an die Reinigung der FH-Fusionsproteine mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper und RNase A-Behandlung der Immunopräzipitate erfolgte die Analyse der Co-Immuno- präzipitation von myc-TNRC6B via  $\alpha$ -myc-Western-Blot. Trotz partieller Proteolyse von myc-TNRC6B ließ sich für alle untersuchten Ago2-Mutanten die RNA-unabhängige Interaktion mit TNRC6B nachweisen (Abb. 4.32 B, Spur 3-6). Bei den Proben mit FH-GFP und Zelllysat ohne FH-Fusionsprotein konnte dagegen kein myc-spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 4.32 B, Spur 1-2), obgleich myc-TNRC6B in allen Zellen gleichermaßen exprimiert worden war (Daten nicht gezeigt). TNRC6B co-immunopräzipitierte folglich spezifisch sowohl mit dem Ago2-Wildtypprotein als auch den Y529-Mutanten. Die Interaktion von Ago2-Y529A zu TNRC6B erschien auf den ersten Blick stärker als die der übrigen Ago2-Varianten (Abb. 4.32 B, Spur 6). Da jedoch auch mehr Ago2-Y529A gereinigt worden war (Abb. 4.32 A, Spur 6), kann gesagt werden, dass alle untersuchten Ago2-Varianten in vergleichbarem Umfang mit TNRC6B interagieren. Dieses Ergebnis ist somit ein weiterer Hinweis darauf, dass die verschiedenen 529-Aminosäuresubstituenten keinen Einfluss auf die Struktur bzw. prinzipielle Funktionalität von Ago2 haben. Zudem legt es nahe, dass ein Tyrosin an Position 529 der Ago2-Primärsequenz, anders als in der Literatur beschrieben (Till *et al.*, 2007), für die Ago2-TNRC6B-Wechselwirkung entbehrlich ist.

**Abbildung 4.32****Die Ago2-Y529-Punktmutanten interagieren ebenso mit myc-TNRC6B wie das Ago2-Wildtypprotein**

myc-TNRC6B wurde alleine (Spur 1) oder zusammen mit FH-Ago2 (Spur 3), -Y529F (Spur 4), -Y529E (Spur 5), -Y529A (Spur 6) bzw. mit dem Kontrollprotein FH-GFP (Spur 2) in HEK 293 Zellen exprimiert. Zwei Tage später erfolgte die Zellyse und die FH-Fusionsproteine wurden mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper in Gegenwart von 0,5 mg RNase A immunopräzipitiert. (A) Western-Blotanalyse des  $\alpha$ -FLAG-Immunopräzipitates mit  $\alpha$ -HA-Antikörper. Über jeder Spur ist angegeben, welches FH-Protein neben myc-TNRC6B exprimiert worden ist. Die Identitäten der Signale sind rechter Hand des Western-Blots ausgewiesen. (B) Western-Blotanalyse des  $\alpha$ -FLAG-Immunopräzipitates mit  $\alpha$ -myc-Antikörper. Die myc-TNRC6B-spezifischen Signale sind gekennzeichnet.

Die Verifizierung der strukturellen Integrität der Ago2-Y529-Mutanten wurde mit dem Test der Ago2-Dicer-Interaktion fortgesetzt. FH-Dicer-His wurde dafür zusammen mit myc-Ago2 bzw. den Y529-Mutanten -A, -E, -F, -Q oder dem Kontrollprotein myc-GFP in HEK 293 Zellen exprimiert. Als weitere Spezifitätskontrolle diente ein Ansatz mit myc-Ago2 aber ohne FH-Dicer-His. Aus den Zelllysaten wurden die FH-Dicer-Fusionsproteine mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper in Gegenwart von RNase A gereinigt und die Immunpräzipitate via  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -myc-Western-Blot analysiert. Obgleich alle myc-Fusionsproteine – Ago2-Mutanten wie auch die Kontrollproteine – in ähnlicher Quantität und Qualität in den Lysaten vorhanden waren (Abb. 4.33 C), konnten in den immunopräzipitierten und RNase A-behandelten FH-Dicer-Komplexen (Abb. 4.33 A, Spur 2-7) erwartungsgemäß ausschließlich die verschiedenen

myc-Ago2-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 4.33 B, Spur 2-6). Ihre Co-Immunopräzipitation erfolgte Dicer-spezifisch (vgl. Abb. 4.33 B, Spur 1 und 7). Auch sind keinerlei Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten und dem Wildtypprotein hinsichtlich der Intensität der Dicer-Interaktion festzustellen (Abb. 4.33 A und B, Spuren 2-6).



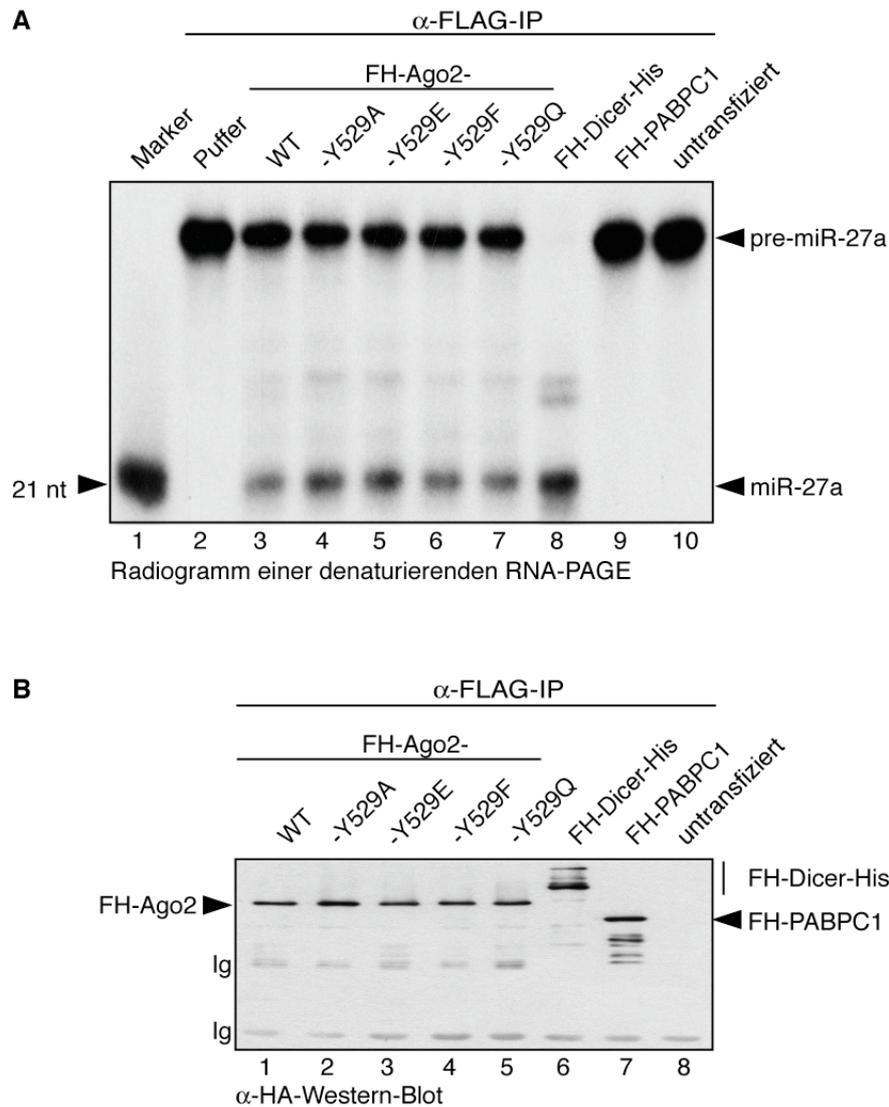
**Abbildung 4.33**

**Die Mutation von Y529 hat keine Auswirkung auf die spezifische, RNA-unabhängige Dicer-Ago2-Interaktion**

FH-Dicer-His wurde mit myc-Ago2 (Spur 2), -Y529A (Spur 3), -Y529E (Spur 4), -Y529F (Spur 5) oder -Y529Q (Spur 6) in HEK 293 Zellen co-exprimiert. Als Spezifitätskontrolle diente einerseits die Expression von myc-Ago2 ohne FH-Fusionsprotein (Spur 1), andererseits die Co-Expression von myc-GFP (Spur 7). (A) Analyse der immunopräzipitierten FH-Fusionsproteine via  $\alpha$ -HA-Western-Blot. Die überexprimierten Fusionsproteine sind oberhalb des Western-Blots aufgeführt. (B) Analyse des in (A) gezeigten Western-Blots mit  $\alpha$ -myc-Antikörper. Die Probenidentität ist (A) zu entnehmen. Die Signale co-immunopräzipitierter Proteine sind gekennzeichnet. (C)  $\alpha$ -myc-Western-Blot der für die Immunopräzipitation eingesetzten Zelllysate. Analysiert wurde 1 Vol.-% der eingesetzten Lysatmenge.

Die Dicer-Interaktion der Ago2-Mutanten konnte darüberhinaus mit dem endogenen Dicer-Protein im Aktivitätsassay nachgewiesen werden. Dazu wurden die FH-Fusionskonstrukte der Mutanten in HEK 293 Zellen exprimiert. Als Positivkontrolle für die Dicer-Aktivität fungierte FH-Dicer-His, als Negativkontrolle das RNA-bindende zytoplasmatische Poly(A)-Bindungsprotein 1 (engl.: *cytoplasmic poly(A)-binding protein 1*, kurz: PABPC1), das nur mit später im miRNA-Signalweg aktiven Faktoren interagiert (Fabian *et al.*, 2009; Zekri *et al.*, 2009; Abschnitt 2.4.3). Die Proteine wurden mittels  $\alpha$ -FLAG-IP aus den Zelllysaten isoliert und die radioaktiv markierte pre-miR-27a-RNA, die durch Dicer zur reifen miRNA miR-27a prozessiert werden würde, zu den Immunopräzipitaten gegeben. Wie Abbildung 4.34 zu entnehmen ist, ließ sich die reife, 21 nt lange miR-27a infolge der Inkubation mit FH-Ago2, -Y529A, -E, -F, -Q und der Positivkontrolle -Dicer-His nachweisen (Abb. 4.34 A, Spur 3-8). Im FH-PABPC1-Immunopräzipitat ließ sich erwartungsgemäß keine Dicer-Aktivität detektieren (Abb. 4.34 A, Spur 9). Die eingesetzten, relativen Proteinmengen sind Abbildung 4.34 B zu entnehmen.

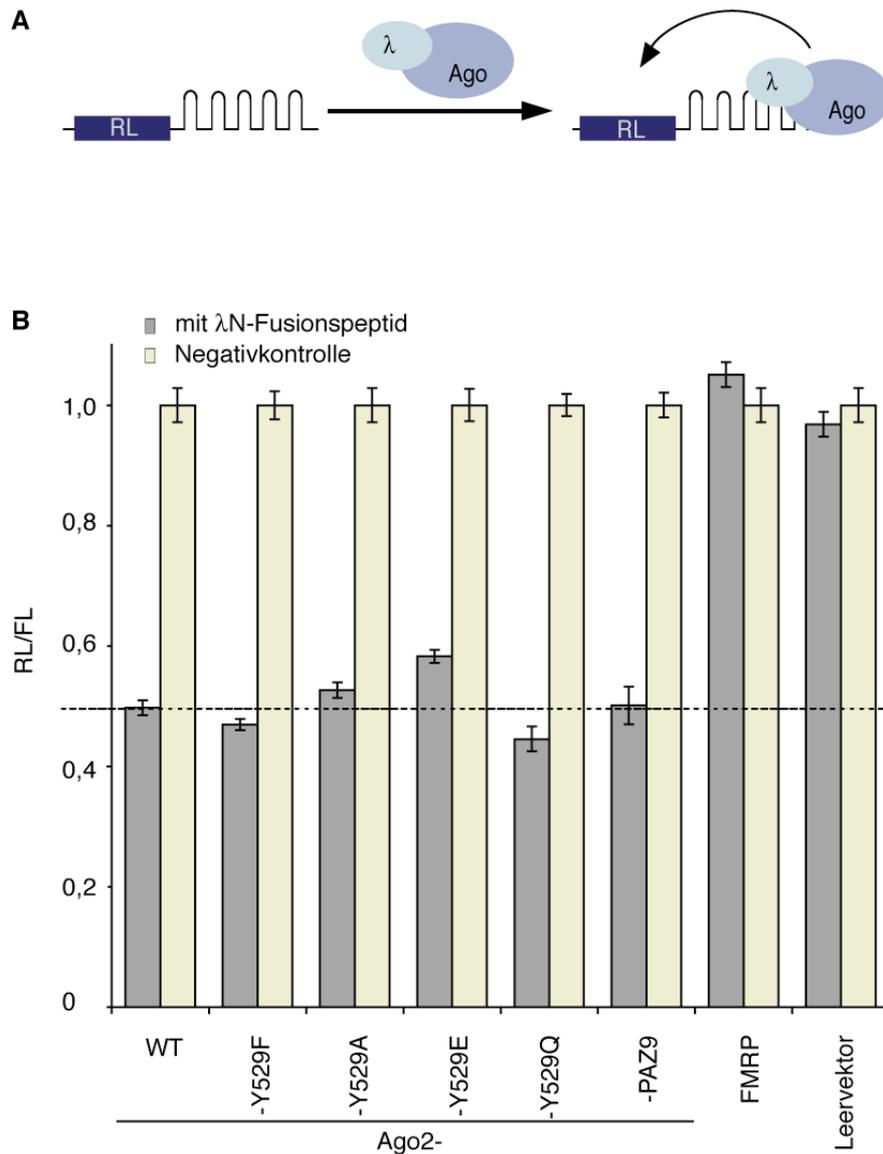
Zusammenfassend heißt das, dass die verschiedenen Aminosäureaustausche auch die Ago2-Dicer-Interaktion nicht beeinträchtigen. Die Ago2-Dicer-Wechselwirkung erfolgt über die PIWI-Box im C-terminalen Bereich von Ago2 (Tahbaz *et al.*, 2004, Abschnitt 2.3.3.4 und Abb. 2.2). Da die Proteinfaltung co-translational erfolgt und die Translation mit dem N-Terminus beginnt, konnte somit davon ausgegangen werden, dass die PIWI-Box und alle N-terminal davon gelegenen Bereiche – also nahezu das gesamte Protein – trotz der eingebrachten Mutationen korrekt strukturiert sind.

**Abbildung 4.34****Y529-Mutanten interagieren wie das Ago2-Wildtypprotein mit endogenem, aktivem Dicer-Protein**

FH-Ago2, -Y529A, -Y529E, -Y529F, -Y529Q sowie die Kontrollproteine FH-Dicer-His und FH-PABPC1 wurden in HEK 293 Zellen exprimiert. Nach der Zellyse wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit α-FLAG-Antikörper durchgeführt. Zur Kontrolle unspezifischer Assoziationen von Dicer-Aktivität mit der Antikörpermatrix wurde zusätzlich untransfiziertes Zelllysate eingesetzt (A, Spur 10; B Spur 8). (A) Zu den aufgeteilten Proben wurde schließlich die <sup>32</sup>P-markierte pre-miR-27a-RNA gegeben (Spur 3-10), die durch Dicer zur reifen, 21 nt langen miRNA miR-27a prozessiert wird. Zur Kontrolle unspezifischer RNA-Hydrolyseprodukte wurde der Vorläufer zudem in PBS anstelle von Immunopräzipitat inkubiert (Spur 2). Die Reaktionen wurden mit Proteinase K gestoppt, die RNA gereinigt und nach 15%iger Harnstoff-PAGE autoradiographisch analysiert. Als Größenstandard diente eine 5'-<sup>32</sup>P-markierte 21 nt lange, einzelsträngige siRNA (Spur 1). (B) α-HA-Western-Blotanalyse der Immunopräzipitate zur Dokumentation der Proteinquantität und -qualität.

Nach den verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen der Y529-Mutanten, sollte die Validierung mit einem Funktionalitätstest *in vivo* abgeschlossen werden. Für den sogenannten *tethering*-Assay (Abschnitt 6.2.5.15) wurde das jeweilige Protein von Interesse N-terminal mit dem Bakteriophagenpeptid  $\lambda$ N fusioniert. Dieses Peptid bindet an das Hämoglobin boxB-Aptamer, welches seinerseits in die 3'-UTR eines RNA-Reporters kloniert wurde. Exprimiert man RNA-Reporter und das modifizierte Protein von Interesse in einer Zelle, so gelangt dieses durch die Interaktion des  $\lambda$ N-Peptids mit dem boxB-Aptamer in die räumliche Nähe des RNA-Reporters. Auswirkungen dieser RNA-Protein-Assoziation können über die Luziferaseaktivität des Reporters gemessen werden (Gehring *et al.*, 2003). Auf diesem Weg kann auch Ago miRNA-unabhängig zu einer *target*-RNA gebracht werden. Das Prinzip ist in Abbildung 4.35 A skizziert. Ist die jeweilige Ago2-Mutante in der Lage, die Translation der Reporter-RNA wie das Wildtypprotein zu unterdrücken, zeigt sich das in einer verminderten Luziferase-Aktivität gegenüber der Negativkontrolle, die kein  $\lambda$ N-Peptid trägt.

Die praktische Durchführung erfolgte in HeLa Zellen, die mit den Proteinkonstrukten, dem Reporter-kodierenden Plasmid und einem zur Normierung der Transfektionseffizienz dienenden *Firefly* Luziferase-Konstrukt transfiziert wurden. Die zu untersuchenden Proteine waren Ago2, -Y529F, -A, -E, -Q, -PAZ9 und die Kontrollen FMRP, ebenfalls ein RNA-bindendes Protein, sowie der Leervektor, alle jeweils mit und ohne  $\lambda$ N-Peptid. Die PAZ9-Mutante trägt Mutationen in der Bindungstasche für das miRNA-3'-Ende und bindet infolgedessen keine miRNAs mehr (Liu *et al.*, 2005 (a)). Sie fungiert als Kontrolle des experimentellen Prinzips. Die Auswertung mehrerer, unabhängig durchgeführter *tethering*-Assays ergab, dass Ago2 zu einer Verminderung der *Renilla* Luziferase-Aktivität um rund 50% führt, wenn es durch das  $\lambda$ N-Peptid zur Reporter-RNA gebracht wird (Abb. 4.35 B). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Y529-Mutanten und PAZ9. Dagegen konnte weder mit dem  $\lambda$ N-Fusionskonstrukt des Leervektors noch mit dem von FMRP eine Repression der Luziferase-Aktivität beobachtet werden (Abb. 4.35 B).



**Abbildung 4.35**

**Ago2 und Ago2-Y529-Mutanten können Luziferase-Reporter im miRNA-unabhängigen *tethering*-Assay reprimieren**

(A) Schematische Darstellung des *tethering*-Assays, der auf einer konstruierten RNA-Protein-Interaktion basiert. Die Reporter-RNA codiert den ORF der *Renilla* Luziferase (RL), deren 3'-UTR aus fünf Kopien des boxB-Aptamers gebildet wird. Das Bakteriophagen λN-Peptid (λ) als N-terminale Fusion des Ago-Proteins (Ago) bindet dieses Aptamer und bringt Ago so in die räumliche Nähe des Reporters. Auswirkungen der Ago-Präsenz auf die Reporter-RNA können anhand der Luziferase-Aktivität gemessen werden. (B) Ago2, -Y529F, -Y529A, -Y529E, -Y529Q, -PAZ9 bzw. das RNA-bindende Protein FMRP wurden als λN-Fusionsproteine (graue Balken) und ohne das λN-Peptid (gelbe Balken) zusammen mit einem *Renilla* Luziferase-Reporter, der über mehrere Kopien des Hämoglobin boxB-Aptamers verfügt, in HeLa Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente neben FMRP der Leervektor. Zur Normalisierung der Expressionseffizienz wurde *Firefly* Luziferase (FL) co-exprimiert, deren Expression keinem spezifischen Regulationsmechanismus unterlag. Für die graphische Darstellung wurden die Messdaten auf die individuellen Negativkontrollen ohne λN-Fusion normalisiert. Die horizontale Linie markiert die mit Ago2-Wildtyp verzeichnete Luziferase-Aktivität.

Die Ergebnisse zur Verifizierung der prinzipiellen Funktionalität der generierten Mutanten lassen sich wie folgt zusammenfassen: Ago2-Y529F, -E, -A und -Q interagieren wie das Wildtypprotein spezifisch und RNA-unabhängig mit den Proteinen Importin 8, TNRC6B und Dicer (Abb. 4.31 bis 4.34). Alle Mutanten üben zudem eine dem Wildtyp-ähnliche reprimierende Wirkung auf eine Reporter-RNA im *in vivo* Funktionalitätstest aus (Abb. 4.35). Somit kann für nachfolgende Untersuchungen von einer korrekten Faltung und prinzipiellen Funktionalität der Y529-Mutanten ausgegangen werden. Etwaige Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtypprotein in weiteren Analysen sollten demnach als spezifische Auswirkung der jeweiligen Punktmutation angesehen werden können.

#### 4.2.4.2 Charakterisierung der Y529-Mutanten

Wie bereits in Abbildung 4.20 dokumentiert, sind die Y529-Mutanten in unterschiedlichem Maße endonukleolytisch aktiv. Das bestätigte sich bei der Wiederholung des *in vitro* RISC-Assays: Die in HEK 293 Zellen exprimierten und mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitierten Ago2-Varianten wurden einerseits mit der miR-19b-*target*-RNA und andererseits mit einer spezifischen *target*-RNA für die vorab *in vitro* in Ago eingebaute, einzelsträngige siRNA 21.27 inkubiert. In beiden Versuchen zeigte Ago2-Wildtyp die stärkste *slicer*-Aktivität, gefolgt von der F-Mutante (Abb. 4.36 A, Spur 2, 3 und 9, 10). Dagegen ließ die E-Mutante mit der negativ-geladenen Carboxylgruppe in der miRNA-Bindungstasche nahezu keine endonukleolytische Aktivität beobachten (Abb. 4.36 A, Spur 3 und 11). Die *slicer*-Aktivitäten der Mutanten A und Q standen zwischen denen der F- und E-Mutante und waren einander ähnlich (Abb. 4.36 A, Spur 5, 6 und 12, 13). Offensichtlich ist ein aromatischer Kohlenstoffring in der miRNA-Bindungstasche für die Endonukleasefunktion von Ago2 zwar von Vorteil aber nicht – wie angenommen – essentiell (Parker *et al.*, 2005). Das lässt vermuten, dass der Verlust der *slicer*-Funktion der Y529E-Mutante aus der negativen Ladung des Glutaminsäurerestes in dieser Position resultiert und keine Folge der mit der Substitution eingebrachten aliphatischen Seitenkette ist. Dass darüber hinaus die RISC-typische RNA-Spaltaktivität

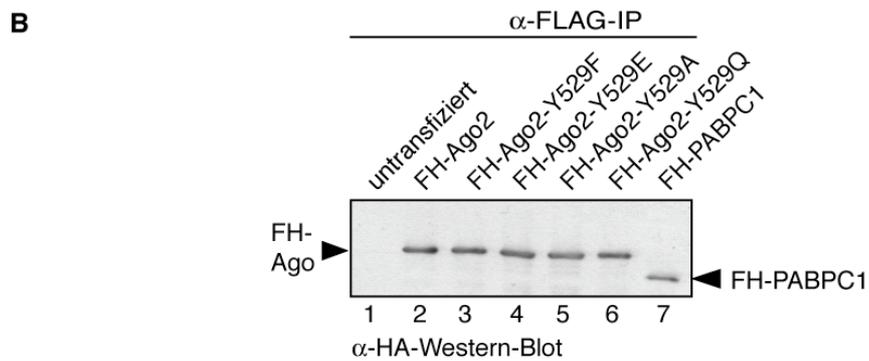
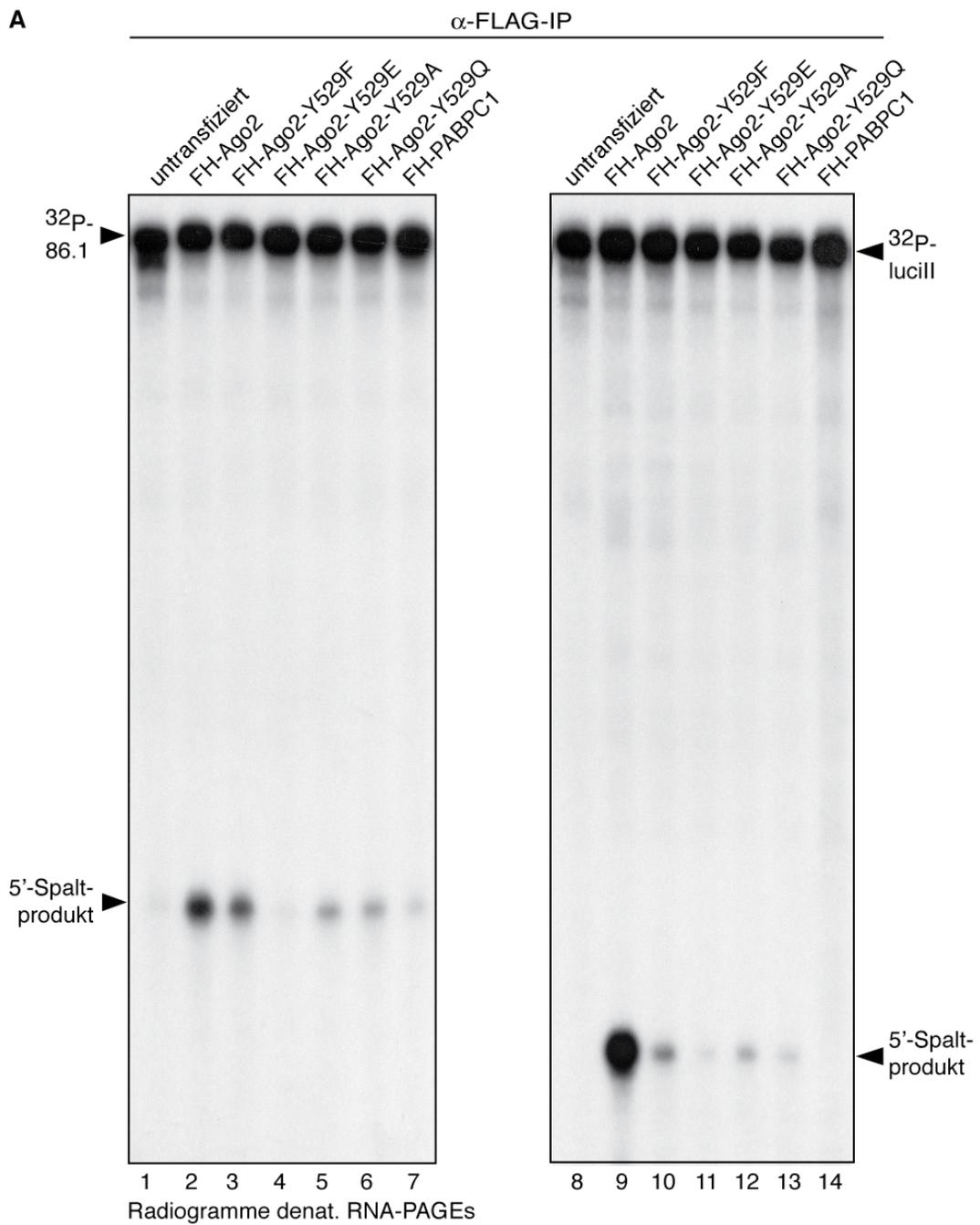
auch bei der FH-PABPC1-Probe beobachtet werden konnte (Abb. 4.36 A, Spur 7), resultiert aus der Co-Existenz von PABPC1 und Ago2 in einem miRNP-Komplex (Fabian *et al.*, 2009; Abschnitt 2.4.3 und 2.5.1), die offensichtlich die Co-Immunopräzipitation von endogenem Ago2 mit FH-PABPC1 zur Folge hatte.

Interessanterweise fiel in Kombination mit der *in vitro*-siRNA-Beladung der Proteine die RISC-Aktivität insgesamt geringer aus (Abb. 4.36 A, rechts). Zudem war zwar die Abnahme der *slicer*-Leistung zwischen Ago2-Wildtyp und den Mutanten ausgeprägter als im Experiment mit endogen assemblierten Ago-miRNA-Komplexen, doch fielen die Unterschiede der Mutanten untereinander geringer aus (Abb. 4.36 A, Spur 9-13). Das ist erstaunlich, da diesen Beobachtungen dieselben Immunopräzipitate zugrunde lagen wie dem RISC-Assay mit der miR-19b-*target*-RNA (Abb. 4.36 A, links). Das Ergebnis resultiert demnach nicht aus der inhärenten *slicer*-Aktivität der einzelnen Mutanten. Möglicherweise beeinflusst die Y529-Mutation die Effizienz der siRNA-Beladung und/oder siRNA-Bindung.

#### **Abbildung 4.36**

##### **Beeinträchtigung der Ago2-Endonukleaseaktivität durch Mutation von Y529**

Die FH-Konstrukte von Ago2, den Mutanten -Y529F, -E, -A, und -Q sowie PABPC1 wurden in HEK 293 Zellen exprimiert und nach der Lysatpräparation mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitiert. Lysat untransfizierter Zellen fungierte als Negativkontrolle. (A) Ein Drittel jeder Probe wurde einem *in vitro* RISC-Assay mit der radioaktiv markierten miR-19b-*target*-RNA 86.1 zugeführt (links, Spur 1-7). Ein weiteres Drittel wurde zusammen mit einzelsträngiger siRNA 21.27 inkubiert, bevor die Ansätze um die 21.27-spezifische *target*-RNA luci II ergänzt wurden (rechts, Spur 8-14). Die Reaktionen wurden nach einer Stunde gestoppt und die gereinigte RNA autoradiographisch analysiert. (B)  $\alpha$ -HA-Western-Blot der in (A) eingesetzten Immunopräzipitate.

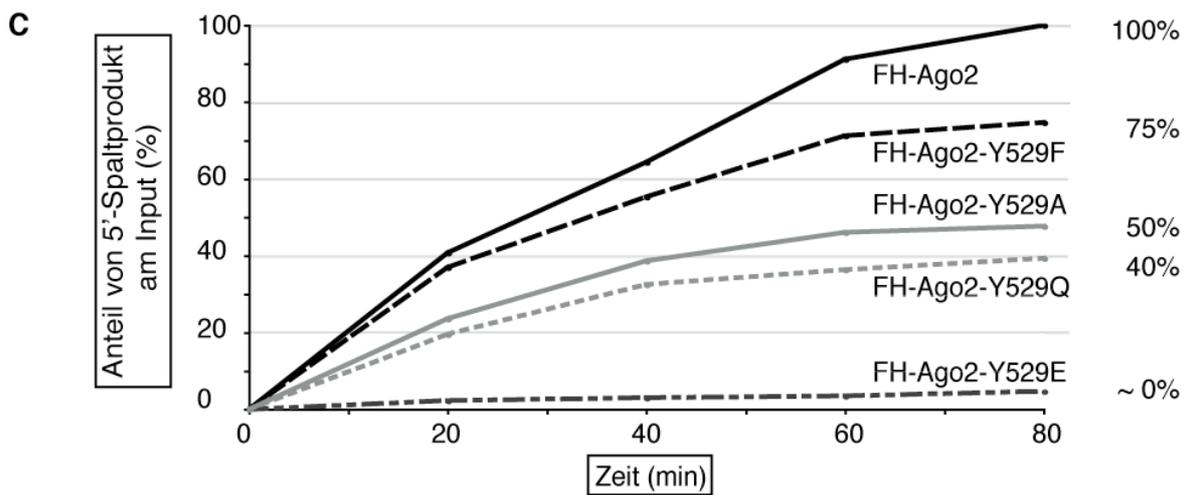
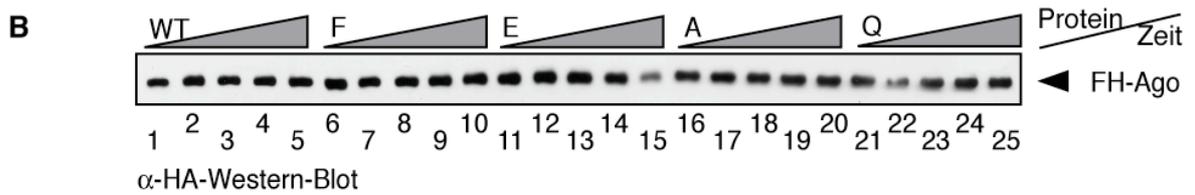
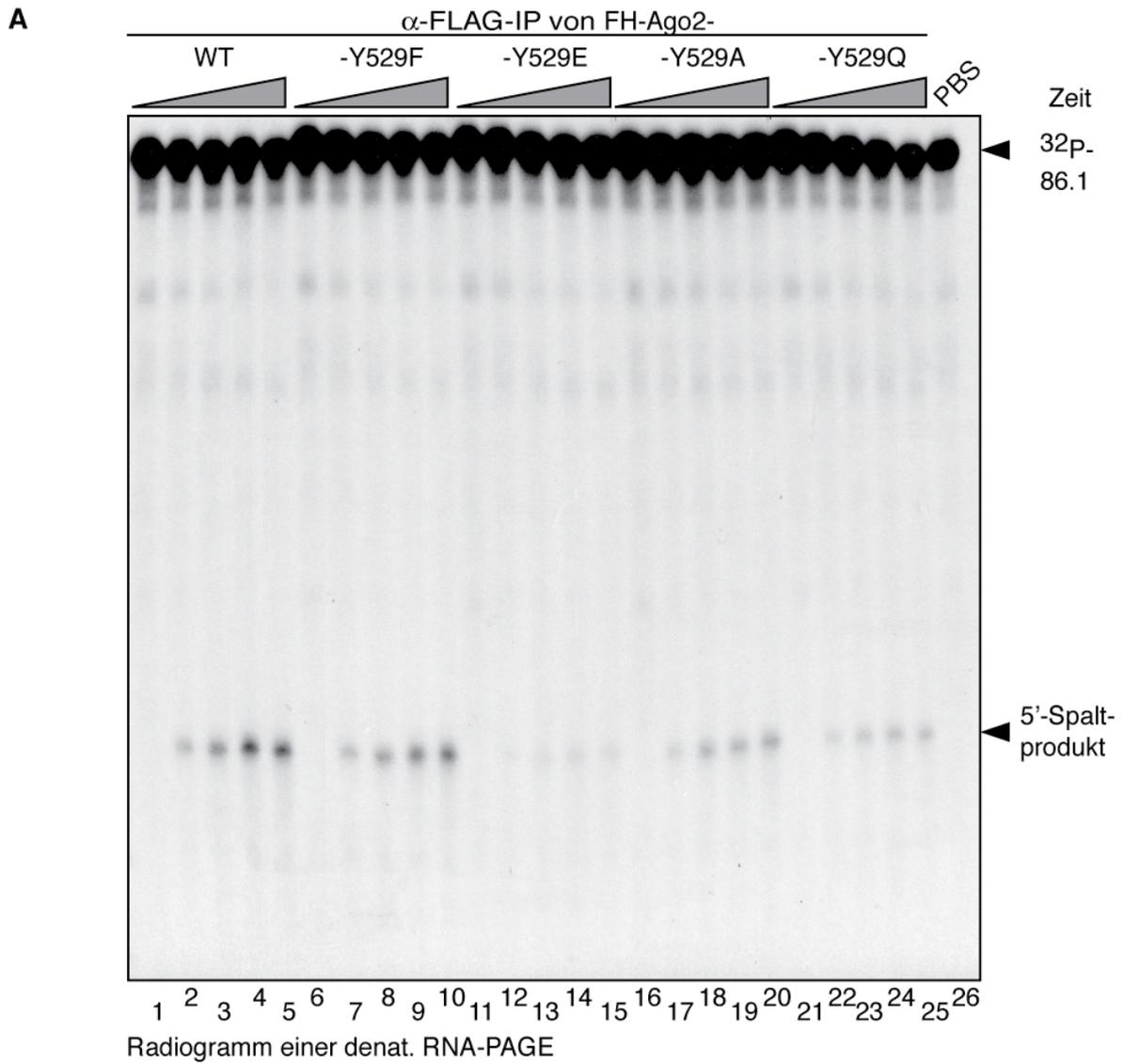


Für die Quantifizierung der unterschiedlichen RISC-Aktivitäten der Y529-Mutanten wurden die relativen 5'-Spaltproduktmengen einer miR-19b-spezifischen *target*-RNA in zeitlicher Abhängigkeit bestimmt (Abb. 4.37). Während die F-Mutante noch über  $\frac{3}{4}$  der Ago2-Wildtyp-Aktivität zeigte, lagen die der A- und Q-Mutante unter 50%. Die Mutante Y529E war nahezu inaktiv (Abb. 4.37 C).

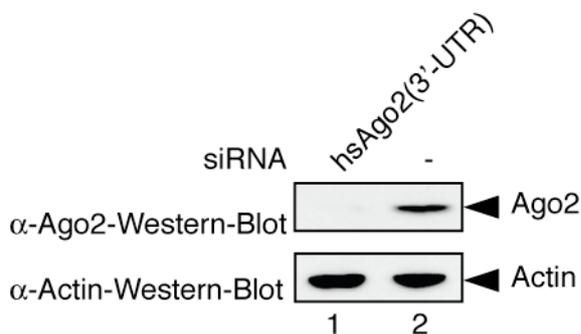
#### **Abbildung 4.37**

##### **Quantifizierung der *in vitro* RISC-Aktivitäten der Y529-Mutanten**

FH-Ago2 (Spuren 1-5), -Y529F (Spuren 6-10), -E (Spuren 11-15), -A (Spuren 16-20) und -Q (Spuren 21-25) wurden in HEK 293 Zellen exprimiert und via  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus den Zelllysaten immunpräzipitiert. (A) Zu den Proteinpräzipitaten wurde die radioaktiv-markierte miR-19b-*target*-RNA 86.1 gegeben. Zu Beginn der *in vitro* RISC-Reaktion sowie nach 20, 40, 60 und 80 Minuten wurden Proben für die RNA- und Proteinanalyse entnommen. Der Zeitverlauf ist durch die grauen Dreiecke oberhalb der Gelabbildungen in (A) und (B) symbolisiert. (A) Radiogramm der RNA-PAGE. Für die RNA-Analyse wurde eine Hälfte jeder entnommenen Probe sofort mit Proteinase K versetzt, die RNA schließlich gereinigt und via Harnstoff-PAGE und Autoradiographie ausgewertet. Eine Reaktion mit PBS anstelle von Immunopräzipitat diente der Kontrolle unspezifischer RNA-Hydrolyse und wurde nach 80 Minuten beendet (Spur 26). (B)  $\alpha$ -HA-Western-Blot. Für die Proteinanalyse wurde die übrige Hälfte jeder Probe mit Proteinprobenpuffer versetzt und ein  $\alpha$ -HA-Western-Blot durchgeführt. Das Ladeschema entspricht dem des Radiogramms in (A). (C) Quantifizierung der relativen 5'-Spaltproduktmengen aus (A). Die mit dem Computerprogramm „ImageQuant“ bestimmten Signalintensitäten der 5'-Spaltprodukte wurden ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtradioaktivität der jeweiligen Probe bzw. Gelspur. Das Ergebnis ist in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.



Schließlich wurde die *slicer*-Aktivität der Mutanten *in vivo* untersucht. Dafür war eine Depletion des endogenen Ago2-Proteins notwendig. Es wurde eine gegen die 3'-UTR von Ago2 gerichtete siRNA in HeLa Zellen transfiziert und nach fünf Tagen ließ sich Ago2 nicht mehr via  $\alpha$ -Ago2(11A9)-Western-Blot nachweisen (Abb. 4.38).



**Abbildung 4.38**

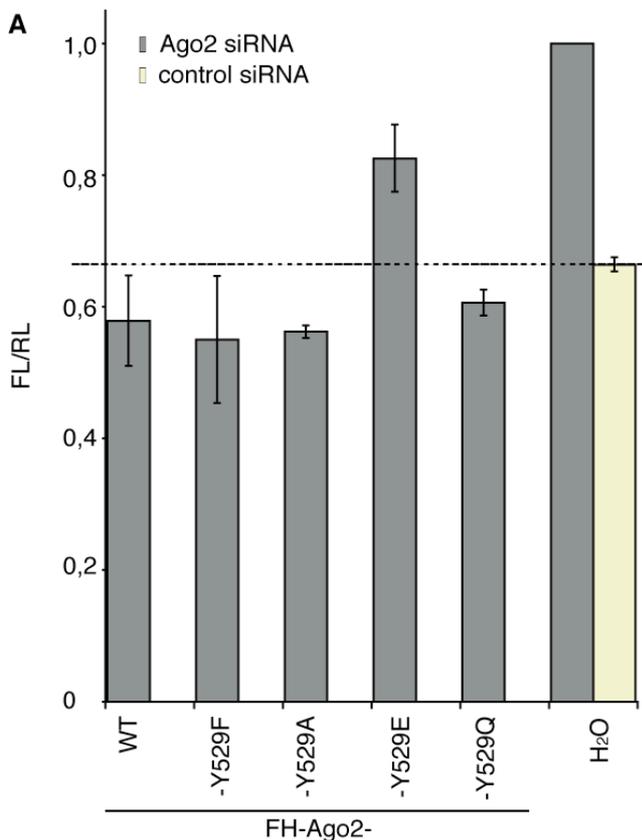
**Depletion von endogenem Ago2 in lebenden Zellen durch RNAi (*knock-down*)**

Die gegen die 3'-UTR von Ago2 gerichtete siRNA *hsAgo2(3'-UTR)* wurde in HeLa Zellen transfiziert (Spur 1) und die Zellen fünf Tage später lysiert. Totallysat untransfizierter HeLa-Zellen diente als Standard für das Ago2-Expressionsniveau unter Normalbedingungen (Spur 2). Die Analyse erfolgte via  $\alpha$ -Ago2 (11A9)-Western-Blot (oben). Der  $\alpha$ -Actin-Western-Blot dokumentiert das Laden gleicher Gesamtproteinmengen für die Western-Blot-analyse (unten).

Parallel zur Ago2-Depletion durch siRNAs (*Ago2-knock-down*) wurden die Plasmidkonstrukte der Y529-Mutanten in die Zellen transfiziert. Deren Expression war aufgrund der fehlenden 3'-UTR auch in Gegenwart der *hsAgo2(3'-UTR)*-siRNA gewährleistet (Abb. 4.39 B). Zuletzt wurde das RNA-Reporter-Plasmid transfiziert. Dieses kodiert *Renilla*- und *Firefly*-Luziferase unter der Kontrolle voneinander unabhängiger Promotoren. In der 3'-UTR der *Firefly*-Luziferase befindet sich eine perfekt komplementäre Bindungsstelle für miR-21. HeLa-Zellen exprimieren miR-21, sodass es zur Spaltung der *Firefly*-Luziferase-mRNA kommt, wenn funktionales, miR-21-beladenes Ago2-Protein vorhanden ist. Die Expression der *Renilla*-Luziferase unterliegt keiner miRNA-vermittelten Regulation. Dieses Protein dient daher zur Normierung der Reporter-Expressionslevel.

Wie zu erwarten wurde im Experiment infolge des *Ago2-knock-down* eine erhöhte *Firefly*-Luziferase-Aktivität gemessen (Abb. 4.39 A, „H<sub>2</sub>O“). In Übereinstimmung mit den *in*

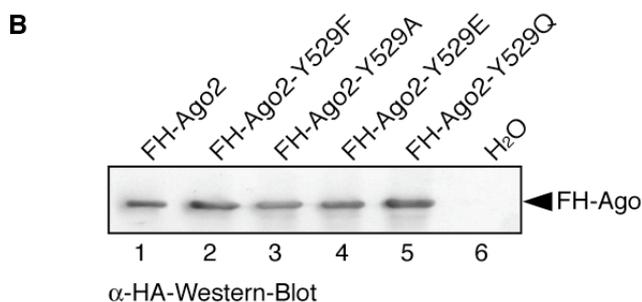
*in vitro* RISC-Daten führte die Expression von FH-Ago2, -Y529F, -Y529A und -Y529Q zur Korrektur des Ago2-*knock-down*-Phänotyps, nicht aber die Expression der Y529E-Mutante (Abb. 4.39 A).



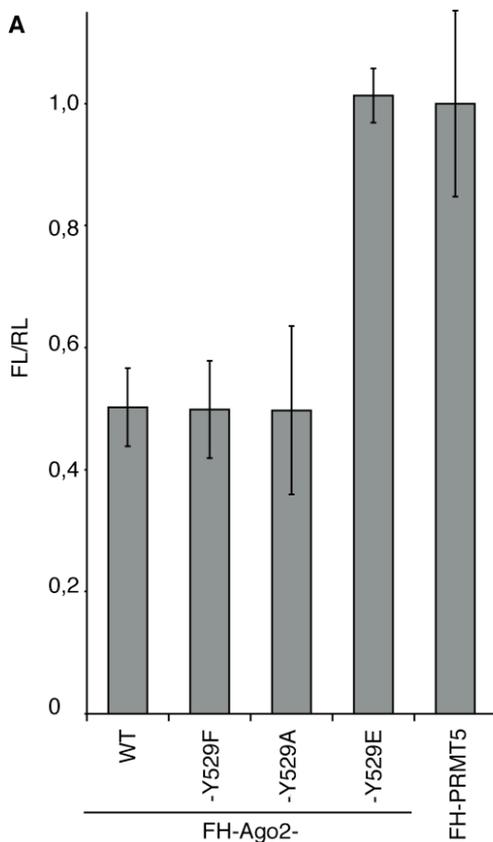
**Abbildung 4.39**

***slicer*-Aktivität von FH-Ago2-Y529E ist auch *in vivo* deutlich reduziert (I)**

HeLa Zellen wurden mit hsAgo2 (3'-UTR)-siRNA (A, graue Balken) oder einer Kontroll-siRNA (A, gelber Balken) transfiziert. Drei Tage danach wurde ein Reporter-RNA-Plasmid und wie angegeben FH-Ago2 (WT), -Y529F, -Y529A, -Y529E, Y529Q oder kein weiteres Plasmid (H<sub>2</sub>O) transfiziert. Das Reporter-RNA-Plasmid trägt Informationen zur unabhängigen Expression von *Renilla*- und *Firefly*-Luziferase. In der 3'-UTR der *Firefly*-Luziferase befindet sich eine perfekt komplementäre Bindungssequenz für miR-21. Das Transkript unterliegt daher der miR-21-vermittelten Expressionsregulation. Die *Renilla*-*Firefly*-Expression erfolgt miRNA-unabhängig. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen lysiert. (A) Relative *Firefly*-Luziferase-Aktivität (FL) aufgetragen gegen die exprimierte FH-Ago2-Proteinvariante. Von den Lysaten wurden identische Volumina zur Messung der Luziferase-Aktivitäten eingesetzt. Die Transfektionseffizienz des RNA-Reporters wurden anhand der *Renilla*-Luziferase-Aktivität (RL) normalisiert. Gezeigt ist das Ergebnis als Mittelwert dreier unabhängig durchgeführter Experimente. (B) Zur Dokumentation repräsentativer Expressionslevel der verschiedenen FH-Ago2-Proteinvarianten wurden identische Volumina der Zelllysate eines Experimentes via  $\alpha$ -HA-Western-Blot analysiert.

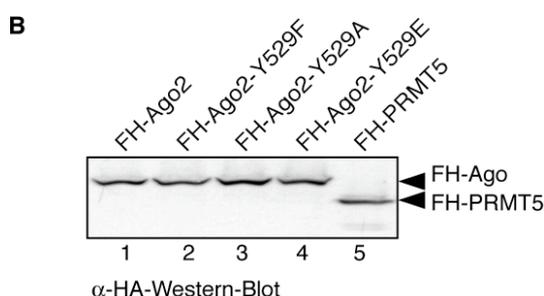


Das Experiment wurde in MEF Ago2<sup>-/-</sup> Zellen (Liu *et al.*, 2004) durchgeführt. Diese murinen Embryofibroblasten exprimieren kein endogenes Ago2-Protein, so dass ein Ago2-*knock-down* überflüssig war und die Versuchsdurchführung insgesamt verträglicher für die Zellen wurde. Es bestätigte sich, dass die Y529E-Mutante funktionales Ago2 nicht ersetzen kann (Abb. 4.40 A). Die relative *Firefly*-Luziferase-Aktivität war bei Expression der Glutaminsäuremutante ebenso hoch wie bei der Negativkontrolle PRMT5 (engl.: *protein arginine methyltransferase 5*). Im Gegensatz dazu konnte bei Expression von FH-Ago2, -Y529F- und -Y529A wie erwartet die Repression des RNA-Reporters beobachtet werden. Die relative *Firefly*-Luziferase-Aktivität betrug hier lediglich 50% (Abb. 4.40 A).



**Abbildung 4.40**  
***slicer*-Aktivität von FH-Ago2-Y529E ist auch *in vivo* deutlich reduziert (II)**

Das Reporter-Plasmid, dessen Eigenschaften der Legende zu Abb. 4.39 zu entnehmen sind, wurde zusammen mit FH-Ago2 (WT), -Y529F, -Y529A, -Y529E oder dem Kontrollkonstrukt -PRMT5 in MEF Ago2<sup>-/-</sup> Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert. (A) Relative *Firefly*-Luziferase-Aktivität aufgetragen gegen die jeweils exprimierte FH-Ago2-Proteinvariante. (B)  $\alpha$ -HA-Western-Blot. Weitere Informationen zu (A) bzw. (B) sind der Legende zu Abb. 4.39 zu entnehmen.



Die Ergebnisse der *in vivo* RISC-Experimente einerseits in Verbindung mit einem Ago2-*knock-down* (Abb. 4.39) andererseits mit MEF Ago2<sup>-/-</sup> Zellen (Abb. 4.40) bestätigen die *in vitro* RISC Daten (Abb. 4.36 und 4.37): Ago2-Y529E zeigte als einzige der Y529-Mutanten nahezu keine  *slicer*-Aktivität.

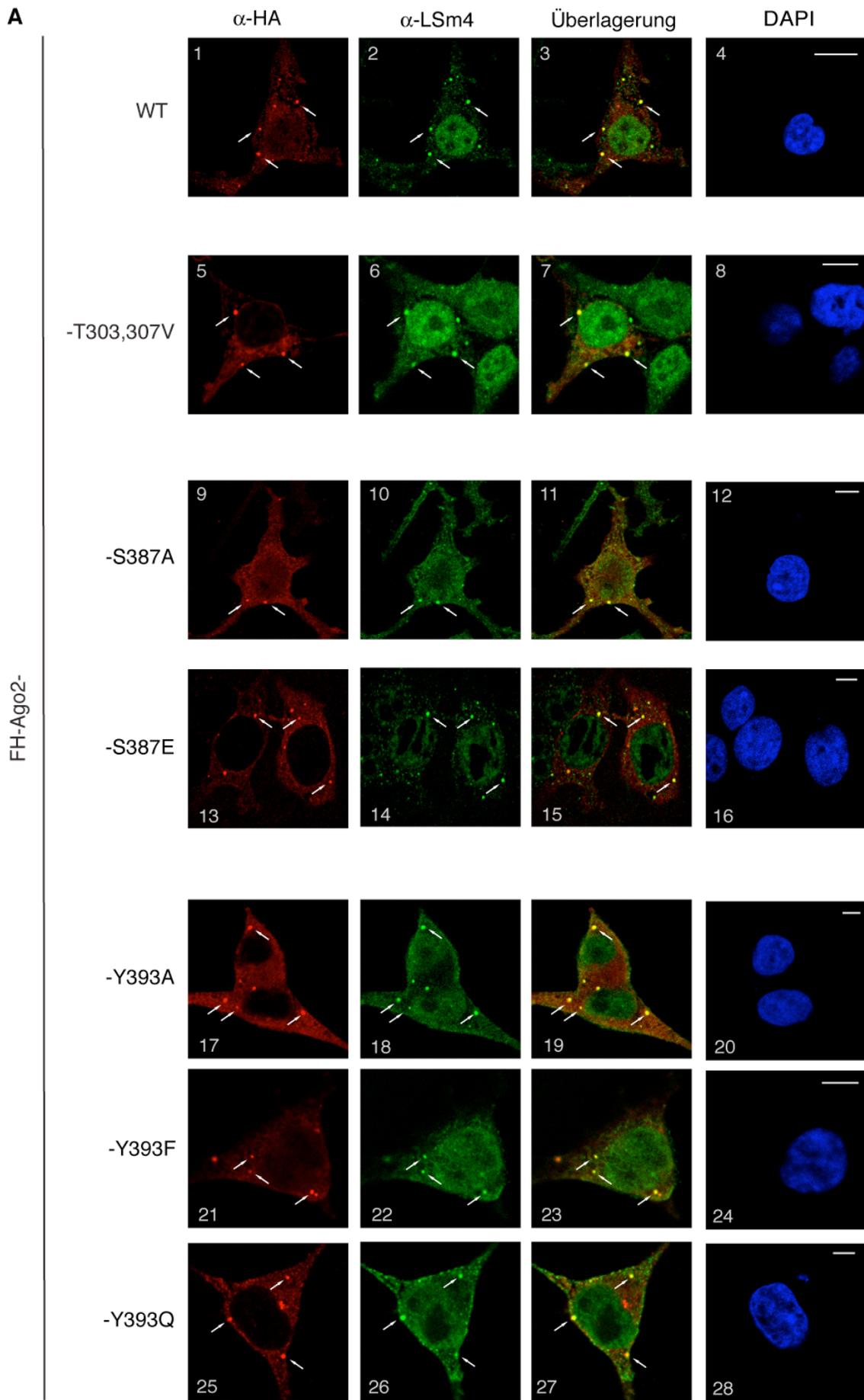
Eine weitere bekannte Eigenschaft von Ago-Proteinen *in vivo* ist ihre Lokalisierung in *processing bodies* (*P-bodies*, PBs; Abschnitt 2.6.2). Hierbei handelt es sich um hochmolekulare RNA-Protein-Aggregate im Zytoplasma, deren genaue Natur und funktionale Bedeutung noch nicht restlos geklärt ist (Eulalio *et al.*, 2007 (b); Kulkarni *et al.*, 2010; Abschnitt 2.6.2). Die subzelluläre Lokalisierung der Y529-Mutanten wurde in HEK 293 Zellen mittels konfokaler Immunofluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Daneben wurde die räumliche Verteilung der Ago2-Mutanten T303,307V und Y393A, -F und -Q analysiert, für die bislang keine Defizite detektiert werden konnten (Abb. 4.20). Von den Serinphosphorylierungsmutanten wurden Ago2-S387A und -S387E ausgewählt. Die Phosphorylierung dieses Serinrestes soll die Lokalisierung von Ago2 in PBs begünstigen (Zeng *et al.*, 2008). Als PB-Markerprotein diente endogenes LSM4-Protein, das auch im Kern präsent ist (vgl. Abschnitt 4.1.2.4). Die Plasmidkonstrukte der verschiedenen Mutanten wurden in HEK 293 Zellen transfiziert. Nach Fixierung der Zellen erfolgte die Detektion der Proteine mittels  $\alpha$ -HA- bzw.  $\alpha$ -LSM4-Antikörper. Weder für die Threonin- noch für die Y393-Mutanten waren Auffälligkeiten im zellulären Verteilungsmuster gegenüber dem Wildtypprotein zu beobachten (Abb. 4.41, Box 5-8 und 17-28 im Vergleich zu 1-4). Alle co-lokalisieren mit LSM4 in granulären, zytoplasmatischen Strukturen (Abb. 4.41 A, Box 3, 7, 19, 23, 27). Das gleich gilt für FH-Ago2-S387A und -E (Abb. 4.41 A, Box 9-16), doch schien die Anzahl der granulären Strukturen bei Expression der S387E-Mutante höher zu sein (Abb. 4.41 A, Box 9 und 13). S387E imitiert die phosphorylierte Form von S387, so dass das Ergebnis nach Zeng *et al.* (2008) zu erwarten war. Tatsächlich aber handelt es sich bei den detektierten Zellkörperchen nicht zweifelsfrei um PBs: LSM4 war nur in einigen nachweisbar (Abb. 4.41 A, Box 14 und 15). Für die Mutanten Y529F und Y529A

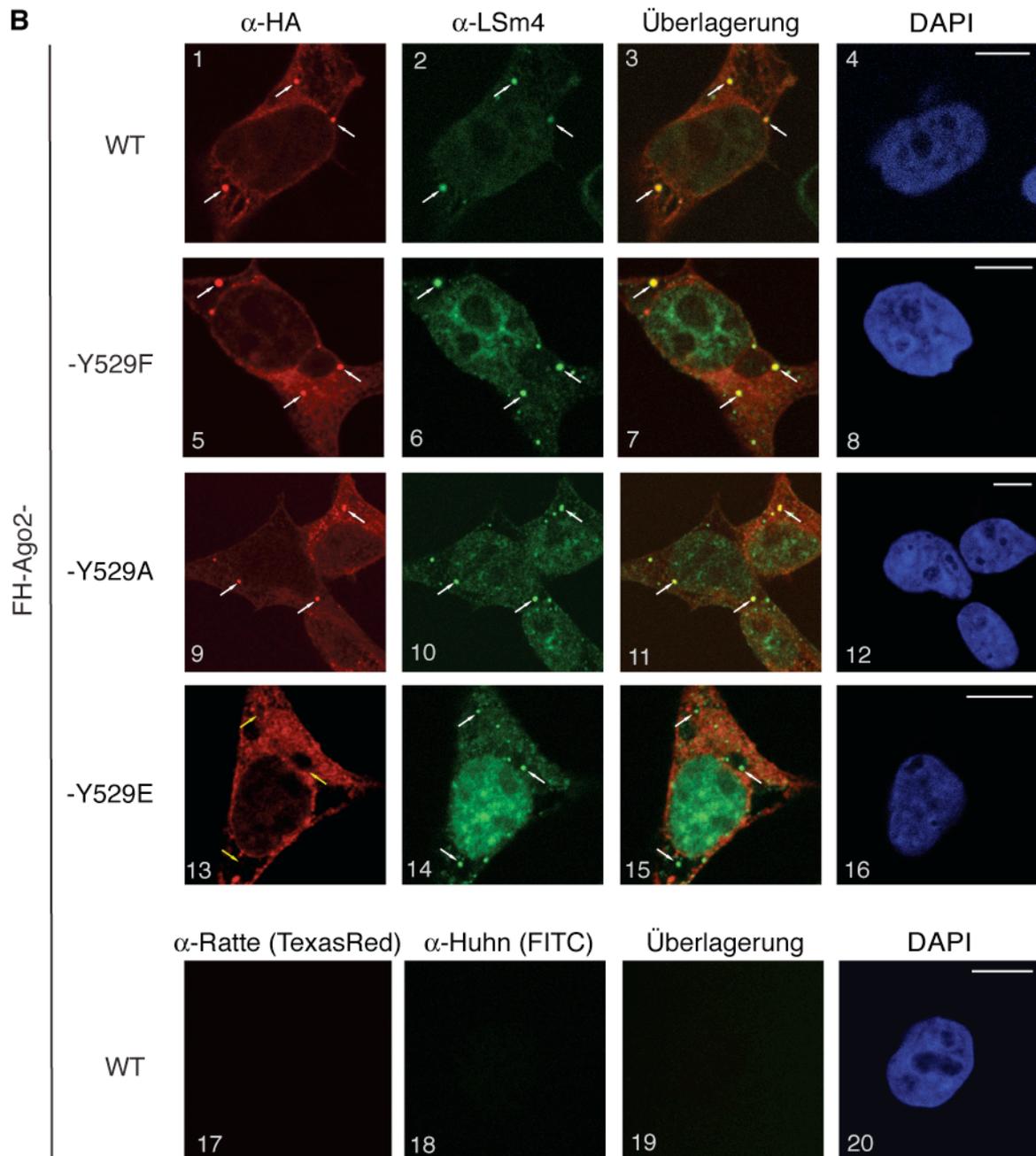
konnte eine Lokalisierung in PBs beobachtet werden (Abb. 4.41 B, Box 1-12). Die zelluläre Verteilung der Y529E-Mutante dagegen zeigte keine eindeutige Co-Lokalisierung mit LSm4. Die Ago2-Variante war vielmehr gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, während LSm4 in granulären Strukturen detektiert werden konnte (Abb. 4.41 B, Box 13-16). Die Expression von FH-Ago2-Y529E scheint demnach die PB-Ausbildung *per se* nicht zu beeinflussen.

#### **Abbildung 4.41**

##### **Zelluläre Verteilungsmuster verschiedener Ago2-Phosphorylierungsmutanten**

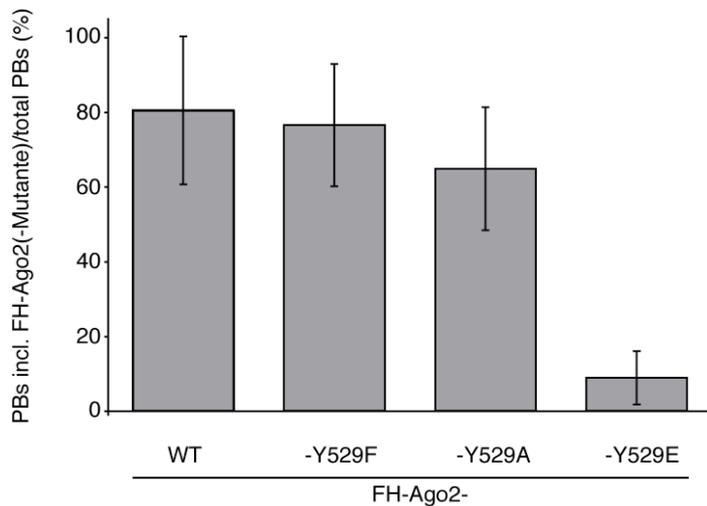
FH-Ago2-Wildtyp (WT) (A, Box 1-4 und B, Box 1-4, 17-20), -T303/307V (A, Box 5-8), -S387A (A, Box 9-12) und -E (A, Box 13-16), -Y393A (A, Box 17-20), -F (A, Box 21-24) und -Q (A, Box 25-28) sowie Y529F (B, Box 5-8), -A (B, Box 9-12) und -E (B, Box 13-16) wurden in HEK 293 Zellen exprimiert. Für die indirekte Detektion der Proteine wurden die fixierten Zellen mit  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -LSm4-Antikörper sowie sekundären Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren, behandelt. Endogenes LSm4-Protein fungierte als Markerprotein für *processing bodies* (PBs). Der Zellkern wurde über DAPI-Färbung der DNA sichtbar gemacht (Spalte 4). In der dritten Spalte ist die Überlagerung der Ergebnisse der  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -LSm4-Antikörperbehandlung gezeigt. Die Analyse der Zellpräparationen erfolgte via konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie. (B) Box 17-20: Die FH-Ago2 exprimierenden und fixierten Zellen wurde ausschließlich mit den Sekundärantikörpern und DAPI behandelt. PBs sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Gelbe Pfeile markieren die Stelle, wo ein Signal zu erwarten gewesen wäre (B, Box 13). Die Balkenlänge entspricht 10  $\mu$ m.

Balken entsprechen 10  $\mu$ m



Für die objektive Bewertung der zellulären Verteilung der Y529-Mutanten wurden für jede Ago2-Variante 100 PBs hinsichtlich Co-Lokalisierung von Mutante und LSm4 ausgewertet. Dazu wurde die PB-Anzahl bestimmt, in denen die jeweilige Y529-Mutante nachgewiesen werden konnte, und zur Gesamtzahl der registrierten PBs in Verhältnis gesetzt. Für jede Mutante wurden verschiedene Zellpräparationen analysiert. Die graphische Darstellung des Ergebnisses lässt einen klaren Unterschied in der zellulären Verteilung der Y529-Mutanten

erkennen: Während Ago2-Wildtyp und die beiden Mutanten Y529F und -A in rund 70-80% der LSM4-positiven PBs nachweisbar waren, so traf das bei Y529E nur in 10% der Fälle zu (Abb. 4.42).

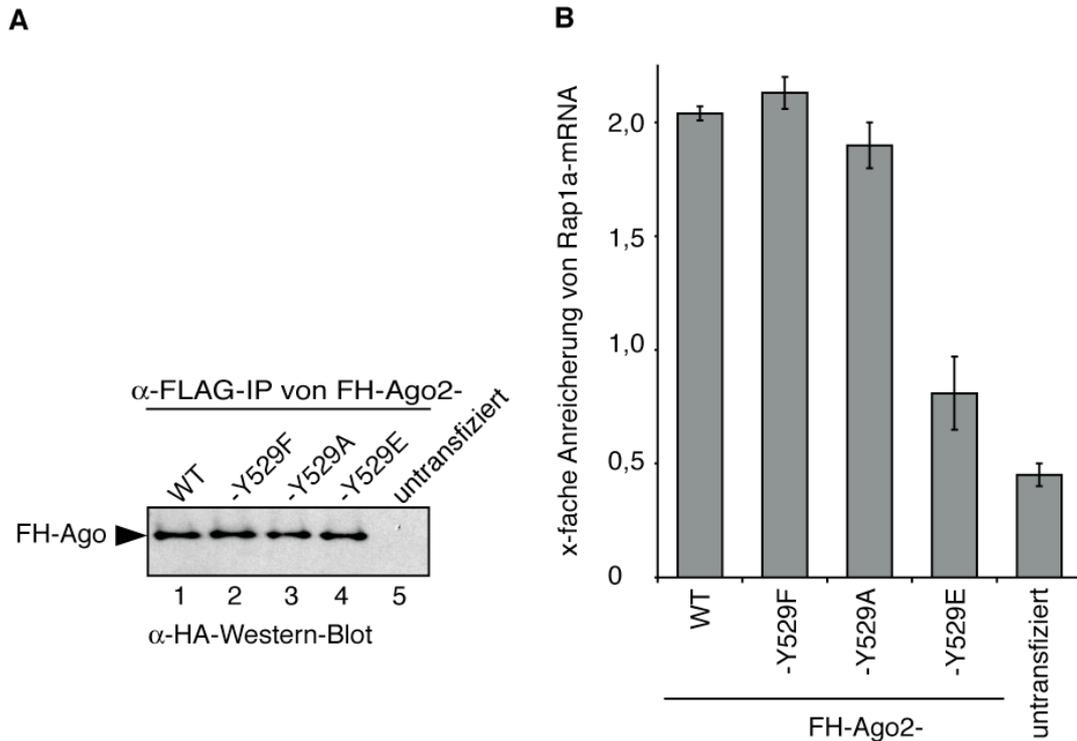


**Abbildung 4.42**  
**Y529E-Substitution behindert die PB-Lokalisierung dieser Ago2-Mutante**

Für die Quantifizierung wurden je 100 PBs für FH-Ago2-Wildtyp (WT), -Y529F, -Y529A und -Y529E in verschiedenen, unabhängigen Immunofluoreszenz-Experimenten analysiert. Der PB-Anteil, für den das jeweilige Fusionsprotein neben LSM4 nachweisbar war, wurde relativ zur PB-Gesamtanzahl bestimmt und das Ergebnis als Balkendiagramm dargestellt.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass weder die Aminosäuren T303/307, noch Y393 oder Y529 für die Ausbildung von PBs oder die dortige Lokalisierung von Ago2 essentiell sind. Der Austausch von Y529 gegen Phenylalanin oder Alanin rief keine veränderte PB-Lokalisierung der Proteine hervor, sondern nur die Glutaminsäuresubstitution, die mit ihrer negativen Ladung den phosphorylierten Zustand von Y529 imitiert (Abb. 4.41 B). Auch die Daten der Tyrosinkinase-Co-Expressionen ließen vermuten, dass die Tyrosinphosphorylierung mit der Assemblierung größerer Ago2-RNPs interferiert (Abschnitt 4.2.3.2, Abb. 4.26). PBs stellen letztlich makromolekulare RNPs dar. Diesem Gedanken folgend wurde die *in vivo*-Assoziation der Y529-Mutanten mit physiologischen *target*-RNAs untersucht. Dazu wurden die FH-Y529-Proteine in HEK 293 Zellen exprimiert und zwei Tage später mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus dem Zelllysat immunopräzipitiert. Gesamt-RNA aus den eingesetzten Lysaten und die mit den Immunopräzipitaten assoziierte RNA wurde isoliert und die Menge einer spezifischen *target*-mRNA via quantitativer Echtzeit-PCR (engl.: *quantitative real-time PCR*, kurz: qRT-PCR) ermittelt. Als physiologische *target*-RNA aus HEK 293 Zellen wurde die

Rap1a-mRNA gewählt, die durch miR-19b reguliert wird (unveröffentlichte Daten von Dr. M. Beitzinger, Arbeitsgruppe Meister). Anhand der qRT-PCR-Ergebnisse konnte der Anreicherungsfaktor der Rap1a-mRNA für die einzelnen Immunopräzipitationsansätze bestimmt werden (Abb. 4.43 B, Abschnitt 6.2.5.12). Obgleich mit der IP von allen Mutanten vergleichbare Proteinmengen isoliert worden waren (Abb. 4.43 A), lieferten nur Ago2 und die Mutanten Y529F und -A auch hinsichtlich der assoziierten Rap1a-mRNA-Menge einander ähnliche Ergebnisse. Für diese drei Proteine ergab sich ein *target*-RNA-Anreicherungsfaktor von 2 (Abb. 4.43 B). Im Gegensatz dazu lag der Faktor von FH-Ago2-Y529E bei 0,75 und damit nur geringfügig höher als der der Negativkontrolle. Die Negativkontrolle diente zur Identifikation unspezifischer Rap1a-mRNA-Assoziation mit der Antikörpermatrix. Für sie wurde Lysat untransfizierter Zellen eingesetzt (Abb. 4.43 B, „untransfiziert“). Offensichtlich behindert die Glutaminsäuresubstitution die *target*-RNA-Assoziation der Ago2-Mutante. Diese *in vivo* Daten unterstützen somit die Vermutung, dass eine negative Ladung in der 5'-miRNA-Bindungstasche mit der Assemblierung größerer Ago2-RNPs – wie zum Beispiel RISC oder PBs – interferiert.



**Abbildung 4.43**

**Y529E-Mutation beeinträchtigt die *target*-RNA-Assoziation von Ago2**

FH-Ago2 (A, Spur 1), -Y529F (A, Spur 2), -Y529A (A, Spur 3) und -Y529E (A, Spur 4) wurden in HEK 293 Zellen exprimiert und mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus den hergestellten Totallysaten immunpräzipitiert. (A) Ein Teil der Immunpräzipitate wurde zur Dokumentation der Proteinmengen via  $\alpha$ -HA-Western-Blot verwendet. (B) Gesamt-RNA aus den Totallysaten und mit den Immunpräzipitaten assoziierte RNA wurde isoliert und für die quantitative Echtzeit-PCR (engl.: *quantitative real-time PCR*, qRT-PCR) aufbereitet. Als spezifische *target*-RNA fungierte die miRNA-19b-regulierte Rap1a-mRNA (unveröffentlichte Daten von Dr. M. Beitzinger). Die Normierung der qRT-PCR-Resultate erfolgte anhand der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH-)mRNA. Aus dem Verhältnis der co-immunpräzipitierten RNA-Menge zu der im Totallysat wurden die jeweiligen Anreicherungsfaktoren bestimmt, die für die Rap1a-mRNA relativ zu denen von GAPDH im Balkendiagramm dargestellt sind. Zugrunde liegen drei unabhängige Versuchsdurchführungen, die jeweils als Vierfachansatz pipettiert wurden.

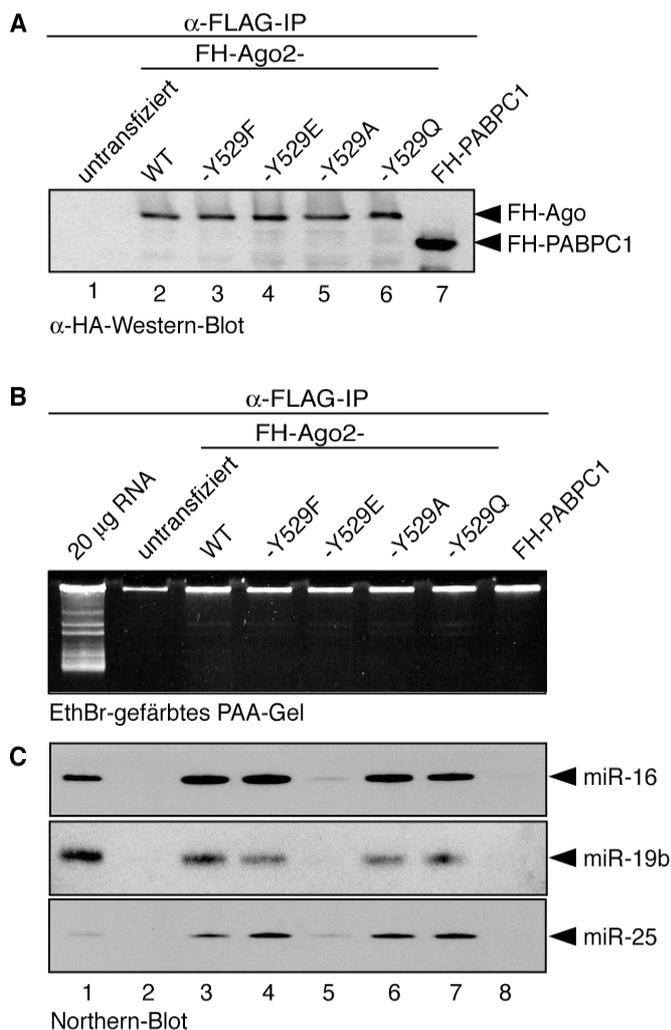
#### 4.2.4.3 Defizite von Ago2-Y529E resultieren aus gestörter miRNA-Protein-Interaktion

Die Ago2-Y529E-Mutante gleicht in ihrem Proteininteraktionsverhalten dem Wildtypprotein und auch im *tethering*-Assays konnten keine negativen Auswirkungen der Punktmutation beobachtet werden (Abschnitt 4.2.4.1). Das Protein scheint daher strukturell intakt und grundsätzlich funktional zu sein. In weiteren Untersuchungen sind jedoch verschiedene Defekte insbesondere bei dieser Mutante offenkundig geworden. Dazu zählen:

- a) eine stark reduzierte RISC-Aktivität *in vitro*, unabhängig davon, ob die Beladung mit der kleinen RNA *in vivo* oder *in vitro* erfolgte (Abb. 4.36, 4.37),
- b) das Unvermögen, fehlendes funktionales Ago2 *in vivo* zu ersetzen (Abb. 4.39, 4.40),
- c) der nahezu vollständige Verlust der Lokalisierung in sichtbaren PBs (Abb. 4.41, 4.42) und
- d) eine Störung der physiologischen *target*-mRNA-Assoziation (Abb. 4.43).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Y529E-Mutation speziell auf die Interaktion des Proteins mit RNA auswirkt. Aus diesen Überlegungen heraus wurde in den nächsten Experimenten das miRNA-Bindungsverhalten der Y529-Mutanten untersucht. FH-Ago2, -Y529F, -Y529E, -Y529A, -Y529Q und als Negativkontrolle das mRNA- aber nicht miRNA-bindende Protein FH-PABPC1 wurden in HEK 293 Zellen exprimiert, schließlich mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitiert und die assoziierte RNA für die Northern-Blotanalyse isoliert. Das PABPC1-Protein war nach der IP überrepräsentiert (Abb. 4.44 A, Spur 7). Doch Ago2 und die Ago2-Mutanten untereinander waren hinsichtlich der immunopräzipitierten Proteinmengen vergleichbar (Abb. 4.44 A, Spur 2-6). Auch die verschiedenen Nukleinsäurepräparationen waren von ähnlicher Qualität (Abb. 4.44 B; vgl. auch Ausführungen zu Abb. 4.6). Für die Analyse der miRNA-Bindung wurden radioaktiv markierte Sonden gegen miR-16, miR-19b und miR-25 eingesetzt. Alle drei miRNAs konnten im Immunopräzipitat des Wildtypproteins und der Mutanten Y529F, -A und -Q eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 4.44 C, Spur 3-4, 6-7), nicht aber in dem der Y529E-Mutante (Abb. 4.44 C, Spur 5). Das bedeutet, dass ein aliphatischer Aminosäurerest in Position 529 von Ago2 die miRNA-Bindung *per se*

erlaubt (Abb. 4.44 C, Spur 6-7), ein Glutaminsäurerest an dieser Stelle aber einen nahezu vollständigen Verlust dieser Eigenschaft bewirkt (Abb. 4.44 C, Spur 5). Somit scheint das Defizit speziell aus der negativen Ladung zu resultieren, die mit dem Aminosäureaustausch in der miRNA-Bindungstasche platziert worden ist.

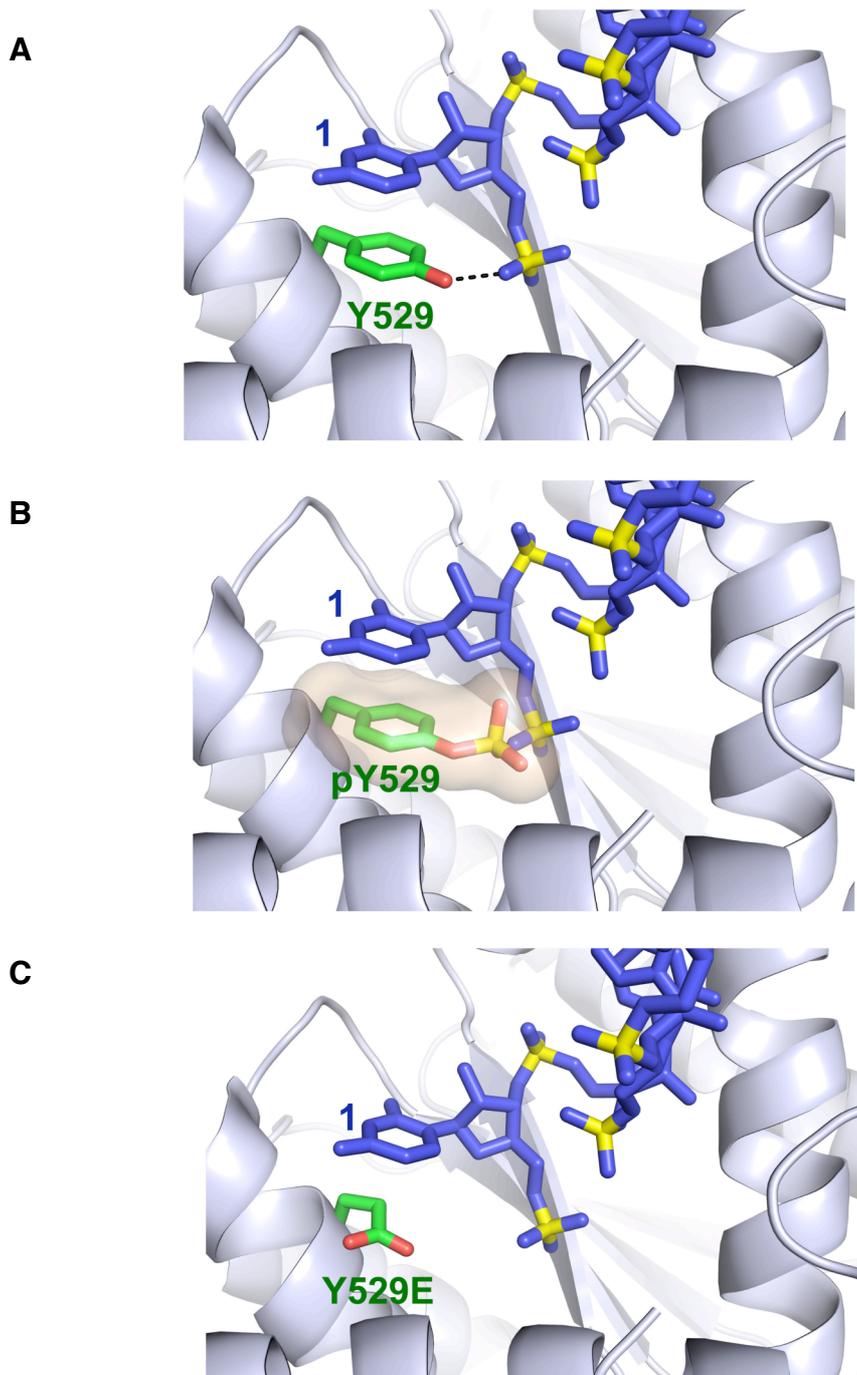


#### Abbildung 4.44

##### Y529E-Mutation bewirkt eine drastisch reduzierte miRNA-Bindung bei Ago2

FH-Ago2, -Y529F, -Y529E, -Y529A, -Y529Q und als Negativkontrolle -PABPC1 wurden in HEK 293 Zellen exprimiert und zwei Tage später mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus den hergestellten Totallysaten immunopräzipitiert. Als weitere Spezifitätskontrolle für den miRNA-Nachweis wurde neben PABPC1 auch Lysat untransfizierter Zellen für die Immunopräzipitation eingesetzt (untransfiziert). Für die Western- und Northern-Blotanalysen wurden die Immunopräzipitate aufgeteilt: (A)  $\alpha$ -HA-Western-Blot zur qualitativen und quantitativen Einschätzung der immunopräzipitierten Fusionsproteine. (B) Von den zurückgehaltenen Proben wurden die assoziierten Nucleinsäuren isoliert, gereinigt und via RNA-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend zur Qualitätskontrolle der Nucleinsäurepräparation mit Ethidiumbromid (EthBr) gefärbt. (C) Northern-Blotanalyse. Die Nucleinsäuren wurden aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Die miRNA-Detektion erfolgte mit 5'-<sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden gegen miR-16 (oben), miR-19b (Mitte) und miR-25 (unten). Die Membran wurde dazu mit der jeweiligen Sonde inkubiert, das Ergebnis analysiert und die Sonde abschließend via *stripping* (Abschnitt 6.2.5.4) entfernt. Abgebildet sind die verschiedenen Radiogramme. Als Positivkontrolle für den miRNA-Nachweis wurde 20  $\mu$ g Gesamt-RNA aus HEK 293 Zellen geladen (Spur 1).

Nach dem Coulomb'schen Gesetz stoßen sich elektrische Ladungen gleichen Vorzeichens ab. Daher scheint es durchaus vorstellbar, dass die negativ-geladene Carboxylgruppe des Glutaminsäurerestes an Position 529 die Bindung einer miRNA mit ihrer ebenfalls negativ-geladenen 5'-Phosphatgruppe unterbinden könnte. Übertragen auf die physiologischen Bedingungen hieße das, dass die Phosphorylierung des Tyr-529 von Ago2 möglicherweise eine miRNA-Bindung verhindern könnte. In einer ersten Annäherung an diese Hypothese wurden in Kooperation mit Yanli Wang aus der Arbeitsgruppe von Dinshaw J. Patel (Sloan-Kettering Institut, NY, USA) Strukturen der Bindungstasche für das 5'-Ende der miRNA zu den verschiedenen molekularen Konstellationen modelliert (Abb. 4.45). Die Kristallstruktur des Argonaute-Proteins Piwi von *Archaeoglobus fulgidus*, dessen Tyrosin123 dem Tyrosin529 des humanen Ago2-Proteins entspricht, bildete dabei den Ausgangspunkt. Aus der ursprünglichen Kristallstruktur geht hervor, dass im dephosphorylierten Zustand zwischen der Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes und der 5'-Phosphatgruppe der kleinen RNA eine Wasserstoffbrückenbindung besteht (Ma *et al.*, 2005; Proteindatenbank 2BGG; Abb. 4.45 A). Daneben kommt es zum *stacking* zwischen den aromatischen Ringsystemen von Y529 und dem ersten 5'-Nukleotid der miRNA (Abb. 4.45 A). Die modellierte Phosphorylierung von Y529 offenbarte, dass es zu einer Kollision der Phosphatgruppen am 5'-Ende der miRNA und der des phosphorylierten Tyrosin529 kommen würde (Abb. 4.45 B). Eine Co-Existenz beider Phosphatgruppen wäre unter den gegebenen räumlichen Bedingungen demnach eher unwahrscheinlich, sowohl aus sterischen als auch aus elektrostatischen Gründen. Der Austausch von Tyrosin529 gegen Glutaminsäure würde dem Strukturmodell zufolge zwar keine sterisch bedingte Verdrängung der miRNA-5'-Phosphatgruppe hervorrufen, aber es wären im Fall einer miRNA-Bindung zwei negative Ladungen in der Bindungstasche präsent, die sich folglich gegenseitig abstoßen würden (Abb. 4.45 C). Die Erkenntnisse aus Abb. 4.45 B und C zusammengenommen legen nahe, dass die mit Y529E beobachteten Effekte beim endogenen, Y529-phosphorylierten Ago2 durch die zusätzliche sterische Behinderung der miRNA-Bindung stärker ausgeprägt sein könnten.



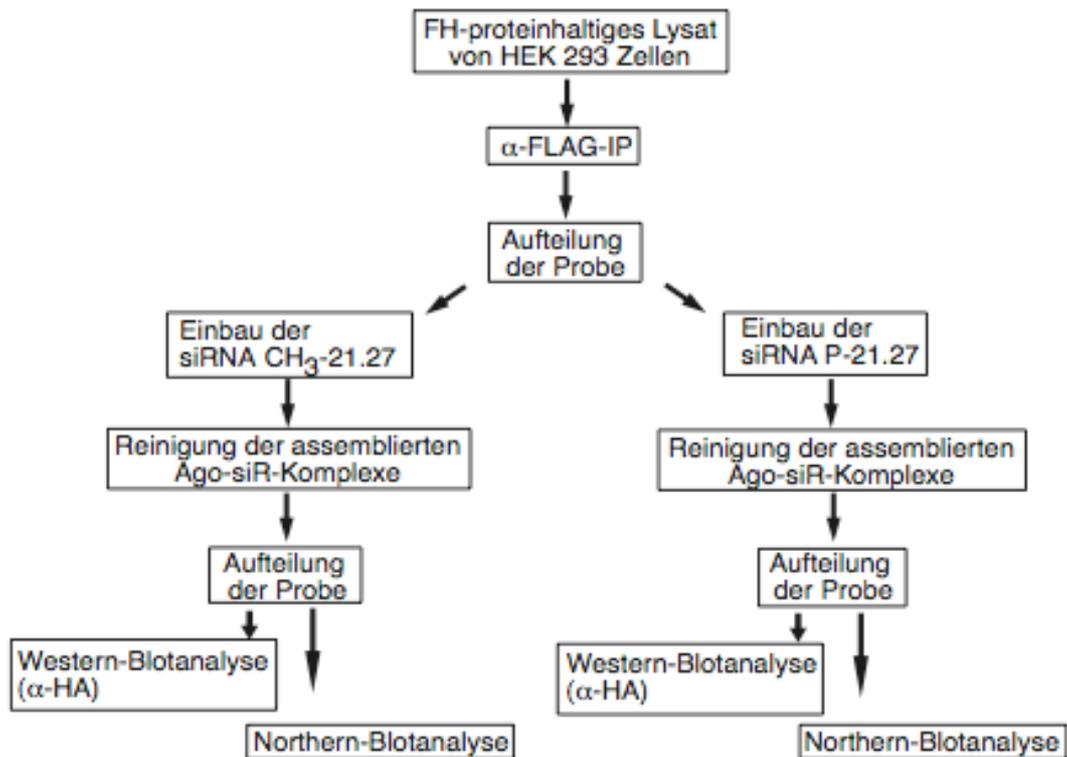
**Abbildung 4.45**

**Dreidimensionale Modellierung verschiedener molekularer Verhältnisse in der 5'-miRNA-Bindungstasche von Ago2**

Der Modellierung liegt die Kristallstruktur des Argonaute-Proteins Piwi aus *Archaeoglobus fulgidus* zugrunde, dessen Tyrosin123 dem Tyrosin529 des humanen Ago2-Proteins entspricht (Proteindatenbank 2BGG). Das Protein ist in Grau, die miRNA in Blau mit gelben Phosphoratomen wiedergegeben. Neben der RNA ist auch die Seitenkette von Y529 im Stäbchenmodell dargestellt. „1“ bezeichnet das erste 5'-Nukleotid der gebundenen, kleinen RNA. (A) Die zwischen Y529 und der 5'-Phosphatgruppe der kleinen RNA bestehende Wasserstoffbrücke ist durch eine gestrichelte Linie angedeutet. (B) Y529 wurde durch einen Phosphotyrosinrest ersetzt. Der Raumbedarf der modifizierten Seitenkette ist angedeutet. (C) Modell der miRNA-Bindungstasche der Ago2-Y529E-Mutante. Alle Strukturmodelle wurden von Yanli Wang aus der Arbeitsgruppe von Dinshaw J. Patel (Sloan-Kettering Institut, NY, USA) erstellt.

Die Hypothese des elektrostatisch bedingten miRNA-Bindungsausschlusses kann mit der Y529E-Mutante und einer am 5'-Ende methylierten und somit ungeladenen, neutralen kleinen RNA getestet werden. Chen und Kollegen (2008) haben gezeigt, dass einzelsträngige, 5'-methylierte RNA in unmodifizierte Ago-Proteine *in vitro* eingebaut werden können. Aufgrund des elektrostatisch neutralen 5'-Endes der RNA sollte auch die Mutante Ago2-Y529E mit der methylierten RNA beladen werden können.

Es wurden die FH-Ago2-Y529-Mutanten und die Kontrollproteine FH-PABPC1 und -GFP aus HEK 293 Zelllysate mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitiert und jede Probe anschließend aufgeteilt: Zu einer Hälfte wurde einzelsträngige siRNA 21.27 mit negativ geladener 5'-Phosphatgruppe (P-21.27) gegeben, zu der anderen 21.27 mit ungeladener 5'-Methylgruppe (CH<sub>3</sub>-21.27; Chen *et al.*, 2008). Nach dem *in vitro*-Einbau wurden die assemblierten RNA-Ago-Komplexe mittels  $\alpha$ -FLAG-IP gereinigt und via Western- und Northern-Blot analysiert. In Abbildung 4.46 ist die Durchführung skizziert.



**Abbildung 4.46**

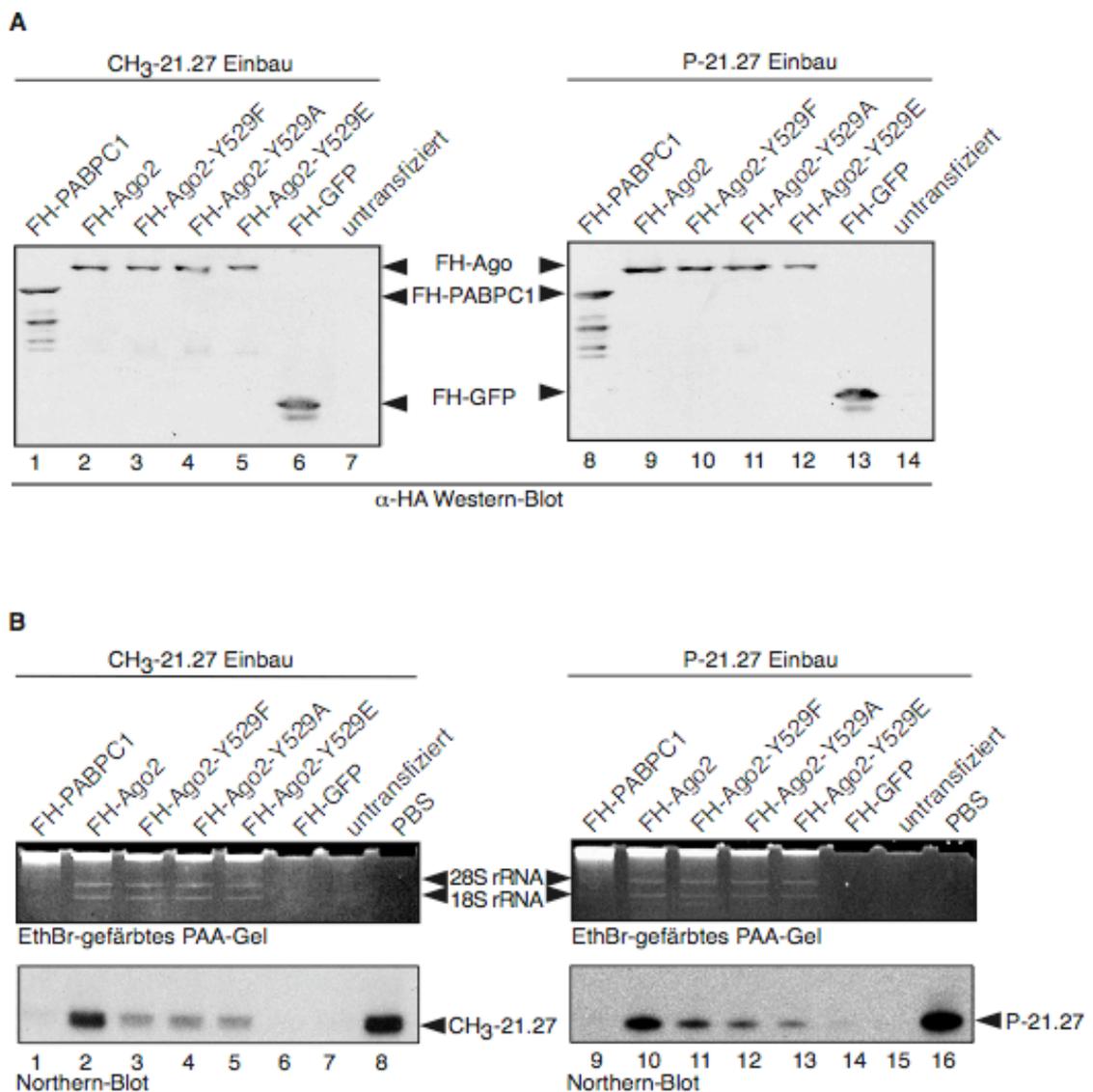
**Flussdiagramm zur Untersuchung des Einbaus 5'-modifizierter kleiner RNAs in die Ago2-Y529-Mutanten**

Die Proteine von Interesse wurden in HEK 293 Zellen als FH-Fusionsproteine exprimiert und mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper immunopräzipitiert. Jeder Ansatz wurde geteilt und *in vitro* entweder mit am 5'-Ende methylierter und daher ungeladener RNA (CH<sub>3</sub>-21.27) oder mit 5'-phosphorylierter und daher negativ-geladener RNA (P-21.27) beladen. Danach wurden die assemblierten Komplexe durch eine weitere Immunopräzipitation gereinigt, die Proben erneut aufgeteilt und via  $\alpha$ -HA-Western- und Northern-Blot analysiert.

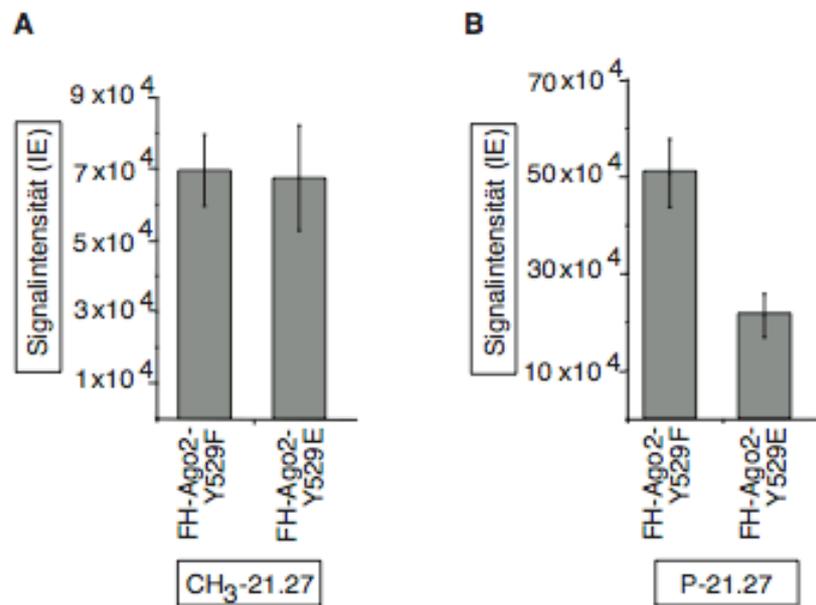
Die kleinen RNAs waren während der Versuchsdurchführung stabil (Abb. 4.47 B unten, Spur 8 und 16). Die Ergebnisse der Negativkontrollen entsprachen den Erwartungen: Es wurde keine Co-Immunopräzipitation der angebotenen kleinen RNAs beobachtet (Abb. 4.47 B unten, Spur 1, 6-7 and 9, 14-15). Für alle Ago2-Varianten waren die immunopräzipitierten Proteinmengen (Abb. 4.47 A, Spur 2-5 und 9-12) und Nukleinsäurepräparationen (Abb. 4.47 B oben, Spur 2-5 und 10-13) qualitativ und quantitativ vergleichbar. Die Beladung mit den kleinen RNAs jedoch erwies sich je nach 5'-Modifikation und Mutante als unterschiedlich erfolgreich (Abb. 4.47 B unten). Die methylierte RNA CH<sub>3</sub>-21.27 wurde am Effektivsten in das Wildtypprotein eingebaut, während sie von allen Y529-Mutanten eindeutig schlechter aufge-

nommen wurde (Abb. 4.47 B unten, Spur 2 gegenüber 3-5). Interessanterweise schien der CH<sub>3</sub>-21.27-Gehalt der Mutanten untereinander jedoch nahezu identisch. Selbst von der E-Mutante konnten ähnliche CH<sub>3</sub>-21.27-Mengen isoliert werden wie von der F- und A-Mutante (Abb. 4.47 B unten, Spur 3-5). Im Gegensatz dazu zeigten sich mit der 5'-phosphorylierten RNA P-21.27 individuelle Unterschiede bei der Einbaueffizienz in die verschiedenen Ago2-Mutanten (Abb. 4.47 B unten, Spur 10-13). Zwar lies sich auch hier vom Wildtypprotein der größte Anteil an P-21.27 isolieren (Abb. 4.47 B unten, Spur 10), aber anders als bei CH<sub>3</sub>-21.27 nahm die P-21.27-Beladung von Ago2-Y529F über -Y529A bis zur Mutante Ago2-Y529E graduell ab (Abb. 4.47 B unten, Spur 11-13). Das Immunopräzipitat der E-Mutante wies den geringsten P-21.27-Gehalt auf.

Für eine objektive Bewertung der Einbaueffizienz von CH<sub>3</sub>- bzw. P-21.27 in die verschiedenen Ago2-Mutanten wurden die Northern-Blotergebnisse von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten quantifiziert. Tatsächlich waren die Signalintensitäten der Y529E-Mutante nahezu identisch mit denen der F-Mutante im Fall der methylierten RNA (Abb. 4.48 A). Mit der 5'-negativ-geladenen RNA dagegen beliefen sich die Signalintensitäten der E-Mutante nicht einmal auf die Hälfte derer der F-Mutante (Abb. 4.48 B).

**Abbildung 4.47****Elektrische Ladung am 5'-Ende der kleinen RNA ist entscheidend für Einbau in Y529-Mutanten**

FH-Ago2, -Y529F, -Y529A, -Y529E und die Kontrollproteine FH-PABPC1 und -GFP wurden mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus HEK 293 Zellysate immunopräzipitiert. Als weitere Kontrolle wurde Totallysate untransfizierter HEK 293 Zellen eingesetzt (untransfiziert). Der weitere Verlauf des Experimentes ist Abbildung 4.46 zu entnehmen. (A)  $\alpha$ -HA-Western-Blot. Von allen gereinigten Protein-RNA-Komplexen wurden gleiche Teile für die Western-Blotanalyse mit Proteinprobenpuffer versetzt. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mittels  $\alpha$ -HA-Antikörper. (B) Von den zurückgehaltenen RNA-Protein-Komplexen wurde die assoziierte RNA isoliert und im denaturierenden RNA-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (EthBr) gefärbt (oben) und die Nucleinsäuren anschließend auf eine Northern-Blotmembran transferiert. Nach Behandlung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen die RNA 21.27 wurde von der gewaschenen Membran ein Radiogramm aufgenommen (unten). Zur Kontrolle unspezifischen RNA-Abbaus wurde eine zusätzliche Reaktion mit PBS anstelle von Immunopräzipitat mitgeführt (Spur 8 und 16). Sofern bekannt, ist die Identität der verschiedenen Signale seitlich der Abbildungen angegeben (siehe Pfeile).

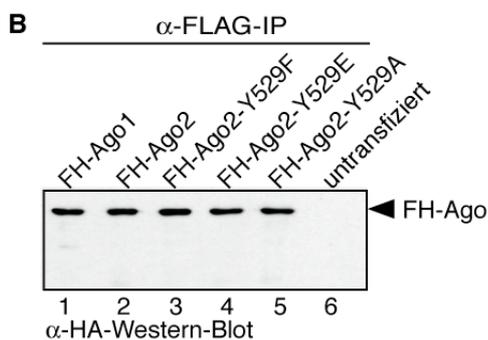
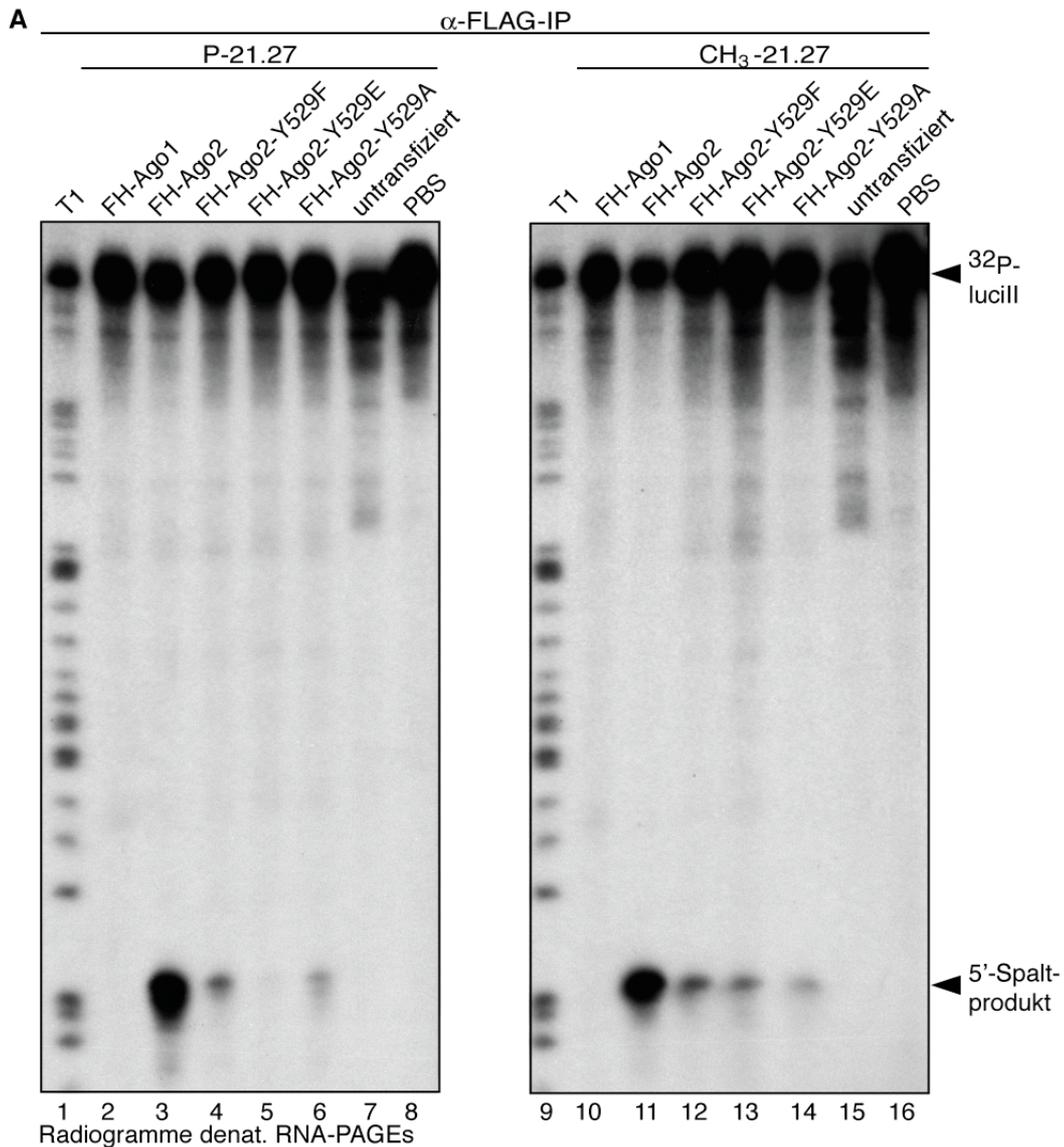


**Abbildung 4.48**  
**Quantifizierung der Einbaueffizienz 5'-modifizierter kleiner RNAs in die Ago2-Y529-Mutanten**

Mit dem Computerprogramm „ImageQuant“ wurden die Intensitätseinheiten („IE“) der 21.27-Northern-Blotsignale ermittelt, die für Y529F und Y529E in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten zur Inkorporation 5'-modifizierter kleiner RNAs beobachtet worden waren. Ein repräsentatives Beispiel gibt Abbildung 4.47 wieder. Die um den Hintergrund korrigierten Ergebnisse für CH<sub>3</sub>-21.27 (A) und für P-21.27 (B) sind als Balkendiagramme dargestellt.

Abschließend wurde der Einbau der 5'-modifizierten RNAs mit einem *in vitro* RISC-Assay kombiniert (Abb. 4.49). Neben der katalytischen Aktivität der jeweiligen Ago2-Mutante ist ein erfolgreicher Einbau der kleinen RNA die Voraussetzung dafür, dass es zur RISC-typischen Spaltung der *target*-RNA kommen kann (Abb. 2.3 B). Unabhängig von der 5'-Modifikation der angebotenen kleinen RNA zeigte das Immunopräzipitat des Wildtyp-proteins stets die höchste *slicer*-Aktivität (Abb. 4.49 A, Spuren 3-6 und 11-14). Erwartungsgemäß konnte mit Ago2-Y529E nach Inkubation mit der phosphorylierten RNA keine endonukleolytische Aktivität beobachtet werden (Abb. 4.49 A links, Spur 5). Infolge der Zugabe methylierter RNA ließ sich jedoch auch für diese Mutante RISC-spezifisches 5'-Spaltprodukt detektieren (Abb. 4.49 A rechts, Spur 13). Folglich wurde die CH<sub>3</sub>-21.27-RNA *in vitro* korrekt in die Glutaminsäuremutante eingebaut und erfolgreich gebunden.

Die katalytische Aktivität von Ago2-Y529E war dabei mit denen der F- und A-Mutante durchaus vergleichbar, wenn man die unterschiedlichen Mengen ungespaltener *target*-RNA berücksichtigt (Abb. 4.49 A rechts, Spur 12-14). Des weiteren belegt das Experiment, dass die Y529E-Mutation keine direkte Auswirkung auf die *slicer*-Aktivität und katalytische Triade des Proteins hat. Sie scheint ausschließlich die miRNA-Bindung zu betreffen.



**Abbildung 4.49****Ago2-Y529E bildet mit 5'-methylierte kleine RNAs aktiven RISC**

FH-Ago2, -Y529F, -Y529E, -Y529A und das Kontrollproteine FH-Ago1 wurden mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper aus HEK 293 Zelllysate immunpräzipitiert. Als weitere Kontrolle wurde Totallysat untransfizierter HEK 293 Zellen eingesetzt (untransfiziert). (A) *in vitro* RISC-Assay. Gleiche Teile jedes Immunpräzipitates wurden entweder mit 5'-phosphorylierter (P-21.27; links, Spur 2-8) oder mit 5'-methylierter (CH<sub>3</sub>-21.27; rechts, Spur 10-16) RNA inkubiert. Anschließend wurde die 5'-radioaktiv-markierte, 21.27-spezifische *target*-RNA lucill zugegeben. Zur Kontrolle unspezifischen RNA-Abbaus wurde eine zusätzliche Reaktion mit PBS anstelle von Immunpräzipitat mitgeführt (Spur 8 und 16). Die Analyse der Reaktionsansätze erfolgte nach Aufbereitung der RNA autoradiographisch. (B) Von allen Immunpräzipitaten wurde jeweils ein Drittel mit Proteinprobenpuffer versetzt und via  $\alpha$ -HA-Western-Blot analysiert.

Die Versuchsergebnisse zum Einbau kleiner RNAs mit elektrisch unterschiedlich geladenen 5'-Gruppen in die Ago2-Y529-Mutanten deuten darauf hin, dass für das beobachtete miRNA-Bindungsdefizit von Ago2-Y529E in der Tat die elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ-geladenen 5'-Phosphatgruppe der kleinen RNA und der ebenfalls negativ-geladenen Carboxylgruppe des Glutaminsäurerestes dieser Mutante verantwortlich ist. Das lässt mutmaßen, dass eine Y529-Phosphorylierung des endogenen Ago2-Proteins eventuell als molekularer Mechanismus zur Regulation der Ago2-miRNA-Bindung fungieren könnte.

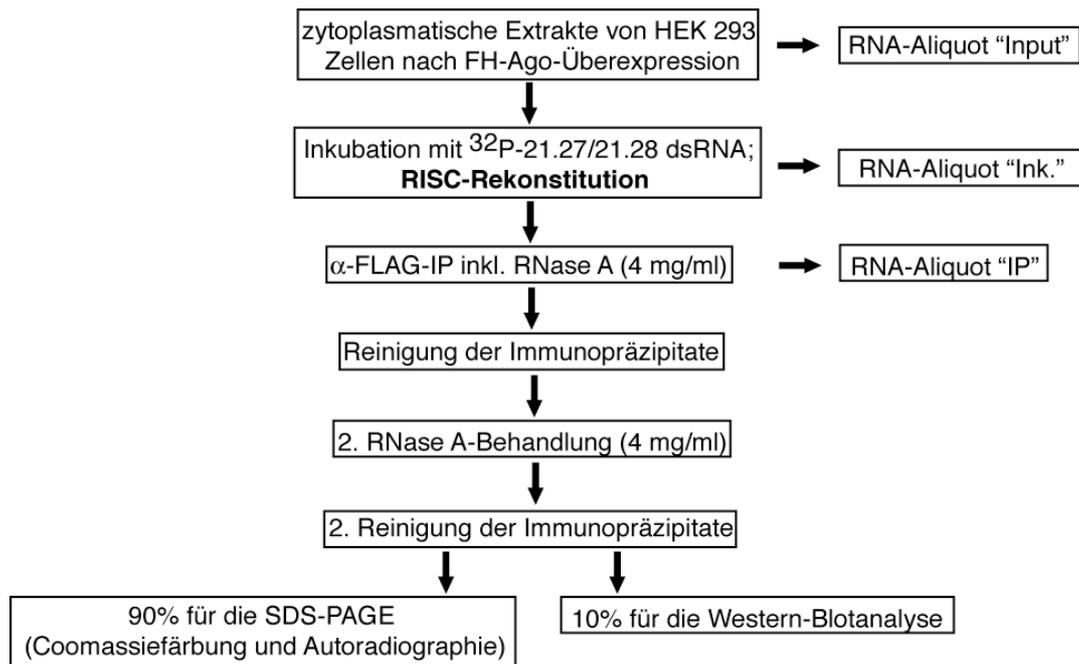
#### 4.2.4.4 Molekularer Mechanismus der Phosphorylierung von Ago2-Y529

Bislang konnte nicht geklärt werden, ob die bisherigen Erkenntnisse zur Ago2-Phosphorylierung und den Y529-Mutanten auch für das endogene Protein Gültigkeit haben, dessen Phosphorylierungsstatus unbekannt ist. Einen großen Fortschritt bei der Lösung dieses Problems würde die Identifikation der physiologischen Kinase(n) und/oder Phosphatase(n) darstellen. In Kooperation mit Disa Tehler aus der Arbeitsgruppe von Anders Lund (Biotech & Innovationszentrum der Universität Kopenhagen, Dänemark) wurde daher ein Kinase-siRNA-*screening* unternommen. Dafür wurde eine HeLa-Zelllinie verwendet, in deren Genom ein EGFP-Gen mit einer perfekt komplementären Bindungssequenz für miR-21 in der 3'-UTR stabil integriert worden war (Meister *et al.*, 2004 (b)). Unter physiologischen Bedingungen ist die EGFP-Expression durch die natürlicherweise in HeLa Zellen vorkommende miR-21 reprimiert. Hätte der *knock-down* einer Kinase Auswirkung auf den miRNA-Signalweg, so würde das an einer veränderten EGFP-Expression hervorrufen und könnte anhand der EGFP-Fluoreszenz gemessen werden. Als Negativkontrolle ohne spezifischen Einfluss auf die EGFP-Expression dienten die „*AllStars negative control siRNAs*“ (Qiagen, Deutschland), die laut Hersteller keine Hybridisierungsaffinität zu einem bekannten Säugertranskript aufweisen. Die hier detektierte EGFP-Fluoreszenz bildete den Basiswert, mit dem die Messwerte der Kinase-*knock-down*-Ansätze abgeglichen wurden. Als Positivkontrollen für die EGFP-Hochregulation infolge einer Störung des miRNA-Signalweges fungierten siRNAs gegen Ago2 (Meister *et al.*, 2004 (b)) und 2'-O-methylierte Oligoribonukleotide gegen miR-21 (Meister *et al.*, 2004 (a)). Beides blockiert die miR-21-vermittelte Repression der EGFP-Expression, so dass die Zellen mehr EGFP bilden und das Fluoreszenzsignal zunimmt. Demgegenüber wurde als Positivkontrolle für die Abnahme des EGFP-Signals infolge einer Aktivierung des miRNA-Signalweges ein miR-21-Expressionskonstrukt transfiziert, was zu einer erhöhten miR-21-Konzentration und somit gesteigerten Repression der EGFP-Expression führt. Für das *screening* wurden insgesamt 1782 siRNAs – jeweils drei verschiedene für jede der insgesamt 594 getesteten Kinasen - im 384-Kavitätenformat transfiziert. Das Experiment wurde

einmal vollständig wiederholt. EGFP-Signalintensitäten, die mindestens um ein Zweifaches der Standardabweichung vom Messwert der „*AllStars negative control siRNAs*“ abwichen, wurden als „Treffer“ gewertet, sofern das Ergebnis mit mindestens zwei der drei Kinase-spezifischen siRNAs beobachtet worden war. Wünschenswert wäre die Identifikation der Ago2-Kinase, die zur Phosphorylierung von Y-529 führt. Das hieße laut Arbeitshypothese, dass es infolge ihres *knock-down* zu einer Abnahme des EGFP-Signals im Vergleich zur Negativkontrolle kommen sollte, da eine reduzierte Y-529-Phosphorylierung gleichbedeutend mit einer Zunahme der Ago-miRNA-Komplexe sein sollte. Die miRNA-vermittelte Repression würde in dem Fall zu- und das Fluoreszenz-Messsignal abnehmen. Leider war jedoch eine signifikante Abnahme der EGFP-Fluoreszenz bei keiner der getesteten Kinasen zu beobachten (D. Tehler, mündliche Mitteilung). Dagegen wurde eine Zunahme des EGFP-Signals für ca. 20 Kinasen verzeichnet, bei denen es sich größtenteils um Serin-/Threoninkinasen handelte. Derzeit werden die *screening*-Ergebnisse validiert. Anschließend können sicherlich mehr Aussagen getroffen werden.

Die Kristallstrukturanalyse eines Archaeen Argonaute-Proteins suggeriert einen alternativen Phosphorylierungsmechanismus ohne Tyrosinkinase-Aktivität für den Tyrosinrest im Zentrum der Bindungstasche für das 5'-Ende der kleinen RNA (Ma *et al.*, 2005; Abb. 4.45). Die räumliche Nähe dieser Tyrosinseitenkette und der 5'-Phosphatgruppe der kleinen RNA lässt vermuten, dass der Phosphorylrest auch direkt von der RNA auf das Protein übertragen werden könnte. Die These wurde experimentell überprüft. Dafür wurde die kleine RNA 21.27 am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$  markiert, während der Gegenstrang 21.28, der später nicht in Ago2 eingebaut wird, keine 5'-Modifikation trug (Martinez *et al.*, 2002). Die gereinigten RNA-Stränge wurden miteinander hybridisiert und die doppelsträngige siRNA für die Assemblierung von RISC (Abschnitt 2.4.4) in zytoplasmatischen Extrakten von FH-Ago2- und FH-Ago2-Y529F-überexprimierender Zellen zusammen mit einer 21.27-spezifischen *target*-RNA inkubiert. Anschließend wurden die RNA-Protein-Komplexe via  $\alpha$ -FLAG-IP gereinigt, gründlich

mit RNase A behandelt und schließlich in Proteinprobenpuffer aufgenommen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, getrocknet und autoradiographisch analysiert (Abb. 4.50; Abb. 4.51 A und B). Ein Teil der Proben wurde für eine Analyse via  $\alpha$ -HA-Western-Blot verwendet (Abb. 4.51 C). Die vollständige Versuchsdurchführung ist schematisch in Abbildung 4.50 zusammengefasst.



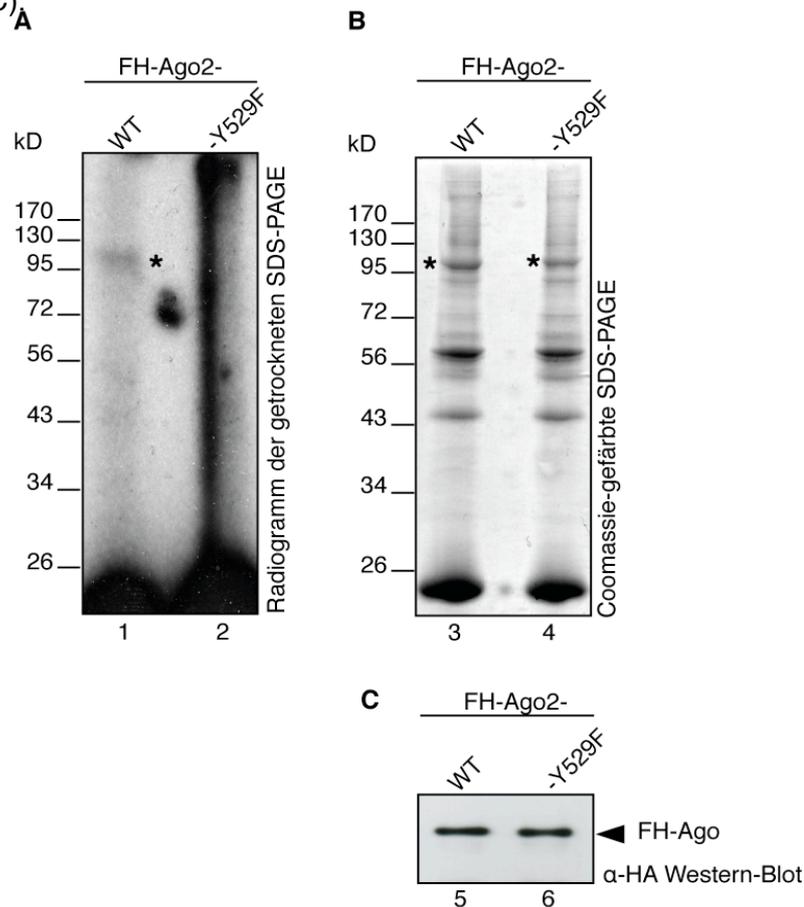
**Abbildung 4.50**

**Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zum Phosphorylgruppenübertrag zwischen kleiner RNA und Ago**

Die Proteine von Interesse wurden als FH-Fusionskonstrukte in HEK 293 Zellen exprimiert und von den Zellen schließlich zyttoplasmatische Extrakte angefertigt. Ein siRNA-Duplex, dessen in Ago einzubauender Strang eine 5'-<sup>32</sup>P-Phosphorylgruppe aufwies, wurde zur Assemblierung von RISC zusammen mit der *target*-RNA lucill in den Extrakten inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden schließlich via Immunopräzipitation mit  $\alpha$ -FLAG-Antikörper gereinigt und gründlich mit RNase A behandelt. Die Analyse der Immunopräzipitate erfolgte via Autoradiographie des Coomassie-gefärbten Proteingels und  $\alpha$ -HA-Western-Blot. Zur Dokumentation der radioaktiv-markierten kleinen RNA wurden den Reaktionsansätzen während der Versuchsdurchführung Proben entnommen. Ink., Inkubation; IP, Immunopräzipitation.

Wird die 5'-Phosphorylgruppe der kleinen RNA tatsächlich auf Tyr-529 übertragen, sollte die radioaktive Markierung anschließend bei FH-Ago2 wieder zu finden sein, nicht aber bei der ebenfalls miRNA-bindenden, aber 529-phosphorylierungsdefekten Y529F-Mutante. Tatsäch-

lich konnte im Radiogramm des denaturierenden Proteingels ein radioaktives Signal von ca. 100 kD bei FH-Ago2 nicht aber bei FH-Ago2-Y529F nachgewiesen werden (Abb. 4.51 A). Es waren Expositionszeiten von sechs Wochen erforderlich, um das schwache Signal zu detektieren. Sowohl die Coomassie-Färbung als auch der  $\alpha$ -HA-Western-Blot belegen, dass die Ago2-Y529F-Mutante in gleicher Quantität und Qualität immunopräzipitiert worden war (Abb. 4.51 B und C).

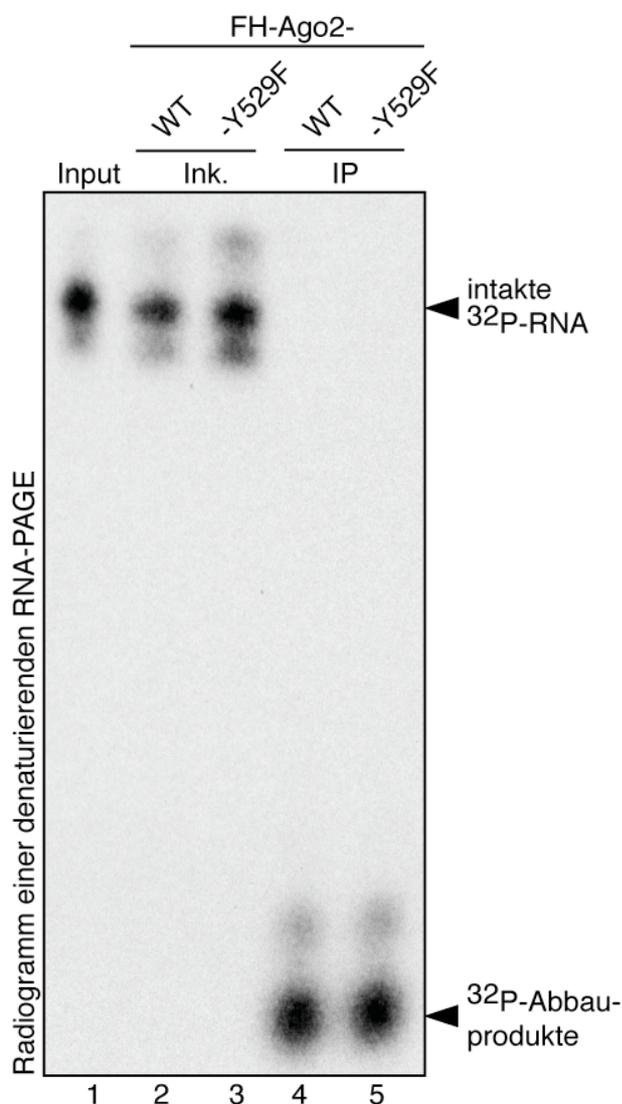


**Abbildung 4.51**

**Radioaktive Markierung von FH-Ago2 nicht aber von -Y529F nach Inkubation mit 5'-<sup>32</sup>P-siRNA**

Von FH-Ago2 und FH-Ago2-Y529F exprimierenden HEK 293 Zellen wurden zytoplasmatische Extrakte hergestellt. Ein siRNA-Duplex aus einem 5'-<sup>32</sup>P-markierten *guide*-Strand und einem 5'-unmodifizierten Gegenstrang wurde zusammen mit der dazugehörigen *target*-RNA in den Extrakten inkubiert. Anschließend wurden die FH-Fusionsproteine immunopräzipitiert und mit RNase A behandelt (vgl. Abb. 4.50). (A) Autoradiogramm des Coomassie-gefärbten Proteingels zur Analyse der nach Größe aufgetrennten Immunpräzipitate. Der Größenstandard gibt die Molekülmassen in kD wieder. (B) Coomassie-gefärbtes Proteingel vor der Trocknung. Sterne (\*) markieren die Position der Fusionsproteine im unter (A) gezeigtem Radiogramm bzw. im Gel (B). (C)  $\alpha$ -HA-Western-Blot. Von den in Proteinprobenpuffer aufgenommenen Immunpräzipitaten wurden 10 Vol.-% via  $\alpha$ -HA-Western-Blot analysiert. WT, Wildtyp.

Um auszuschließen, dass der Abbau der kleinen RNA eventuell unvollständig war und die RNA weiterhin in einem Komplex mit dem Fusionsprotein vorliegt, wurden Proben zur Dokumentation des RNA-Degradationszustandes entnommen. Von diesen Proben wurden Aliquots vergleichbarer radioaktiver Strahlungsintensität in einem denaturierenden RNA-Gel der Größe nach aufgetrennt. Das Autoradiogramm dieses Geles belegt, dass die RNase A-Behandlung sowohl beim FH-Ago2- als auch beim FH-Ago2-Y529F-Ansatz zu einem im Rahmen der Detektionsgrenzen vollständigen Abbau der  $^{32}\text{P}$ -RNA geführt hatte (Abb. 4.52).

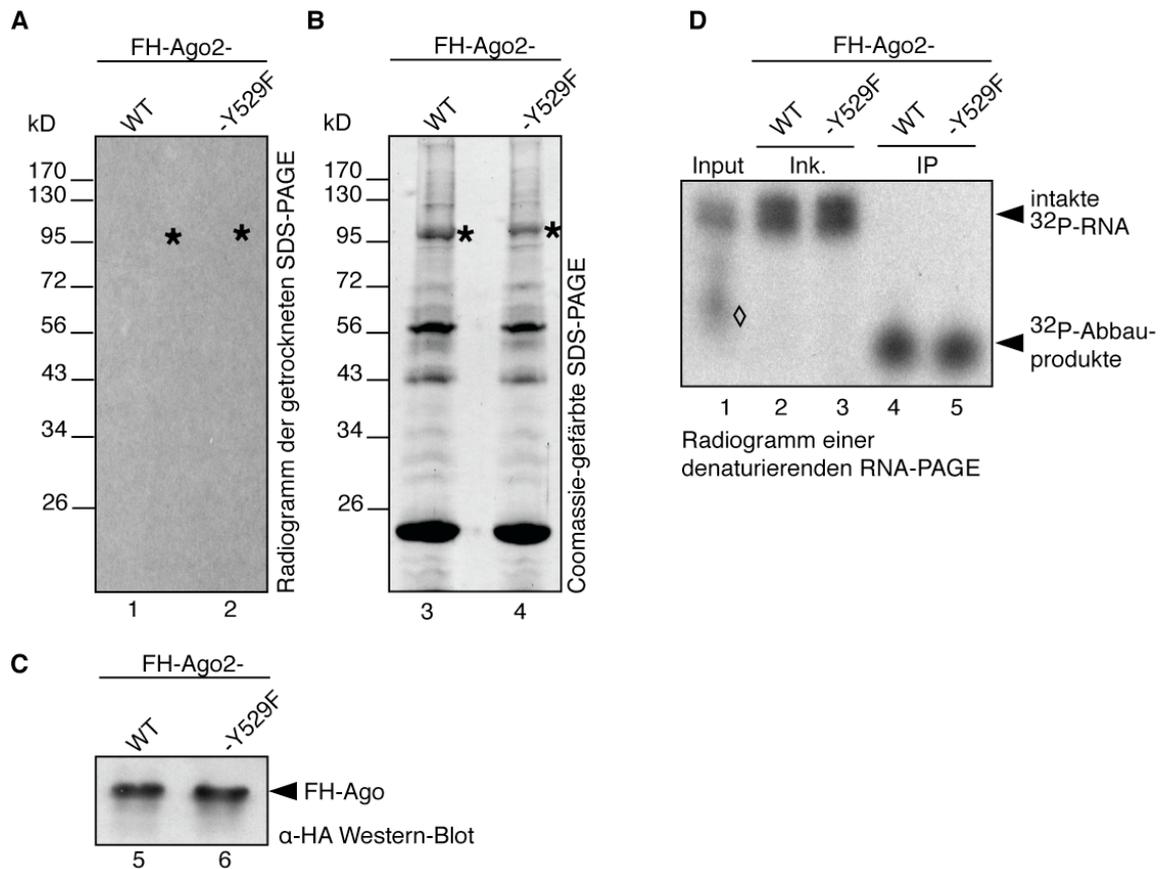


**Abbildung 4.52**  
**Dokumentation des Abbaus der**  
**5'- $^{32}\text{P}$ -markierten kleinen RNA**  
**durch RNase A**

Für die qualitative Analyse der 5'- $^{32}\text{P}$ -21.27-RNA vor und nach deren Einbau in die Fusionsproteine FH-Ago2 und -Y529F wurden im Rahmen des Versuches zum Phosphorylgruppentransfer Proben entnommen. Aliquots vergleichbarer Strahlungsintensität wurden einer denaturierenden RNA-PAGE unterzogen und autoradiographisch analysiert. Das Autoradiogramm ist dargestellt. Signale bekannter Identität sind gekennzeichnet. Die Probenbezeichnung und die Entnahmezeitpunkte erschließen sich aus Abb. 4.50. WT, Wildtyp; Ink., Inkubation.

Um zu kontrollieren, dass das an FH-Ago2 detektierte, radioaktive Signal auf den 5'-Phosphatrest der RNA zurückgeht und nicht auf unspezifischen Abbauprodukten beruht, wurde das Experiment zum Phosphorylgruppenübertrag mit der radioaktiven Markierung am 3'-Ende des in RISC einzubauenden RNA-Stranges wiederholt. Modifikationen am 3'-Ende stören die RISC-Assemblierung nicht (Martinez *et al.*, 2002; Chiu und Rana, 2003; Soutschek *et al.*, 2004). Bei Verwendung 3'-markierter RNA sollte kein Übertrag des radioaktiven Phosphorisotops auf Ago erfolgen. Tatsächlich konnte dem Radiogramm kein entsprechendes Signal entnommen werden (Abb. 4.53 A), trotz längerer Expositionszeit als im Experiment mit der 5'-<sup>32</sup>P-markierten RNA (Abb. 4.51 A) und hinreichender Quantität der Fusionsproteine FH-Ago2 und -Y529F (Abb. 4.53 B und C).

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen, die 5'-Phosphorylgruppe von der kleinen RNA auf Y529 von Ago2 übertragen werden kann (Abb. 4.51), und dass der Phosphatrest nicht unspezifischen Abbauprozessen entstammt (Abb. 4.53).

**Abbildung 4.53****Kein Übertrag einer 3'-<sup>32</sup>P-Markierung einer kleinen RNA auf Argonaute**

Das in Abb. 4.50 skizzierte Experiment wurde mit FH-Ago2- und FH-Ago2-Y529F-haltigen Zytoplasmaextrakten von HEK 293 Zellen und der *target*-RNA lucill wiederholt. Diesmal war jedoch das 3'-Ende des in Ago einzubauenden Stranges radioaktiv markiert. (A) Radiogramm des Coomassie-gefärbten und getrockneten Proteingeles. Die RNase A-behandelten Immunpräzipitate wurden einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung unterzogen. Vom getrockneten Gel wurde über mehr als sechs Wochen ein Autoradiogramm aufgenommen, das dargestellt ist. Ein Größenstandard ist eingezeichnet. (B) Das Coomassie-gefärbte Proteingel vor der Trocknung. Sterne (\*) markieren die erwartete Position der Fusionsproteine im Radiogramm (A) bzw. im Gel (B). (C) α-HA-Western-Blot. Von den in Proteinprobenpuffer aufgenommenen Immunpräzipitaten wurden 10 Vol.-% via α-HA-Western-Blot analysiert. (D) Radiogramm des denaturierenden RNA-Geles nach kurzer Elektrophoresedauer zur Dokumentation der <sup>32</sup>P-RNA-Degradation durch RNase A. Die Erklärung der Probenbezeichnung ist Abb. 4.50 zu entnehmen. Das Rautensymbol (◇) markiert ein Signal unbekannter Identität. WT, Wildtyp; Ink., Inkubation.

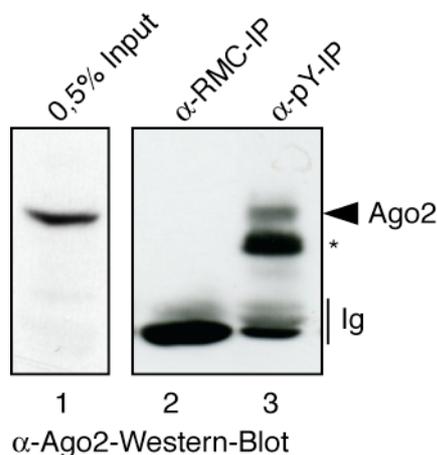
#### 4.2.4.5 Untersuchungen zur Tyrosinphosphorylierung des endogenen Ago2-Protein

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Phosphorylierung verschiedener Serin-, Threonin- und Tyrosinseitenketten überexprimierter Ago-Proteine analysiert. Bei der Untersuchung der funktionalen Bedeutung dieser Modifikationen wurde der Y529-Tyrosinphosphorylierung von Ago2 besondere Aufmerksamkeit geschenkt (Abschnitt 4.2.4). Es zeigte sich, dass das Einbringen eines Glutaminsäurerestes in dieser Position funktionale Konsequenzen für diese Punktmutante hatte, während die übrigen Mutanten deutlich geringere bis keine Einschränkungen erlitten (Abschnitt 4.2.4.2f). Da mit der Glutaminsäure ähnlich wie bei der Y529-Phosphorylierung eine negative Ladung in die miRNA-Bindungstasche eingebracht wird, ist nun zu klären, ob - und falls ja wie weit - die mit der Y529E-Mutante gesammelten Erkenntnisse auf das Y529-phosphorylierte, endogene Protein übertragbar und damit physiologisch relevant sind.

Mit dem mittlerweile verfügbaren monoklonalen  $\alpha$ -Ago2-Antikörper 11A9 (Abschnitt 4.1.2; Rüdell *et al.*, 2008) sollte endogenes Ago2 gereinigt werden, und auf Tyrosinphosphorylierungsstellen untersucht werden. Dazu wurde Ago2 immunopräzipitiert und anschließend via Western-Blot mit  $\alpha$ -pY-Antikörper analysiert. Dieser Ansatz hatte keinen Erfolg. Das  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat enthielt zahlreiche weitere Proteinfaktoren (Höck *et al.*, 2007; Abb. 4.8) mit Phosphotyrosylgruppen, die im Western-Blot ebenfalls sichtbar wurden und die Identifikation des spezifischen Signals von phosphoryliertem Ago2-Protein unmöglich machten. Waschen des Immunopräzipitates mit 1,5 M NaCl-Puffer oder eine größere Auftrennung des Proteingemisches bei der Gelelektrophorese brachten nicht den gewünschten Optimierungserfolg.

Alternativ wurde versucht, die Phosphorylierung von endogenem Ago2 massenspektrometrisch nachzuweisen. Das hätte gleichzeitig eine Aussage zur Identität der modifizierten Aminosäurereste erlaubt. Aber auch dieser Ansatz hatte keinen Erfolg, vermutlich aufgrund unzureichender Probenmenge.

Schließlich wurde der Versuch in reziproker Form durchgeführt: Zuerst eine Aufreinigung von Phosphotyrosinproteinen im Allgemeinen durch Immunopräzipitation mit dem  $\alpha$ -pY-Antikörper und anschließend die Analyse mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper, ob Ago2 im Immunopräzipitat enthalten ist. Dafür wurde zytoplasmatischer Extrakt von HEK 293 Zellen unter Verwendung von Phosphataseinhibitor hergestellt und zusammen mit immobilisiertem  $\alpha$ -pY-Antikörper inkubiert. Zur Spezifitätskontrolle der Immunopräzipitation wurde ein weiterer Ansatz mit einem gegen ein Kontrollprotein gerichteten immobilisierten Antikörper mitgeführt. Die Immunopräzipitate wurden schließlich in Proteinprobenpuffer aufgenommen und der  $\alpha$ -Ago2-Western-Blotanalyse unterzogen. Tatsächlich ließ sich im  $\alpha$ -pY-Immunopräzipitat endogenes Ago2-Protein nachweisen, nicht aber im Kontrollansatz (Abb. 4.54, Spur 2-3). Das belegt, dass auch das endogene Ago2-Protein an Tyrosinseitenketten phosphoryliert wird. Allerdings erlaubt dieses Experiment nicht, die Modifikation einer bestimmten Aminosäureseitenkette zuzuordnen. Es ist daher noch offen, ob das endogene Ago2-Protein speziell an Position 529 der Primärsequenz einen Phosphatrest trägt.

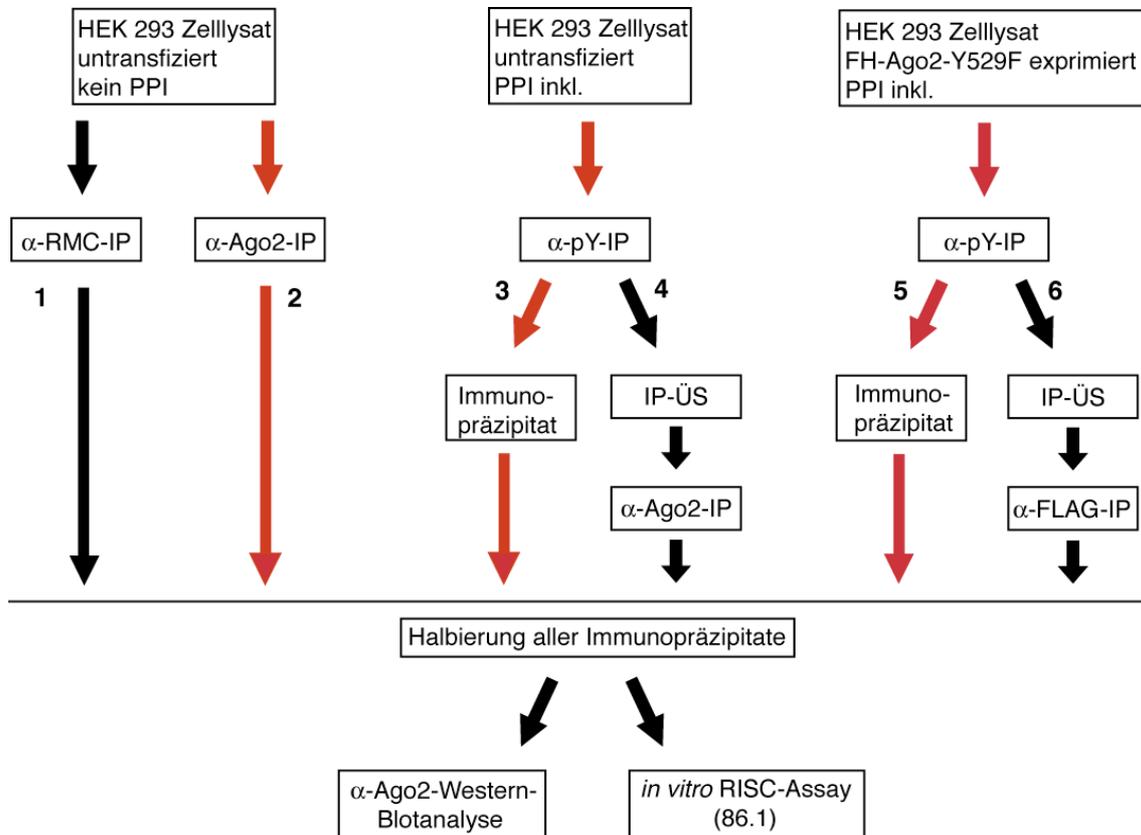


**Abbildung 4.54**  
**Auch Tyrosinreste des endogenen Ago2-Proteins werden phosphoryliert**

Von HEK 293 Zellen wurde in Gegenwart von Phosphataseinhibitor zytoplasmatischer Extrakt hergestellt und sowohl mit  $\alpha$ -pY- als auch mit einem Kontrollantikörper ( $\alpha$ -RMC-Antikörper) zur Immunopräzipitation (IP) inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden schließlich in Proteinprobenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Die Gegenwart von endogenem Ago2-Protein wurde via  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot analysiert. Spur 1: 0,5 Vol.-% der für die IPs eingesetzten Extraktmengen; Spur 2:  $\alpha$ -RMC-IP; Spur 3:  $\alpha$ -pY-IP. „Ig“, Immunglobulinsignale; „\*“, Signal unbekannter Identität.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass auch endogenes Ago2-Protein an Tyrosinseitenketten phosphoryliert wird (Abb. 4.54), galt es nun zu untersuchen, welche Auswirkung

die Modifikation auf die Ago2-Funktionalität hat, insbesondere die vermutete Phosphorylierung von Y529. Das dafür entworfene Experiment ist in Abbildung 4.55 skizziert.



**Abbildung 4.55**

**Bedeutungsnachweis der Y529-Phosphorylierung von endogenem Ago2-Protein: Versuchsdurchführung**

Es wurden dreierlei HEK 293 Lysate hergestellt: erstens von untransfizierten Zellen ohne Verwendung von Phosphataseinhibitor (PPI) (Nr. 1-2), zweitens von untransfizierten Zellen mit PPI-Einsatz (Nr. 3-4) und drittens von FH-Ago2-Y529F-überexprimierenden Zellen, ebenfalls unter Verwendung von PPI (Nr. 5-6). Mit Antikörpern gegen Ago2 oder phosphotyrosylgruppenhaltige Proteine ( $\alpha$ -pY-Antikörper) wurden un- und tyrosinphosphorylierte Ago2-Spezies gesondert immunopräzipitiert und anschließend via  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot und *in vitro* RISC-Assay untersucht. Mit der Ago2-Y529F-Mutante wurde der Einfluss weiterer phosphorylierter Tyrosinreste außer Y529 auf die RISC-Aktivität dokumentiert. Rote Pfeile kennzeichnen die zentralen Ansätze des Experimentes, die schwarzen die Kontrollreaktionen. Zu den letzteren gehört zum einen die Überprüfung der IP-Spezifität mittels Kontrollantikörper ( $\alpha$ -RMC-IP) und zum anderen der Test auf *slicer*-Aktivität im Allgemeinen in den PPI-behandelten Lysaten. IP, Immunopräzipitation; ÜS, Überstand.

Es ging um den Vergleich der *slicer*-Aktivität von unphosphoryliertem und phosphoryliertem Ago2-Protein. Unphosphoryliertes Ago2 wurde aus HEK 293 Zelllysate ohne Verwendung von

Phosphataseinhibitor (PPI) gereinigt (Abb. 4.55, Nr.2). Vorversuche hatten gezeigt, dass es unter diesen Bedingungen praktisch zur vollständigen Tyrosin-Dephosphorylierung im Verlauf der Lysatpräparation kommt (Daten nicht gezeigt). Phosphoryliertes Ago2 wurde mit  $\alpha$ -pY-Antikörper aus Lysat PPI-behandelter Zellen gewonnen (Abb. 4.55, Nr. 3). Das Ergebnis des vorangegangenen Versuches belegt, dass Ago2 im  $\alpha$ -pY-Immunopräzipitat enthalten ist (Abb. 4.54, Spur 3). Eine Reinigung via  $\alpha$ -Ago2-Antikörper würde stattdessen zu einer unerwünschten Mischpopulation von unphosphorylierten und phosphorylierten Ago2-Protein führen. Zur Kontrolle des Einflusses weiterer, außer Y529 phosphorylierter Tyrosinreste diente die Ago2-Y529F-Mutante, die ebenfalls aus PPI-behandelten Zellen isoliert wurde (Abb. 4.55, Nr. 5). Um die grundsätzliche *slicer*-Aktivität in den PPI-behandelten Lysaten zu testen, wurde aus diesen zudem Ago2 ohne Berücksichtigung des Phosphorylierungsgrades isoliert (Abb. 4.55, Nr. 4 und 6). Ein Kontrollantikörper diente schließlich zur Überprüfung der IP-Spezifität im Allgemeinen (Abb. 4.55, Nr. 1).

Ausgehend von der Arbeitshypothese sollte phosphoryliertes endogenes Ago2-Protein idealerweise die geringste *slicer*-Aktivität zeigen, während die phosphorylierte Mutante, da Y529F nicht phosphoryliert und somit die miRNA-Bindung als Voraussetzung für eine erfolgreiche *target*-RNA-Spaltung nicht gestört werden kann, eine im Vergleich dazu höhere Aktivität haben sollte. Vom unphosphorylierten Ago2-Protein ist die höchste Aktivität zu erwarten (vgl. Abschnitt 4.2.3.2).

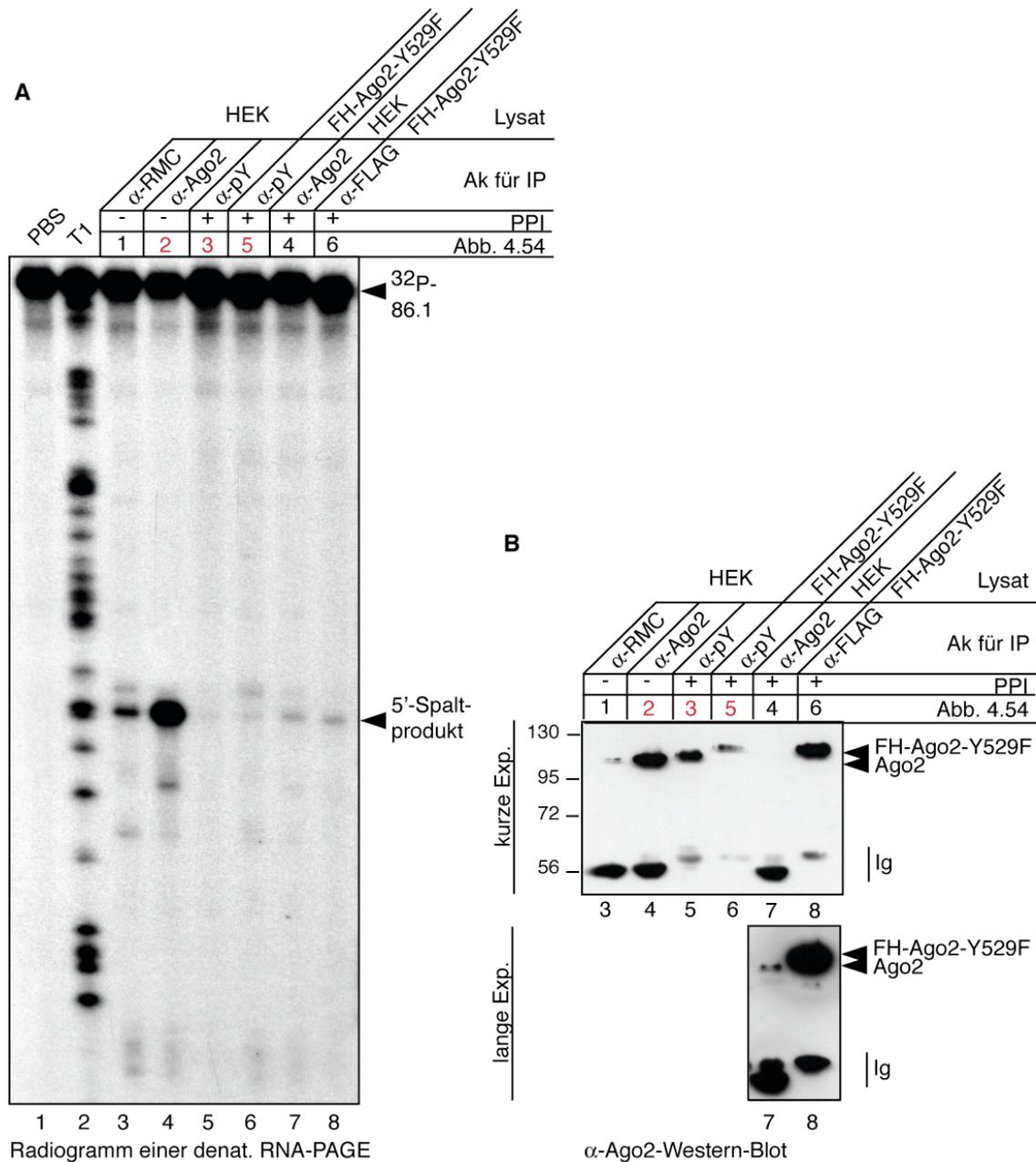
Bei den Immunopräzipitaten war eine große quantitative Varianz zu beobachten, was auf die unterschiedlichen Ausgangsmengen der adressierten Proteinspezies in den Lysaten und die verschiedenen Antikörperaffinitäten zurückzuführen ist (Abb. 4.56 B). Die größte Menge an Ago2-Protein und auch die stärkste *slicer*-Aktivität konnte aus dem unbehandelten HEK 293-Zelllysat via  $\alpha$ -Ago2-IP gereinigt werden (Abb. 4.56 A, B Spur 4). Bemerkenswerterweise ließ demgegenüber der phosphorylierte Pool von endogenem Ago2 kaum *slicer*-Aktivität erkennen (Abb. 4.56 A Spur 5), obgleich auch hier hinreichende Proteinmengen präzipitiert worden waren (Abb. 4.56 B Spur 5). Das heißt, dass tatsächlich auch die Tyrosin-

phosphorylierung von endogenem Ago2-Protein unter physiologischen Bedingungen einen inhibierenden Effekt auf die *in vitro* RISC-Aktivität ausübt. Noch interessanter war jedoch der Befund, dass für die bis auf Y529F tyrosinphosphorylierte Ago2-Mutante durchaus RISC-spezifische Endonukleaseaktivität verzeichnet werden konnte (Abb. 4.56 A, Spur 6). Das Signal des 5'-Spaltproduktes war relativ schwach, aber dennoch eindeutig feststellbar, obgleich die immunopräzipitierte Proteinmenge nur rund einem Drittel derer des nahezu inaktiven, phosphorylierten endogenen Ago2-Proteins entsprach (Abb. 4.56 B, Spur 6 gegenüber 5). In beiden Fällen belegen die Kontrollansätze mit  $\alpha$ -Ago2- bzw.  $\alpha$ -FLAG-Antikörper, dass RISC-Aktivität in den Ausgangslysaten und sogar noch nach der Immunopräzipitation grundsätzlich vorhanden war (Abb. 4.56 B, Spur 7-8). Der beobachtete Funktionsverlust ist demnach spezifisch. Interessanterweise war die Reduktion der *slicer*-Aktivität infolge der Phosphorylierung bei dem endogenen Protein wesentlich größer als bei der Y529F-Mutante (Abb. 4.56 A, B jeweils Spur 5, 7 gegenüber 6, 8). Das spricht für einen wesentlichen Einfluss der Modifikation von Y529 auf die RNA-Spaltaktivität von Ago2.

#### **Abbildung 4.56**

##### **Phosphorylierung des Tyrosin-529 von endogenem Ago2-Protein bewirkt Reduktion der *slicer*-Aktivität**

Entsprechend der in Abbildung 4.55 skizzierten Versuchsdurchführung wurden verschiedene Ago2-Spezies immunopräzipitiert und via  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot (B) und miR-19b abhängigem *in vitro* RISC-Assay (A) auf Auswirkungen der Tyrosinphosphorylierung auf die *slicer*-Aktivität von Ago2 untersucht. (A) Zur Hälfte eines jeden Immunopräzipitates wurde zum Start der RISC-Reaktion radioaktiv markierte miR-19b-*target*-RNA (86.1) gegeben. Die Reaktionen wurden schließlich mittels Proteinase K-Verdau gestoppt, die RNA isoliert, gereinigt und via denaturierender Harnstoff-PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht. Zur Kontrolle unspezifischer RNA-Abbauprodukte wurde eine Reaktion mit PBS anstelle von Immunopräzipitat angesetzt (Spur 1). „T1“ kennzeichnet den partiellen RNase T1-Verdau der *target*-RNA und fungiert als Größenstandard (Spur 2). Die Signale der *target*-RNA und des 5'-Spaltproduktes sind rechts von Radiogramm ausgewiesen. (B) Analyse der Immunopräzipitate via  $\alpha$ -Ago2-Western-Blot zur Dokumentation der relativen Ago2-Mengen. Gezeigt ist das Ergebnis nach kurzer (oben) und langer (unten) Exposition. Das Beladungsschema entspricht dem in (A). Als Orientierungshilfe wurde die Nummerierung der Spuren aus (A) übernommen. (A,B) Die in Abb. 4.55 verwendete Nummerierung der Reaktionsansätze ist oberhalb der Abbildungen wiedergegeben. Rote Ziffern entsprechen den roten Pfeilen in Abb. 4.55, schwarze Ziffern kennzeichnen die Kontrollansätze. „Ig“ bezeichnet die schweren Ketten der Immunglobuline.



Die vom Arbeitsmodell abgeleitete Vorhersage konnte experimentell bestätigt werden. Die Phosphorylierung von Y529 wirkt sich inhibierend auf die *slicer*-Funktion von Ago2 aus. Es liegt nahe anzunehmen, dass dies analog zur Ago2-Y529E-Mutante durch eine Blockade der miRNA-Bindung erreicht wird (Abschnitt 4.2.4.3).

## 5. Diskussion

In den letzten Jahren konnten umfassende Erkenntnisse zur Prozessierung kleiner regulatorischer RNAs und den molekularen Gesetzmäßigkeiten der damit im Zusammenhang stehenden posttranskriptionalen Genexpressionsregulation zusammengetragen werden. Von der Regulation beteiligter Proteinfaktoren ist dagegen bislang nur wenig verstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Ago-Proteine des Menschen auf posttranslationale Modifikationen hin zu untersuchen und diese in ihrer funktionalen Bedeutung zu charakterisieren.

### 5.1 Vorbereitende Arbeiten

#### 5.1.1 Etablierung der *FseI/AscI*-Vektoren als alternative Klonierungsstrategie

In der Arbeitsgruppe Meister werden Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Spezifitäten hinsichtlich Expressionssystem und kodiertem, N-terminalem Fusionspeptid genutzt, deren parallele Verwendung bei einer umfassenden Charakterisierung eines Proteins unvermeidbar ist. Bislang erforderte jeder Vektor eine gesonderte Klonierungsstrategie bezüglich Restriktionsenzymen und ORF. Durch Einführung entsprechender Oligonukleotidsequenzen (Tab. 4.1) in die Expressionsvektoren wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erreicht, dass mit der Enzymkombination *FseI* und *AscI* jeder beliebige Vektor geöffnet und die zu klonierende DNA-Sequenz dem ORF gemäß inseriert werden kann.

Mögliche Kritikpunkte an diesem Vektorset gründen sich auf *FseI*. Dieses Enzym ist mit 500 U bei einer Konzentration von 2 U/μl nur in geringer Gebindegröße und ausschließlich von *New England Biolabs* (Ipswich, USA) zu beziehen. Zudem hat *FseI* selbst bei -20°C eine Haltbarkeitsdauer von nur wenigen Monaten. Die Positionierung der ergänzten Oligonukleotidsequenzen in der *multiple cloning site* (engl.) erlaubt es allerdings, für den analytischen Restriktionsverdau auf die kostengünstigeren Enzyme *BamHI*, *EcoRI* und *NotI* zurückzugreifen.

Die Nachteile werden von den Vorteilen der *FseI*- und *AsclI*-Strategie überwogen: Erstens haben beide Enzyme Erkennungssequenzen von acht Basenpaaren, was die Wahrscheinlichkeit, dass eine davon Bestandteil der zu klonierenden DNA-Sequenz ist, stark minimiert. Zweitens setzen sich die Erkennungssequenzen ausschließlich aus den Nukleobasen Guanin und Cytosin zusammen. Das erlaubt bei der *polymerase chain reaction* (PCR) hohe Temperaturen zu verwenden und verringert so das Risiko der Akkumulation unerwünschter Nebenprodukte. Drittens produzieren beide Restriktionsenzyme überhängende Enden, was eine effiziente Klonierung mit einer hohen Ausbeute an positiven Klonen begünstigt. Viertens lassen sich die beiden Enzyme problemlos für einen Doppelverdau miteinander kombinieren.

Mit dem *FseI/AsclI*-Vektorset können verschiedene Konstrukte parallel und ohne Mehraufwand kloniert werden. Auch vereinfacht sich mit der Kompatibilität verschiedener Vektoren bezüglich der Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen das Umklonieren von DNA-Sequenzen. Es lassen sich PCR-Reaktionen zum Einbringen alternativer Erkennungssequenzen vermeiden, was mitunter ungewollte Punktmutationen zur Folge haben könnte.

### **5.1.2 Generierung eines hochspezifischen und vielfältig einsetzbaren monoklonalen Antikörpers gegen humanes Ago2-Protein**

Die Untersuchung der endogenen, humanen Ago-Proteine ist aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit spezifischer und effizienter Antikörper erschwert. Viele Antiseren oder Antikörper sind kreuzreaktiv und/oder unzureichend charakterisiert (Abschnitt 4.1.2; Jakymiw *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007; Azuma-Mukai *et al.*, 2008). Die Alternative, Ago-Fusionsproteine zu verwenden, geht häufig mit einer Überexpression einher und stellt eine Veränderung gegenüber der physiologischen Situation dar. Das birgt grundsätzlich das Risiko, Artefakte zu induzieren. Zwar können die meisten Artefakte durch geeignete Kontrollansätze identifiziert und die bis heute erforschten Ago-Funktionen durchaus als abgesichert betrachtet werden, doch ist nicht auszuschließen, dass mitunter weitere Funktionen existieren, die auf-

grund des Fusionspeptids bislang unerkant geblieben sind. Zudem ist eine Expression von Fusionsproteinen nicht in jedem System möglich, beispielsweise nicht in Gewebeproben oder kaum transfizierbaren Zellkulturen. Auch für das zweite Projekt, die Untersuchung post-translationaler Modifikationen von Ago-Proteinen, wäre ein spezifischer und vielfältig einsetzbarer Antikörper von Vorteil.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen hochspezifischen, monoklonalen Antikörper gegen humanes Ago2-Protein zu generieren. Der vom Hybridomazellklon 11A9 produzierte Antikörper erkennt das Protein spezifisch in Western-Blotanalysen, bei Immunopräzipitationsansätzen und in Immunofluoreszenzversuchen. Er zeigt keine Kreuzreaktivität gegenüber humanem Ago1, 3 oder 4 (Abb. 4.3) oder einem der murinen Ago-Proteine (Abb. 4.4), trotz einer Sequenzähnlichkeit von bis zu 80% der Antikörper-Epitope (Abb. 4.2). Eine Kreuzreaktivität des Antikörpers gegenüber dem bovinen Ago2-Protein ist jedoch aufgrund identischer N-terminaler Aminosäuresequenzen wahrscheinlich (Abb. 4.2) und sollte zur endgültigen Klärung experimentell überprüft werden.

#### **5.1.2.1 Auswertung der Spezifität des $\alpha$ -Ago2-Antikörpers**

Der abschließende Spezifitätsbeweis für den  $\alpha$ -Ago2-Antikörper wurde durch die massenspektrometrische Analyse der Immunopräzipitate erbracht (Abb. 4.8). Bei diesem Versuch wurde neben einer  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitation ( $\alpha$ -Ago2-IP) aus Totallysat unbehandelter HEK 293 Zellen auch eine aus Totallysat FH-Ago2-überexprimierender HEK 293 Zellen durchgeführt. Trotz vergleichbarer Anzahl lysierter Zellen und eingesetzter Antikörpermengen wurde FH-Ago2 in sichtbar größerer Quantität immunopräzipitiert als endogenes Ago2 (Abb. 4.8). Diese Beobachtung zeigt, dass das Ago2-Angebot und nicht die Quantität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers die IP-Ausbeute bestimmt. Von besonderem Interesse sind neben dem Ago2-Signal die Proteinbanden, die im Zusammenhang mit dem FH-Ago2-haltigen Lysat gegenüber dem unbehandelter HEK 293 Zellen nicht an Intensität zunehmen bzw. sogar abnehmen. Sie stellen potentielle Kandidaten einer Kreuzreaktivität des Antikörpers

dar, da sie offensichtlich Antikörper-spezifisch, doch Ago2-unabhängig akkumulieren (Abb. 4.8, Bande 2 und 6). Das trifft auf das 150 kD-Signal zu, das als SMRC1 identifiziert werden konnte. Das SMRC1-Protein ist Bestandteil des ATP-abhängigen *chromatin remodelling complex* SWI/SNF und dem Datenbankeintrag zur Folge im Nukleus lokalisiert ([http://www.uniprot.org/uniprot/Q92922#section\\_comments](http://www.uniprot.org/uniprot/Q92922#section_comments)). Losgelöst von den vorangegangenen Überlegungen könnte es sich bei SMRC1 grundsätzlich um ein mit Ago2 interagierendes Protein handeln. Aus anderen Spezies ist das Zusammenspiel von Komponenten des miRNA-Signalweges und solchen der Heterochromatinregulierung durchaus bekannt (Abschnitt 2.4.1; Brower-Toland *et al.*, 2007; Bayne *et al.*, 2010). Aufgrund der scheinbar vergleichbaren Bandenintensität in beiden IP-Ansätzen im Silber-gefärbten Gel und unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Parameter scheint eine Kreuzreaktivität des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers mit SMRC1 allerdings wahrscheinlicher (Abb. 4.8). Das Massenspektrometrie-Ergebnis belegt einen reduzierten Anteil von SMRC1 im FH-Ago2-haltigen Immoprecipitat. Vermutlich führt die Überexpression von Ago2 zu einer höheren Absättigung des eingesetzten Antikörpers und reduziert so den Anteil an SMRC1.

Die Nebenreaktion des Antikörpers mit SMRC1 ist bei Western-Blotanalysen von Totallysaten nicht von Belang. Hier ist der Anteil von SMRC1 gegenüber Ago2 zu gering. Werden jedoch Kernfraktionen analysiert, kann die Kreuzreaktivität aufgrund des erhöhten SMRC1-Anteils durchaus eine Rolle spielen. Das gleiche gilt für IP-Experimente, bei denen infolge der Kreuzreaktivität mit einer verringerten Ago2-Ausbeute zu rechnen ist. Auch kann eine Analyse co-präzipitierender Proteine zur Identifizierung Ago2-assoziiierter Faktoren durch SMRC1-spezifische Interaktoren zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Für RNA-Sequenzierungsvorhaben in Kombination mit einer Ago2-IP ist die Kreuzreaktivität dagegen unproblematisch: Die Sequenzierungstechnologien kommen heute mit wenig Probenmaterial aus und eine Verfälschung der Resultate durch zusätzliche, von SMRC1 eingetragene RNAs ist nicht zu erwarten.

Bei der Western-Blotanalyse der Kernfraktionen von RPE-1, HEK 293, HeLa und murinen N2A Zellen mit dem Antikörper 11A9 wurden neben dem Ago2-Signal weitere Signale beobachtet, die reproduzierbar auftraten (Abb. 4.4 A). Während sich das Ago2-Signal für alle drei humanen Zelllinien in vergleichbarer Intensität zeigt, tritt das hochmolekulare Signal von ca. 150 kD insbesondere bei den RPE-1- und HEK 293-Kernlysaten auf (Abb. 4.4 A, Spur 9-10), das niedermolekulare dagegen bei allen humanen und zusätzlich beim murinen Lysat (Abb. 4.4 A, Spur 9-12). Die Divergenz der Signale legt den Schluss nahe, dass es sich bei ihnen um nukleäre oder nukleusassoziierte Proteine handelt, mit denen der  $\alpha$ -Ago2-Antikörper kreuzreagiert. Möglicherweise gehen die 150 kD-Signale auf SMRC1 zurück. Bei der Western-Blotanalyse von Totallysaten waren vergleichbare Zusatzbanden nicht zu beobachten (Abb. 4.4 A, links). Vermutlich ist der Anteil der betreffenden Kernproteine im Gesamtlisat zu gering, um eine Detektion zu erlauben. Versuche, die Identität der zusätzlichen Banden zu klären, wurden nicht unternommen.

Auch bei der Western-Blotanalyse der Totallysate von 13 verschiedenen humanen Zelllinien trat neben dem erwarteten Ago2-Signal vereinzelt ein zusätzliches, geringfügig höhermolekulares Signal auf (Abb. 4.4 B, \* in Spur 4, 6-9, 12 und 14). Es scheint zu keinem der im vorangegangenen Absatz diskutierten Signale aus Abb. 4.4 A identisch zu sein. Möglicherweise wird es durch die größere Gesamtproteinmenge verursacht, die in den jeweiligen Spuren aufgetragen wurde (Abb. 4.4 B,  $\alpha$ -rS6-Western-Blot), oder rührt vielleicht von Ago2-Molekülen her, die modifiziert vorliegen und infolgedessen während der SDS-PAGE langsamer migrieren. Tatsächlich ist für Vertreter der PIWI-Proteine, die ebenfalls zur Familie der Argonaute-Proteine zählen, kürzlich die symmetrische Methylierung von Argininresten beschrieben worden (Chen *et al.*, 2009; Kirino *et al.*, 2009; Nishida *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Vagin *et al.*, 2009; Abschnitt 2.7.2). Und auch am humanen Ago2-Protein sind in den letzten Jahren posttranslationale Modifikationen nachgewiesen worden (Qi *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2008; Rybak *et al.*, 2009; Abschnitt 2.7.2). Es wäre interessant, die Identität des zusätzlichen Signals aufzuklären und zu untersuchen, warum die mutmaßliche Modi-

fikation in den verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß erfolgt. Leider ist es nicht gelungen, die langsamer migrierende, nicht in jedem Experiment auftretende Protein-spezies im erforderlichen Umfang für die massenspektrometrische Analyse anzureichern.

### **5.1.2.2 Bestätigung verschiedener Ago2-spezifischer Eigenschaften am endogenen Ago2-Protein**

Der neue Antikörper 11A9 ermöglicht die spezifische Immunopräzipitation von miRNA-beladenem Ago2-Protein aus Totallysat (Abb. 4.6). Der miR-19b-Northern-Blot bestätigt nicht nur die miRNA-Beladung des immunopräzipitierten, endogenen Proteins, sondern lässt darüber hinaus erkennen, dass miR-19b-Vorläufermoleküle (pre-miR-19b) zwar im Totallysat (Abb. 4.6 ii, Spur 5), nicht jedoch im  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat (ii, Spur 7) nachweisbar sind. Tatsächlich schlagen Diederichs und Haber (2007) in ihrem Modell der miRNA-Reifung jedoch eine Prozessierung der miRNA-Vorläufermoleküle durch Ago2 vor, was eine direkte Bindung voraussetzen würde. Zwei technische Erklärungen sind denkbar, weshalb in der vorliegenden Arbeit keine pre-miRNAs im Ago2-Immunopräzipitat detektiert wurden. Erstens betrifft die pre-miRNA-Assoziation unter den gewählten experimentellen Bedingungen möglicherweise nur einen kleinen Teil der immunopräzipitierten Ago2-Moleküle. Oder, zweitens, die Assoziation ist kurzweilig und/oder labiler als die von Ago2 mit reifen miRNAs und hat infolgedessen die Immunopräzipitation nicht überdauert. Es ist anzunehmen, dass die von Diederichs und Haber vorgeschlagene Assoziation von Ago und miRNA-Vorläufermolekülen nach einem alternativen Mechanismus erfolgen müsste, als die miRNA-Bindung. Im Fall von reifen miRNAs werden die einander abgewandten Enden der RNA erkannt und fixiert (Abschnitt 2.3.3.2 und 2.3.3.3), über die eine haarnadelartig-gefaltete pre-miRNA nicht verfügt (Abb. 2.1). In ihrer Studie zeigen Diederichs und Haber (2007) zwar einen Zusammenhang zwischen der Expression von Ago2 und verschiedenen miRNA-Prozessierungsintermediaten, doch eine direkte Verbindung belegen sie nicht. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die von ihnen beobachteten Effekte möglicherweise von Ago2 ausgelöst,

doch letztlich durch ein anderes Protein, beispielsweise Dicer, umgesetzt werden, ohne dass dabei eine Assoziation von Ago2 und pre-miRNA auftritt.

Schließlich konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit mit dem Antikörper 11A9 erstmals für das endogene Ago2-Protein die Katalyse der RISC-charakteristischen Spaltung einer perfekt komplementären *target*-RNA nachgewiesen werden (Abb. 4.7). Wenige Monate später wurden diese Ergebnisse durch die Arbeitsgruppe Siomi bestätigt, die ebenfalls erfolgreich monoklonale Antikörper gegen humane Ago-Proteine generiert hat (Rüdel *et al.*, Epub April 2008; Azuma-Mukai *et al.*, Epub Juni 2008).

Des Weiteren konnte die PB- und Kernlokalisierung des endogenen Ago2-Protein bestätigt werden. Die durchschnittliche Größe der detektierten PBs war im Vergleich zu Studien, die mit überexprimierten Ago2-Fusionsproteinen durchgeführt wurden, deutlich geringer (Abb. 4.13 im Vergleich zu Abb. 4.41 oder auch Meister *et al.*, 2005). Möglicherweise ist das eine Konsequenz der unterschiedlichen zellulären Ago2-Konzentrationen. PBs sind als dynamische RNA-Protein-Strukturen beschrieben, deren Dimensionen unter anderem durch translationsinhibierte Transkripte, wie beispielsweise miRNP-reprimierte *target*-RNAs, bestimmt werden (Eulalio *et al.*, 2007 (b); Abschnitt 2.6.2). Es ist vorstellbar, dass sich durch die Überexpression von Ago2 auch die Menge inhibierter Transkripte erhöht und dies letztlich die Größenzunahme der PBs bewirkt.

Darüber hinaus konnte mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper erstmals die Existenz einer nukleären Ago2-Population nachgewiesen werden. Das in Immunfluoreszenzexperimenten beobachtete Kernsignal nahm infolge der Ago2-Depletion durch siRNAs stark ab (Abb. 4.14). Aus diesem Grund kann die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem Kernprotein SMRC1 als Ursache für das beobachtete Kernsignal ausgeschlossen werden. Zwar berichteten verschiedene Arbeitsgruppen bereits früher von RNAi-ähnlichen Effekten im Kern, doch basierten diese auf transfizierten siRNAs (Abschnitt 2.4.1). Eine physiologische Bedeutung der durch kleine RNAs-vermittelten Regulation im Kern ist daher umstritten. Auch sind viele der bekannten miRNA-Effektorkomplexe im Zytoplasma lokalisiert. Zellfraktionierungsexperi-

mente zur Ago2-Lokalisierung lieferten keine eindeutigen Antworten (Abschnitt 2.6.1) und Immunofluoreszenzversuche suggerierten eine hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisierung von Ago. Allerdings wurde kürzlich Importin 8 (Imp8) als Ago-assoziiertes Protein beschrieben (Weinmann *et al.*, 2009). Imp8 gehört zur Familie der  $\beta$ -Importine, die am Kernimport von Proteinen beteiligt sind. Tatsächlich konnte in der Studie gezeigt werden, dass nach einer Depletion von Imp8 durch siRNAs der Anteil des zytoplasmatischen Ago2-Pools gegenüber dem nukleären zunimmt (Weinmann *et al.*, 2009). Diese Daten und der Nachweis von endogenem Ago2 im Zellkern unterstützen die Vermutung einer physiologischen Funktion von Ago2 im Nukleus.

#### 5.1.2.3 Erweiterung des Anwendungsspektrums für den $\alpha$ -Ago2-Antikörper

Mit dem Antikörper 11A9 konnte ein Reinigungsprotokoll zur Isolation von endonukleolytisch-aktivem, humanem Ago2-RNP etabliert werden (Abb. 4.9 - 4.12). Das Protokoll stellt die optimierte Version einer Kombination von  $\alpha$ -Ago2-IP und anschließender Ago2-Elution durch Zugabe des zur Antikörpergenerierung eingesetzten Ago2-Peptids dar. Erstens können auf diesem Weg Ago2-RNPs in löslicher Form aus Totallysat gewonnen werden. Das erlaubt eine photometrische Konzentrationsbestimmung der Proteine, wie sie mit Ago2-Immunopräzipitationen nicht möglich ist, und macht Ago2-Komplexe einer umfassenderen enzymkinetischen Analyse zugänglich. Zweitens ist das Reinigungsprotokoll geeignet, um Ago2-miRNPs in einer höheren Reinheit zu isolieren, als es mit einer Immunopräzipitation alleine möglich wäre. Das ist für miRNA- oder *target*-RNA-Sequenzierungsvorhaben von Vorteil. Durch eine vorangestellte  $\alpha$ -Ago2-IP und anschließende Elution ließe sich der Anteil unspezifisch mit der Antikörpermatrix assoziierter RNA-Abbauprodukte von ähnlicher Größe wie miRNAs, jedoch ohne regulierende Funktion, signifikant reduzieren. Es würden stattdessen gezielt Ago2-assoziierte kleine RNAs angesprochen werden. Für die Isolation potentieller *target*-mRNAs ist die zweistufige Reinigung von Ago2-Komplexen ebenfalls vorteilhaft, weil sie eine gründlichere Separation von Ago2-Komplexen und co-präzipitierenden RNA-bindenden

Proteinen erlaubt. Letztere könnten mit mRNAs assoziiert sein, die keine *target*-RNAs von miRNPs sind und infolgedessen das Sequenzierungsergebnis verfälschen würden. Das Ago2-Reinigungsprotokoll ist auch auf Gewebeproben anwendbar, so dass miRNA- und *target*-RNA-Profile pathologischer Proben erstellt werden könnten. Möglicherweise können auf diesem Weg neue Erkenntnisse zum jeweiligen Krankheitsbild gewonnen, neue Diagnosemarker identifiziert und alternative Therapieansätze entwickelt werden.

#### **5.1.2.4 Abschließende Betrachtungen**

Der im Rahmen dieser Doktorarbeit generierte und charakterisierte  $\alpha$ -Ago2-Antikörper stellt mit seiner hohen Antigen-Spezifität und seinem breiten Einsatzspektrum trotz Kreuzreaktivität gegenüber dem Kernprotein SMRC1 ein nützliches und wertvolles Reagenz dar, sowohl für die Bearbeitung des Hauptthemas dieser Doktorarbeit - der Untersuchung humaner Ago-Proteine auf posttranslationale Modifikationen – als auch für die Forschungsgemeinde insgesamt. Endogenes Ago2 aus sämtlichen humanen Zellkulturen oder Geweben kann nun als Untersuchungsobjekt herangezogen werden. Für zukünftige Studien wäre die Verfügbarkeit ähnlich hochwertiger Antikörper auch für humanes Ago1- und Ago4-Protein wünschenswert. Für Ago3 existiert ein entsprechender Antikörper seit kurzem (Azuma-Mukai *et al.*, 2008).

## 5.2 Posttranslationale Modifikation humaner Argonaute-Proteine

Bislang konnte bei Ago3 keine endonukleolytische Aktivität nachgewiesen werden, obgleich es wie Ago2 kleine RNAs bindet (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004 (b); Azuma-Mukai *et al.*, 2008) und über das für die *slicer*-Aktivität erforderliche DDH-Motiv verfügt (Rivas *et al.*, 2005; Abschnitt 2.3.3.4). Zudem lagen zu Beginn der Doktorarbeit keine Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von Argonaute-Proteinen vor. Es war nicht auszuschließen, dass solche Modifikationen der Aminosäuresequenz möglicherweise die molekulare Ursache für die funktionalen Unterschiede von Ago-Proteinen *in vivo* darstellen.

Als erstes wurde getestet, ob Ago *in vivo* phosphoryliert wird. Aufgrund der positiven Untersuchungsergebnisse (Abb. 4.15) wurde die Identifizierung weiterer Modifikationen nicht verfolgt. Veröffentlichungen der letzten Jahre belegen jedoch, dass sich in der Tat verschiedene posttranslationale, kovalente Veränderungen an humanem Ago2 nachweisen lassen. Dazu zählt neben der Phosphorylierung von Ser387 (Zeng *et al.*, 2008) auch die Hydroxylierung von Pro700 (Qi *et al.*, 2008) und die Polyubiquitinierung durch Trim71 (Rybak *et al.*, 2009). In diesen Studien wurden Auswirkungen der jeweiligen Modifikation sowohl auf die Proteininstabilität als auch auf die PB-Lokalisierung von Ago2 beobachtet. Auswirkungen auf das RNA-Bindungsverhalten, die enzymatische Aktivität oder die Interaktion mit anderen Proteinfaktoren des miRNA-Signalweges wurden nicht analysiert (Qi *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2008; Rybak *et al.*, 2009; Abschnitt 2.7.2).

### 5.2.1 Phosphorylierung von Ago1 und Ago2 *in vivo*

Die zur Identifizierung der Phosphorylierungsstellen durchgeführte massenspektrometrische Analyse ergab, dass sowohl von FH-Ago1 als auch von FH-Ago2 mehrere Aminosäuren phosphoryliert werden. Betroffen sind überwiegend Serinseitenketten, aber ebenso Threonin- und Tyrosinreste (Abb. 4.16). Zu den identifizierten Phosphoserinen gehört auch das kürzlich beschriebene Ser387 (Zeng *et al.*, 2008). Die detektierten Ago2-Phosphorylierungsstellen

zeichnet ein hoher entwicklungsgeschichtlicher Konservierungsgrad aus (Abb. 4.17). Das könnte für eine physiologische Relevanz der entdeckten Modifikationen sprechen.

Ein Abgleich unserer Massenspektrometrie-Resultate mit der Datenbank *Phosida* (<http://141.61.102.18/phosida/index.aspx>, Stand: März 2010) ergab, dass alle als phosphoryliert identifizierten Serinreste von Ago2 auch im Datenbankeintrag als modifiziert vorhergesagt waren. Das gleiche gilt für die zwei Tyrosine, Y393 und Y529. Die Anzahl mutmaßlicher Phosphorylierungsstellen beläuft sich für Ago2 laut *Phosida* jedoch auf insgesamt 55. Im Vergleich dazu konnte in einer umfangreichen Phosphoproteomanalyse ausschließlich die Modifikation von Threonin-251 bei Ago2 festgestellt werden (Olsen *et al.*, 2010).

Es ist offensichtlich, dass die Resultate zur Ago-Phosphorylierung in verschiedenen Studien sehr unterschiedlich ausfallen (Zeng *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2010; Rüdell *et al.*, 2010). Das resultiert aus dem Wesen der Modifikation selbst: Erstens handelt es sich bei Phosphorylierungen um temporäre Modifikationen, für deren Etablierung bzw. Beseitigung zahlreiche Enzymaktivitäten in der Zelle existieren. Die technische Durchführung der Zellyse bezüglich Dauer, Kühlung und/oder Verwendung, Art und Konzentration von Phosphataseinhibitoren, hat daher entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis. Zweitens unterliegt das Phosphoproteom Regulationsmechanismen, die durch extrazelluläre Stimuli wie pH-Wert, Metabolite oder Zell-Zell-Kontakte, ebenso wie durch intrazelluläre, beispielsweise im Rahmen des Zellzyklus, ausgelöst werden können. Drittens besteht das Risiko, dass die Modifikation die massenspektrometrische Analyse nicht überdauert. Mit großer Wahrscheinlichkeit resultieren die voneinander abweichenden Datensätze der diskutierten Studien aus unterschiedlichen experimentellen Bedingungen und verschiedenen physiologischen Zuständen der Zellen zum Zeitpunkt der Lyse. Die Resultate haben jedoch alle gleichermaßen Gültigkeitsanspruch.

### 5.2.2 Serinphosphorylierung von Ago2

Ago2-Serinseitenketten sind von der Phosphorylierung am stärksten betroffen, weshalb dieser Modifikation eine gesonderte Betrachtung zusteht.

Einer der identifizierten Serinreste war Ser387 (Abb. 4.16). Wir haben daraufhin zwei Punktmutanten generiert, die die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände imitieren sollten: Ago2-S387A als nicht-phosphorylierbare Variante und Ago2-S387E zur Nachahmung der S387-Phosphorylierung. In den durchgeführten *in vitro* RISC-Assays verhielten sich beide Mutanten wie das Ago2-Wildtypprotein (Abb. 4.20). Sie sind enzymatisch aktiv und ihre Beladung mit miRNAs ist folglich auch nicht beeinträchtigt (Abschnitt 2.4.4). Zeng und Kollegen (2008) identifizierten S387 ebenfalls als Phosphorylierungsstelle von Ago2 und stellten eine deutliche Reduktion der PB-Lokalisierung ihrer S387A-Mutante gegenüber dem Wildtypprotein fest. Sie folgerten, dass die S387-Phosphorylierung für die PB-Lokalisierung von Ago2 erforderlich ist (Zeng *et al.*, 2008). Den beschriebenen Phänotyp können wir nicht bestätigen: Die subzelluläre Lokalisierung von FH-Ago2-S387A, -S387E oder dem Wildtypprotein ließ keine Unterschiede erkennen. Alle drei waren gleichermaßen neben dem PB-Markerprotein LSm4 in granulären Strukturen nachweisbar (Abb. 4.41). Allerdings entdeckten Zeng und Kollegen (2008), dass Ago2-S387A nach Induktion von Zellstress und erhöhter Phosphorylierungsaktivität durchaus zusammen mit GW182 in PBs detektiert werden kann und schränkten die Bedeutung der S387-Phosphorylierung für die PB-Lokalisierung des Proteins auf normale Wachstumsbedingungen ein. Der Widerspruch zu unseren Daten bleibt dennoch bestehen, da diese unter normalen Wachstumsbedingungen erhoben worden sind. Es ist jedoch zu beachten, dass Zeng *et al.* (2008) erstens GW182/TNRC6A als PB-Markerprotein verwendeten, während wir mit LSm4, einer Komponente der RNA-Degradationsmaschinerie, gearbeitet haben. GW182-positive Strukturen enthalten nicht grundsätzlich auch PB-Faktoren wie beispielsweise LSm4 (Gibbins *et al.*, 2009). Zweitens behandelten Zeng *et al.* (2008) die Zellen zum Auslösen von Zellstress mit Arsenit. Diese Prozedur wird auch beim Induzieren von so genannten „*stress granules*“ angewandt. Bei

*stress granules* handelt es sich ebenfalls um granuläre, zytoplasmatische Strukturen aus RNA und Protein, die viele Komponenten mit PBs gemein haben (Buchan und Parker, 2009). Folglich ist nicht auszuschließen, dass in den beiden Studien unterschiedliche granuläre Strukturen betrachtet wurden (Zeng *et al.*, 2008; vorliegende Doktorarbeit).

Zur Identifikation der für die Ago2-Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen wurde mit der Arbeitsgruppe von Anders Lund (Biotech & Innovationszentrum der Universität Kopenhagen, Dänemark) ein RNAi-basiertes Kinase-*screening* durchgeführt (Abschnitt 4.2.4.4). Die ersten *screening*-Resultate deuten darauf hin, dass einige Kinasen tatsächlich eine Rolle in der miRNP/RISC-vermittelten Expressionsregulation spielen. Interessanterweise handelt es sich überwiegend um Serin-/Threoninkinasen. Die Ergebnisse müssen noch in unabhängigen Experimenten verifiziert werden. Sollten sie sich jedoch für eine oder mehrere Kinasen bestätigen, hieße das, dass bestimmte Kinaseaktivitäten eine gesteigerte *target*-RNA-Repression hervorrufen können. Dieses Erkenntnis wäre vor allem in Hinblick auf RNAi-basierte Therapieansätze äußerst interessant (Tiemann und Rossi, 2009). Ago2 könnte damit neben TRBP und Drosha zum dritten Proteinfaktor werden, dessen Serinphosphorylierung sich positiv auf die RNA-vermittelte Expressionsregulation auswirkt (Paroo *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010; Abschnitt 2.7.1).

Einen gegenteiligen Effekt scheint demgegenüber die Phosphorylierung von Serin-798 auf die *slicer*-Aktivität auszuüben. Die Ago2-S798A-Mutante verhält sich in *in vitro* RISC-Assays wie das Wildtypprotein. Mit der Ago2-S798E-Mutante, die das S798-phosphorylierte Ago2-Protein nachahmt, ist dagegen eine eindeutige Abnahme der *slicer*-Aktivität zu beobachten (Abb. 4.20). Aufgrund der Entfernung von S798 zu den beiden miRNA-Bindungstaschen in der Ago2-Primärsequenz (Abschnitt 2.3.3; Abb. 4.16 C) scheint eine Störung der miRNA-Bindung durch den Serin-Glutaminsäure-Austausch unwahrscheinlich. Jedoch grenzt S798 an die PIWI-Box, die als Ago2-Dicer-Interaktionsplattform fungiert (Tahbaz *et al.*, 2004;

Abschnitt 2.3.3.4), sodass eine Störung der Ago2-Dicer-Wechselwirkung und möglicherweise der miRNA-Beladung denkbar wäre (Abschnitt 2.2). Die Northern-Blotanalyse zeigt jedoch, dass beide S798-Mutanten erstaunlicherweise über das gleiche miRNA-Bindungsvermögen verfügen wie das Wildtypprotein (Abb. 4.22). Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die Mutanten Ago2-S798A und -S798E *in vivo* bis zur Stufe der miRNP/RISC-Assemblierung gleich verhalten. Folglich scheint sich die S798-Phosphorylierung spezifisch auf die RNA-Spaltaktivität von Ago2 auszuwirken. Es wäre zu überprüfen, ob in der Tertiärstruktur eine Distanz von S798 zum DDH-Motiv besteht, oder ob es infolge der Faltung zu Interferenzen im Fall der Glutaminsäuresubstitution bzw. Phosphorylierung kommt. Weitere Studien werden in jedem Fall erforderlich sein, um die zugrunde liegenden molekularen Ursachen im Detail zu verstehen. Spannend wäre auch, das mRNA-Repressionsvermögen der S798-Mutanten *in vivo* zu untersuchen. Möglicherweise können sie über alternative Mechanismen wie *target*-RNA-Destabilisierung durch Rekrutierung von RNA-Abbauenzymen oder Translationsinhibition (Abschnitt 2.4.3) eine Transkriptrepression erreichen. Schließlich spielt die RISC-Aktivität in menschlichen Zellen nur eine untergeordnete Rolle bei der *target*-RNA-Regulation (Abschnitt 2.4.4).

Angesichts der vermuteten inhibierenden Wirkung der S798-Phosphorylierung auf die *slicer*-Aktivität von Ago2 überrascht es, dass nach einer intensiven *in vitro*-Phosphorylierung von immunopräzipitiertem Ago2 durch die Serinkinase *Casein Kinase II* (CK II) keine Auswirkungen im anschließenden *in vitro* RISC-Aktivität erkennbar waren (Abb. 4.24). Tatsächlich entspricht die Primärsequenz im Bereich von S798 jedoch nicht dem klassischen Erkennungsmotiv von CK II. Folglich ist anzunehmen, dass S798 in diesem Versuch nicht phosphoryliert war und infolgedessen die *slicer*-Aktivität nicht beeinträchtigt wurde.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass von der tiefen Charakterisierung der Ago2-Serinphosphorylierung interessante Ergebnisse zu erwarten sind. Speziell die Erforschung

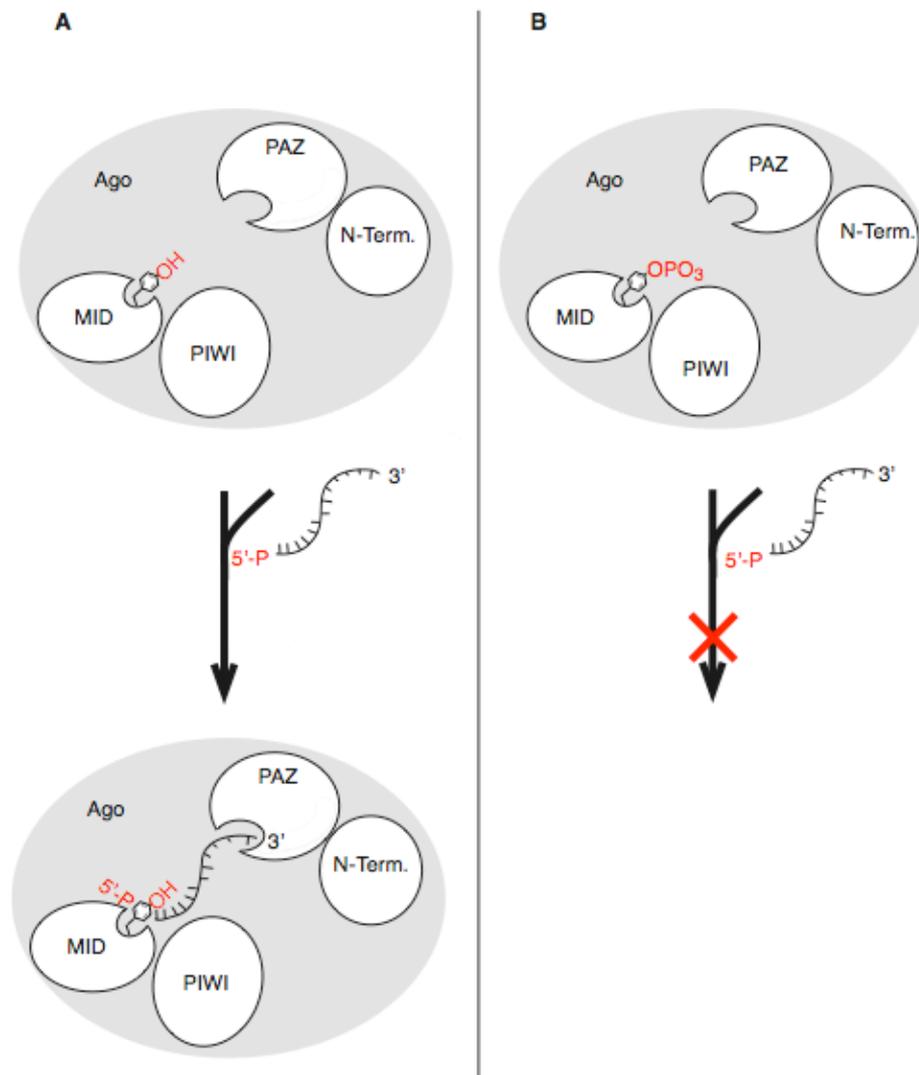
der S798-Phosphorylierung würde mitunter wichtige Einblicke in den molekularen Mechanismus der *slicer*-Aktivität von Ago2 gewähren.

Serinphosphorylierungen treten häufig im Kontext der Zellzyklus- und Zellwachstumsregulation oder der *DNA damage response* (engl., sinngemäß: Stoffwechselreaktionen zum Zweck der DNA-Reparatur) auf (Deribe *et al.*, 2010). Die Identifikation der für die Ago2-Serinphosphorylierung verantwortlichen Kinase(n) würde daher eine grobe Einordnung des miRNA-Signalweges in das zelluläre Signal- und Kommunikationsnetzwerk erlauben.

### 5.2.3 Tyrosinphosphorylierung von Ago2

Bei der massenspektrometrischen Analyse von FH-Ago2 wurden neben der bereits diskutierten Serinphosphorylierung auch die Tyrosinreste Y393 und Y529 als phosphoryliert identifiziert (Abb. 4.16). Tyrosinphosphorylierungen treten häufig im Zusammenhang mit Signaltransduktionskaskaden auf (Deribe *et al.*, 2010) und kommen deutlich seltener vor als Serin- oder Threoninphosphorylierungen. Das Verhältnis von phosphoryliertem Ser:Thr:Tyr wird als 1800:200:1 angegeben (Paradela und Albar, 2008). Die Tatsache, dass Ago2 über Phosphotyrosine verfügt, scheint uns daher von besonderer Bedeutung zu sein.

Die Ergebnisse der Y529-Mutantenanalyse und der Untersuchungen am endogenen Protein (Abschnitt 4.2.4) sprechen dafür, dass die Präsenz eines negativ-geladenen Aminosäurerestes an Position 529 der Ago2-Primärsequenz mit der Bindung kleiner RNAs, die am 5'-Ende phosphoryliert und somit ebenfalls negativ-geladen sind, interferiert. Wir stellen die Hypothese auf, dass die beobachtete Blockade der RNA-Bindung in der gegenseitigen Abstoßung der gleichnamigen, elektrischen Ladungen begründet liegt. Abbildung 5.1 illustriert dieses hypothetische Modell zum molekularen Mechanismus der Ago2-Regulation durch Phosphorylierung von Tyr529.



**Abbildung 5.1**

**Hypothetischer molekularer Mechanismus zur Regulation der miRNA-Beladung von Ago2 durch die Phosphorylierung von Y529**

(A) Ein Ago-Protein, dessen zentraler Tyrosinrest der Bindungstasche für das 5'-Ende der miRNA nicht phosphoryliert ist, bindet kleine 5'-phosphorylierte RNAs. (B) Ist der zentrale Tyrosinrest dagegen phosphoryliert, verhindert dies den Einbau einer 5'-phosphorylierten kleinen RNA in das Protein. Die charakteristischen Ago-Domänen N-Terminus („N-Term.“), PAZ, MID und PIWI sind angedeutet. Chemische Gruppen mit funktionaler Bedeutung für die miRNA-Beladung von Ago sind rot dargestellt.

Für die experimentelle Untersuchung ist es erforderlich, die Tyrosinphosphorylierung durch den Einsatz von Phosphataseinhibitoren vor dem enzymatischen Abbau zu schützen. Ein solcher Inhibitor ist Vanadat, das vor der Anwendung mit Wasserstoffperoxid zur Reaktion gebracht wird, um die biochemisch aktive Molekülspezies Pervanadat zu erzeugen. Anschließend wird der Reaktionsansatz zu den kultivierten Zellen gegeben (Abschnitt 6.2.2.7). Der kritische Punkt hierbei ist, dass das eingesetzte Wasserstoffperoxid bei der Pervanadatdarstellung unter Umständen nicht vollständig umgesetzt wurde. Dadurch kann es zur Auslösung von oxidativem Stress und Signaltransduktionskaskaden kommen, in deren Folge vermehrt Tyrosinseitenketten phosphoryliert werden könnten. Daher ist der Nachweis, dass die untersuchte Modifikation unter physiologischen Normalbedingungen auftritt, von großer Bedeutung.

#### **5.2.3.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung von endogenem Ago2: In Kombination mit einer Co-Expression von Tyrosinkinasen**

In einem experimentellen Ansatz wurde myc-Ago2 zusammen mit einer konstitutiv aktiven Form der Tyrosinkinase Abl bzw. Lyn co-exprimiert. Analysen ergaben, dass unter diesen Bedingungen neben Y393 und Y529 noch neun weitere Tyrosinseitenketten durch Lyn und 16 weitere durch Abl phosphoryliert werden (Abschnitt 4.2.3.2). Die Überexpression von Lyn bzw. Abl schafft folglich unnatürliche physiologische Zustände. Eine weitere Beobachtung war, dass in gleichem Maße wie der Phosphorylierungsgrad von Ago2 infolge der Kinaseexpression zunahm, sich die *slicer*-Aktivität des Proteins verringerte (Abb. 4.27 und Abb. 4.28). Das Ergebnis der Massenspektrometrie zeigt, dass ein Teil der nach Kinaseexpression zusätzlich phosphorylierten Tyrosinreste in der PIWI-Domäne liegen. Da die PIWI-Domäne das aktive Zentrum von Ago2 mit einschließt, ist eine direkte Blockade der *slicer*-Aktivität durch die zusätzlichen Phosphorylierungsstellen denkbar. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass mit der Kinase-Co-Expression der Anteil an Ago2-Moleküle mit einer Y529-Phosphorylierung zunimmt. Die Reduktion der RISC-Aktivität entspräche in dem Fall den Erwartungen, sollte die Y529-Phosphorylierung die miRNA-Bindung wie postuliert verhindern (Abb. 5.1;

Abschnitt 5.2.3.3 und 5.2.3.4). Diese Vermutung sollte durch eine direkte Untersuchung des miRNA-Beladungszustandes von Ago2 mit und ohne Kinase-Co-Expression mittels Northern-Blotanalyse überprüft werden.

Die Tatsache, dass die endonukleolytische Aktivität infolge der Abl-Co-Expression stärker abnimmt als infolge der Lyn-Co-Expression, obgleich gemäß den Massenspektrometrie-Resultaten in beiden Fällen Tyr529 phosphoryliert wird, scheint die vorangegangene Vermutung zu widerlegen. Das Ergebnis des *in vitro* RISC-Experimentes mit  $\alpha$ -pY-Immopräzipitaten von untransfizierten und FH-Ago2-Y529F-haltigen Zelllysaten deutet durchaus darauf hin, dass die Phosphorylierung von Tyr529 tatsächlich einen inhibierenden Einfluss auf die *slicer*-Aktivität von Ago2 ausübt (Abb. 4.56), doch ist dem Experiment auch zu entnehmen, dass die Modifikation anderer Tyrosinreste als Tyr529 ebenfalls einen Aktivitätsverlust bewirkt (Abb. 4.56). Folglich kann die alternative Erklärung durchaus in Betracht gezogen werden.

Höck und Kollegen (2007) entdeckten, dass sich die zelluläre Ago2-Population im Saccharose-Dichtegradienten auf drei distinkte Ago-Komplexe I, II und III aufteilt (Abschnitt 2.5). Interessanterweise waren tyrosinphosphorylierte Ago-Moleküle nach Kinase-Co-Expression nahezu ausschließlich in Komplex I, nicht aber in den Ago-Komplexen II und III nachweisbar (Abb. 4.26). Bei Komplex II und III handelt es sich um hochmolekulare RNPs (Höck *et al.*, 2007). Solche entstehen unter anderem durch Assemblierung von miRNPs mit *target*-mRNAs. Da die *target*-RNA-Assoziation von Ago die Beladung mit einer kleinen RNA voraussetzt und die Y529-Phosphorylierung laut Modell diesen Schritt verhindert (Abb. 5.1; Abschnitt 5.2.3.3 und 5.2.3.4), entspricht das Ergebnis den Erwartungen. Ebenso lässt sich spekulieren, dass Ago2 in RNPs durch die miRNA-Bindung für eine Y529-Phosphorylierung unzugänglich ist und infolgedessen bevorzugt freies Ago2 modifiziert wird.

Ago2 ohne kleine RNA ist endonukleolytisch inaktiv (Abschnitt 2.4.4). Daher würde man erwarten, dass die phosphorylierte Ago2-Spezies in Komplex I keine bzw. eine reduzierte RISC-Aktivität zeigen würde. Tatsächlich beobachten Höck *et al.* (2007) jedoch *slicer*-

Aktivität von Ago2 im Komplex I. Dieser scheinbare Widerspruch kann möglicherweise damit erklärt werden, dass Höck und Kollegen (2007) in ihren Experimenten keine Phosphataseinhibitoren eingesetzt hatten, so dass in ihrer Studie kaum tyrosinphosphorylierte Ago2-Moleküle präsent gewesen sein können. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass unphosphorylierte, RISC-aktive Ago2-Moleküle neben phosphorylierten, RISC-inaktiven im Ago-Komplex I co-existieren. In jedem Fall sind weiterführende Untersuchungen mit einer höheren Auftrennung von Komplex I, *in vitro* RISC-Assays und Northern-Blotanalysen erforderlich, um solide Hypothesen herauszuarbeiten.

Zur gezielten Analyse der Y529-Phosphorylierung wurden weitere Experimente mit myc-Ago2 und der Mutante myc-Ago2-Y529F nach Co-Expression aktivierter Lyn-Kinase durchgeführt (Abb. 4.30). Dabei zeigte sich, dass die Endonukleaseaktivitäten von un- und phosphoryliertem myc-Ago2-Y529F auf  $\pm 1\%$  gleiche Produktmengen hervorbringen, während die Aktivität von phosphoryliertem myc-Ago2 zu etwa 2% weniger RNA-Spaltprodukt gegenüber der unphosphorylierten Spezies führt. Das spricht dafür, dass die Phosphorylierung von Y529 tatsächlich eine Reduktion der *slicer*-Aktivität bewirkt. Allerdings kann hier ganz eindeutig nicht von signifikanten Effekten oder überzeugenden Daten gesprochen werden. Vielmehr scheinen die Resultate fragwürdig. Doch erstens war das Ergebnis mehrfach reproduzierbar. Zweitens ist zu bedenken, dass hier der Effekt einer einzigen Aminosäure versucht wurde zu messen. Unseren Erfahrungen nach werden trotz Co-Expression der Tyrosinkinase nicht alle Ago2-Moleküle Y529-phosphoryliert, so dass selbst in Kombination mit der Kinaseexpression eine Mischpopulation aus Ago2-Y529 und Ago2-pY529 vorliegt. Drittens ist davon auszugehen, dass die einander gegenübergestellten Proteinpopulationen – mit und ohne Lyn-Co-Expression - sich molekular in weiteren Phosphorylierungsstellen unterscheiden, die ebenfalls Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen (siehe oben). Wir möchten diese Resultate daher nicht zur Bekräftigung des von uns aufgestellten Modells heranziehen (Abb. 5.1), aber darauf hinweisen, dass auch in diesem experimentellen Ansatz keine Widersprüche dazu aufgetreten sind.

### 5.2.3.2 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung von endogenem Ago2: Ohne Co-Expression von Tyrosinkinasen

Mit der erfolgreich abgeschlossenen Generierung und Charakterisierung des  $\alpha$ -Ago2-Antikörpers 11A9 (Abschnitt 4.1.2 und 5.1.2) war es möglich, auch am endogenen Ago2-Protein phosphorylierte Tyrosine (pY) nachzuweisen. Dazu wurden tyrosinphosphorylierte Proteine immunopräzipitiert und anschließend die Gegenwart von Ago2 im Immunpräzipitat via Western-Blotanalyse belegt (Abb. 4.54). Der für die Immunopräzipitation eingesetzte  $\alpha$ -pY-Antikörper stellt den limitierenden Faktor in diesem Versuch dar, so dass davon ausgegangen werden muss, dass nicht alle tyrosinphosphorylierten Ago2-Moleküle präzipitiert worden sind. Folglich kann anhand dieses Experimentes keine Aussage zum prozentualen Anteil phosphorylierter Ago2-Proteine an der Ago2-Gesamtpopulation getroffen werden.

Die  $\alpha$ -pY-Immunopräzipitation mit anschließender  $\alpha$ -Ago2-Western-Blotanalyse lässt zudem keinen Rückschluss auf die Identität der phosphorylierten Tyrosinseitenketten zu, sodass unklar ist, ob auch Y529 des endogenen Proteins von der Modifikation betroffen ist. Der Versuch könnte unter Einbeziehung der Mutanten myc-Ago2-Y393F, -Y529F und -Y393/529F wiederholt werden. Erwartungsgemäß sollten diese Proteine mit dem  $\alpha$ -pY-Antikörper in deutlich geringerem Umfang präzipitiert werden können als myc-Ago2. Der finale Identitätsnachweis für das endogene Ago2-Protein wäre jedoch nur durch eine massenspektrometrische Analyse des  $\alpha$ -Ago2- oder  $\alpha$ -pY-Immunpräzipitates zu erbringen. Bislang scheiterte diese Strategie an unzureichenden Probenmengen. Tatsächlich scheinen tyrosinphosphorylierte Ago2-Moleküle eher einen kleinen Teil des zellulären Gesamtpools auszumachen. Noch ist unbekannt, ob sich dieser Eindruck aus experimentellen und/oder technischen Ursachen heraus ergibt oder biologisch bedingt ist. Phosphorylierungen gelten grundsätzlich als wenig stabil; biochemisch aufgrund der zellulären Phosphataseaktivitäten, aber auch chemisch/physikalisch nach Meinung der Fachleute für Massenspektrometrie.

Neben der Identität der Phosphorylierungsstellen wären zur Beurteilung der physiologischen Relevanz der Ago2-Tyrosinphosphorylierung auch der durchschnittliche prozentuale

Anteil der *in vivo* phosphorylierten Ago2-Proteine von Interesse. In diesem Fall wäre Massenspektrometrie nicht die Methode der Wahl, da vorab in der Regel eine selektive Anreicherung der phosphorylierten Proteine erforderlich ist. Dieser zusätzliche Schritt sowie die inhärente Labilität von Phosphotyrosinen würde kaum ein glaubwürdiges Abbild der *in vivo* Situation liefern können. Auch wird Massenspektrometrie primär für qualitative und nicht quantitative Analysen eingesetzt. Sinnvoller scheinen stattdessen Western-Blotexperimente zu sein. Eine Optimierung dieser proteinbiochemischen Analysemethoden sollte daher unbedingt verfolgt werden, beispielsweise im Hinblick darauf, dass phosphoryliertes Ago2 in einem  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitat nachgewiesen werden kann. Momentan ist das vermeintliche Signal neben denen co-präzipitierender Proteine nicht zu erkennen. Eine höhere Auftrennung der Proteine um 100 kD sowie die Generierung eines pY393- und/oder pY529-spezifischen Antikörpers für eine höhere Sensitivität durch selektive Detektion wären denkbare Optimierungsansätze. Auch eine Identifizierung der physiologischen Ago2-Kinase(n) ist in dem Zusammenhang bedeutsam. Überexpressions- und siRNA-vermittelte Depletionsstudien würden nicht nur den Nachweis der phosphorylierten Ago2-Spezies via Massenspektrometrie und Western-Blotanalyse erleichtern, sondern zudem die Möglichkeit eröffnen, zellbiologische Experimente durchzuführen, die zur Identifizierung beteiligter Signaltransduktionskaskaden und/oder von Zellzyklusverbindungen beitragen könnten.

Mit dem  $\alpha$ -Ago2-Antikörper 11A9 konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit zwar ein grundsätzlich nützliches Reagenz für die Untersuchung der Ago2-Phosphorylierung zur Verfügung gestellt werden, doch leider gelang es aus den genannten Gründen bislang nicht, die Analysen am endogenen Protein unter physiologischen Bedingungen erfolgreich abzuschließen. Viele Erkenntnisse zur Ago2-Tyrosinphosphorylierung fußen stattdessen auf Mutantanalysen, bei denen der Aminosäureaustausch Y529E als Imitat für phosphoryliertes Y529 eingesetzt wurde (Abschnitt 4.2.4). Zweifelsohne besteht zwischen einem Glutaminsäure- und einem Phosphotyrosinrest ein struktureller Unterschied (Abb. 4.45). Doch von den durch die natürlich vorkommenden Aminosäuren vorgegebenen Möglichkeiten schien uns diese

Substitution am geeignetsten. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit der Ago2-Punktmutante lassen vermuten, dass eine Phosphorylierung von Y529 *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Regulation von Ago2 spielen könnte, indem sie die miRNA-Bindung verhindert (Abb. 5.1; Abschnitt 5.2.3.3 und 5.2.3.4). Die Strukturmodellierungen der 5'-miRNA-Bindungstasche legen nahe, dass im Fall einer Phosphorylierung von Y529 die Auswirkungen der Y529E-Substitution auf die Funktionalität von Ago2 sogar überboten werden könnten, weil die miRNA-Bindung nicht nur aus elektrostatischen, sondern vermutlich auch aus sterischen Gründen blockiert und somit strikter ausgeschlossen wäre (Abb. 4.45).

Nichtsdestotrotz, die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das endogene Protein und die *in vivo* Situation bleibt ungewiss, solange die geschilderten technischen Schwierigkeiten nicht erfolgreich überwunden werden können.

### 5.2.3.3 Y529-Phosphorylierung von Ago2

Von den zwei als modifiziert identifizierten Ago2-Tyrosinresten, Y393 und Y529, schien die Phosphorylierung von Y529 für eine Regulation von Ago2 aus zwei Gründen besonders prädestiniert zu sein. Erstens ragt Y529 in das Zentrum der Bindungstasche für das miRNA-5'-Ende und durch *stacking* und Wasserstoffbrückenbindung trägt die Tyrosinseitenkette zur Stabilisierung der miRNA-Bindung bei (Ma *et al.*, 2005, Abb. 4.45 A). Zweitens ist diese Aminosäure in allen analysierten Pflanzen- und Tierspezies und auch bei jedem der acht humanen Argonaute-Proteine konserviert (Abb. 4.17).

Leider lässt sich ein Phosphotyrosinrest nicht uneingeschränkt durch eine natürlich vorkommende Aminosäure nachahmen, weshalb mehrere verschiedene Y529-Mutanten erzeugt wurden (Abschnitt 4.2.2). Der Vorteil einer Mutantenanalyse gegenüber Studien am endogenen Protein liegt darin, dass auf die Verwendung von Phosphataseinhibitoren verzichtet werden kann und eine künstliche Induktion zusätzlicher Tyrosinphosphorylierungsereignisse infolge von oxidativem Stress vermieden wird. Mit Ago2-Y529Q traten vereinzelt unvorhersehbare Komplikationen wie geringe Expressionsspiegel, proteolytischer Abbau

oder Denaturieren während Inkubationszeiten auf. Da das Protein ansonsten in Experimenten ein ähnliches Verhalten wie Ago2-Y529A zeigte, wurde bei einigen Versuchen auf diese Mutante verzichtet.

**Tabelle 5.1**  
**Überblick der experimentell ermittelten Eigenschaften der Ago2-Y529-Mutanten**

untersuchte Eigenschaft		Ago2	-Y529F	-Y529A	-Y529E	-Y529Q
5'-Bindungstasche; Abb. 4.45	<i>stacking</i>	☑	☑	✗	✗	✗
	Wasserstoffbrücke	☑	✗	✗	✗	✗
	elektrische Ladung	Y:neutral pY:negativ	neutral	neutral	negativ	vermutlich neutral
Imp8-Interaktion; Abb. 4.31		+++	+++	+++	+++	n. u.
TNRC6B-Interaktion; Abb. 4.32		+++	+++	+++	+++	n. u.
Dicer-Interaktion (Co-IP); Abb. 4.33		+++	+++	+++	+++	+++
Dicer-Interaktion (pre-miR-Prozessierung); Abb. 4.34		+++	+++	+++	+++	+++
miRNA-unabhängige RNA-Repression ( <i>tethering</i> -Assay); Abb. 4.35		+++	++	++	++	++
Migration in Komplex I, II und III im Saccharose-Dichtegradienten; Abb. 4.21		+++	+++	n. u.	+++, vermehrt in Komplex I	n. u.
<i>in vitro</i> RISC-Assay mit endogener miRNA (miR-19b); Abb. 4.36 und 4.37		+++	++	+	-/+	+
<i>in vitro</i> RISC-Assay mit <i>in vitro</i> RNA-Einbau (21.27); Abb. 4.36		+++	+	+	-/+	+
Ago2- <i>knock-down</i> Korrektur <i>in vivo</i> ; Abb. 4.39		+++	+++	+++	+	+++
Ago2- <i>knock-out</i> Korrektur <i>in vivo</i> ; Abb. 4.40		+++	+++	+++	-	n. u.
Lokalisierung in PBs; Abb. 4.41 und 4.42		+++	+++	+++	-	n. u.
<i>in vivo</i> Assoziation mit <i>target</i> -RNA; Abb. 4.43		+++	+++	+++	+	n. u.
Bindung endogener miRNAs (Northern-Blot); Abb. 4.44		+++	++	++	-/+	++
Einbau von 5'-CH <sub>3</sub> -RNA; Abb. 4.47-4.49		+++	++	++	++	n. u.
Einbau von 5'-P-RNA; Abb. 4.47-4.49		+++	++	+	-/+	n. u.

+++ , entspricht Wildtyp; ++ , graduelle Verringerung gegenüber Wildtyp; + , starker Verlust im Vergleich zum Wildtyp; - , keine Aktivität beobachtet; n. u. , nicht untersucht; ☑ , besteht; ✗ , besteht nicht

Keine der Y529-Mutationen beeinträchtigte das Protein-Protein-Interaktionsvermögen von Ago2 gegenüber Importin 8, TNRC6B oder Dicer. Auch *in vivo* Funktionen wie *target*-RNA-Repression blieben unbeeinflusst, wenn die Voraussetzung der miRNA-Bindung experimentell aufgehoben worden waren (*tethering*-Assay, Ende Abschnitt 4.2.4.1). Mit FH-Ago2-Y529F und -Y529A ließ sich zudem eine endogene *target*-mRNA co-präzipitieren, was die

Funktionalität der Proteine zusätzlich unterstreicht. Aufgrund dieser Resultate können die Ago2-Y529-Mutanten vom N- bis zum C-Terminus als strukturell integer angesehen werden. Im Gegensatz dazu waren bei der Wechselwirkung der Mutanten mit RNA verschiedene Defizite erkennbar, speziell bei der die Y529-Phosphorylierung imitierenden Ago2-Y529E-Mutante. Hier wurde ein nahezu vollständiger Verlust der Endonukleaseaktivität, der PB-Lokalisierung und der miRNA-Bindung beobachtet (Tab. 5.1).

Tatsächlich ist die besondere Bedeutung der Aminosäure Y529 für die Funktionalität von Ago2 bereits in früheren Studien beschrieben: Aminosäureaustauschmutanten wiesen auf die Zugehörigkeit zur Bindungstasche für das miRNA-5'-Ende hin, Kristallstrukturanalysen belegen eine Beteiligung dieses Tyrosinrestes an der miRNA-Bindung (Parker *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2005; Boland *et al.*, 2010) und es wird ein RNA-unabhängiges Mitwirken von Y529 in der Ago-TNRC6B-Interaktion vermutet (Till *et al.*, 2007). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse gehen jedoch über die generelle Bedeutung dieses Aminosäurerestes hinaus. Dafür spricht, dass nicht alle Mutanten schwerwiegende Defizite zeigen, sondern spezifisch die mit der Glutaminsäuresubstitution (E). Der kurzkettige, aliphatische Alaninrest (A) stört die miRNA-Bindung von Ago2 nicht (Abb. 4.44) und hat nur eine moderate Reduktion der *slicer*-Aktivität zur Folge (Abb. 4.36 und 4.37). Auch der Phänotyp der zu Ago2-Y529E strukturell ähnlichen Glutaminmutante (Q) entspricht mehr dem der A- als dem der E-Mutante (Tab. 5.1). Daraus schließen wir, dass die von uns beobachteten Effekte nicht allein durch den Verlust des Tyrosinrestes, sondern in der Tat speziell von der negativen Ladung der eingebrachten Glutaminsäureseitenkette hervorgerufen wurden.

Unsere Daten sprechen dafür, dass von Y529 ausgehendes *stacking* und die Wasserstoffbrückenbindung für die miRNA-Bindung weniger essentiell sind, als bislang angenommen wurde. Tatsächlich kamen Ma und Kollegen (2005) zu dem gleichen Ergebnis, als sie die miRNA-Bindungsaffinität verschiedener Ago-Mutanten in einem Filterbindungsassay untersuchten. Sie beobachteten infolge eines Aminosäureaustausches nur eine

geringe Affinitätsabnahme, die jedoch mit der Anzahl der Mutationen im Protein zunahm. Ma und Kollegen (2005) schlussfolgerten, dass mehrere atomare Wechselwirkungen zugleich an der Stabilisierung des miRNA-5'-Endes beteiligt sein müssen.

Von den Ergebnissen der Experimente mit der Ago2-Y529E-Mutante lässt sich ferner ableiten, dass die Ago-Dicer-Interaktion keine hinreichende Bedingung für den Einbau reifer miRNAs in Ago darstellt, auch wenn sie ihn fördern mag (Gregory *et al.*, 2005; Maniataki und Mourelatos, 2005). Zwar ist die Wechselwirkung der Y529E-Mutante mit aktivem Dicer intakt, doch eine miRNA-Bindung erfolgt dennoch nicht. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen von Yoda und Kollegen (2010), denen zufolge die pre-miRNA-Prozessierung durch Dicer und die Beladung des Ago-Proteins mit dem miRNA-Duplex entkoppelt erfolgen. Allerdings können wir anhand der durchgeführten Experimente nicht ausschließen, dass die Dicer-prozessierte miRNA möglicherweise erst an die E-Mutante übergeben wird, jedoch aufgrund der Mutation keine stabile Bindung, sondern eine unmittelbare Freisetzung der RNA resultiert.

Eine detaillierte Betrachtung erfordern die Ergebnisse zur Interaktion mit TNRC6B (Abb. 4.32). Die verschiedenen Y529-Substitutionen beeinflussten die Wechselwirkung nicht, was im Widerspruch zu publizierten Daten steht. Letztere zeigen, dass sich der Austausch von Y529 negativ auf die Ago2-TNRC6B-Interaktion auswirkt (Till *et al.*, 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die *in vivo* präferierte Isoform 1 von TNRC6B verwendet, während Till und Kollegen (2007) mit der Isoform 2 gearbeitet haben und dabei das für die Ago2-Interaktion entscheidende Sequenzmotiv, den *Ago hook*, identifizierten (Abschnitt 2.5.1). Dieser ist in der Isoform 1 von TNRC6B nicht konserviert (Eulalio *et al.*, 2009 (c); eigene Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche). Auch wurden die Co-Immunopräzipitationsexperimente im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mit dem 22 Aminosäuren umfassenden *Ago hook*-Peptid, sondern mit dem gesamten ~200 kD großen TNRC6B-Protein durchgeführt. Daraus resultiert mitunter eine größere Berührungsfläche zwischen den Interaktionspartnern Ago2 und TNRC6B. Zusammen mit der Tatsache, dass Till und

Kollegen (2007) in ihrer Studie neben Y529 zehn weitere Ago2-Aminosäuren mit tragender Funktion bei der Interaktion identifizierten, ist denkbar, dass die zusätzlichen Wechselwirkungen möglicherweise ausreichend waren, um die Y529-Mutation zu kompensieren. Tatsächlich scheint Y529 für die Ago-Interaktion mit GW182-Proteinen nicht von zentraler Bedeutung zu sein, da jüngsten Ergebnissen zufolge verschiedene Bereiche der MID- und PIWI-Domäne von Ago an der Wechselwirkung mitwirken (Eulalio *et al.*, 2009 (b); Lian *et al.*, 2009; Abschnitt 2.5.1).

Die Ergebnisse zum Migrationsverhalten der Y529-Mutanten im Saccharose-Dichtegradienten lassen eine verstärkte Präsenz der Ago2-Y529E-Mutante im Ago-Komplex I erkennen (Abb. 4.21 C). Das erklärt sich – entsprechend den Überlegungen aus Abschnitt 5.2.3.1 - aus der stark minimierten miRNA-Beladung dieser Mutante (Abb. 4.44). Da die *target*-RNA-Assoziation vor allem durch die gebundene, kleine RNA vermittelt wird (Wang *et al.*, 2009 (c)), verhindert die Y529E-Mutation nicht nur die miRNA-Bindung, sondern infolgedessen auch die Assoziation mit *target*-RNAs zu größeren RNPs. Folglich würde man gemäß den Ergebnissen von Höck und Kollegen (2007) mehr Ago2-Y529E-Protein in Komplex I und weniger in Komplex II und III erwarten. Genau das war zu beobachten. Das gleiche gilt für das Migrationsverhalten von Ago2-PAZ9, einer Mutante, deren Bindungstasche für das miRNA-3'-Ende defekt ist und die wie Ago2-Y529E keine detektierbaren Mengen an miRNAs binden kann (Liu *et al.*, 2005 (a)). Der erhöhte Anteil von FH-Ago2-PAZ9-Proteinen im Komplex I ist aufgrund der partiellen Proteolyse weniger offensichtlich als bei FH-Ago2-Y529E (Abb. 4.21 G). Dass beide miRNA-Bindungsmutanten trotz der minimalen miRNA-Bindungsaffinität in Komplex II und III nachweisbar sind, ist möglicherweise eine Folge von Wechselwirkungen mit Proteinen, die Bestandteil der hochmolekularen RNPs sind.

Auch die Beobachtung, dass die E-Mutante als einzige der Ago2-Y529-Mutanten kaum mehr in PBs nachweisbar ist (Abb. 4.41 und 4.42), resultiert aus dem miRNA-Bindungsdefizit des Proteins. Liu und Kollegen (2005 (a)) haben mit der zuvor erwähnten Ago2-PAZ-Mutante zeigen können, dass die PB-Lokalisierung von Ago eine Beladung mit miRNAs

voraussetzt. Zudem verarmen Zellen, bei denen die nukleären miRNA-Prozessierungsproteine Drosha und DGCR8 (Abschnitt 2.2) durch siRNAs depletiert und so die miRNA-Biogenese blockiert wurde, in der Folge an PBs (Pauley *et al.*, 2006).

Unsere experimentell gewonnenen Erkenntnisse zur Ago2-Y529-Phosphorylierung führten uns zu einem Modell, das einen denkbaren molekularen Mechanismus zur Regulation von Ago2 durch diese posttranslationale Modifikation beschreibt (Abb. 5.1). Es besagt, dass Y529-phosphoryliertes Ago2 nicht mit einer miRNA beladen ist/wird, weil die negativen Ladungen der Phosphorylgruppen am 5'-Ende der kleinen RNA und der Seitenkette von Y529 sich gegenseitig abstoßen. Northern-Blotanalysen und *in vitro* RISC-Assays mit 5'-methylierten, -neutralen und 5'-phosphorylierten, -negativ-geladenen kleinen RNAs bestätigen unsere Hypothese: Mit der Y529F-Mutante, einer Imitation der unphosphorylierten, und der Y529E-Mutante, einer Imitation der phosphorylierten Form von Ago2, zeigte sich, dass eine kleine RNA mit ungeladenem 5'-Ende von beiden Mutanten gleichermaßen, eine RNA mit negativ-geladenem 5'-Ende dagegen von Y529E nur halb so gut aufgenommen wurde wie von der F-Mutante (Abb. 4.47-4.49). In diesem Kontext stellt es keinen Widerspruch dar, dass Ago2-Y529E überhaupt detektierbare Mengen der phosphorylierten, einzelsträngigen siRNA aufgenommen hat, obgleich eine miRNA-Bindung nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.44). Die Assemblierung mit den einzelsträngigen, modifizierten siRNAs erfolgte *in vitro* und damit unter anderen Bedingungen als die Ago2-miRNA-Assemblierung *in vivo*. Unterschiede bestehen beispielsweise in der Konzentration der Reaktanten und Produkte, vermutlich auch in den Reaktionsabläufen und -kinetiken sowie eventuell in der An- bzw. Abwesenheit weiterer Proteinfaktoren und ähnlichem. Diese Unterschiede können die verschiedenen Northern-Blotergebnisse mit kleinen, 5'-phosphorylierten RNAs bedingen (Abb. 4.44 und 4.47).

Im *in vitro* RISC-Assay lässt sich nahezu keine *slicer*-Aktivität von Ago2-Y529E nach Zugabe der 5'-phosphorylierten RNA beobachten; gleichzeitig ist die *slicer*-Aktivität nach Inkubation

mit der 5'-methylierten RNA annähernd identisch zu denen der Ago2-Y529F- und Ago2-Y529A-Mutante (Abb. 4.49). Das entspricht dem Ergebnis der Northern-Blotanalyse zum Einbau 5'-modifizierter RNAs, nur wird es im *in vitro* RISC-Assay noch deutlicher (Abb. 4.47 und 4.48). Erstens ist der Aktivitätsassay durch *multiple turn-over*-Effekte (engl., sinngemäß: „mehrfache Substratumsetzung durch einen RISC-Partikel“) begünstigt, die eine Signalverstärkung bewirken und so etwaige Unterschiede klarer hervortreten lassen. Zweitens unterliegt die Northern-Blotanalyse aufgrund der Quervernetzung der miRNA-5'-Enden mit der Membran technischen Limitationen (Pall und Hamilton, 2008). Gerade am 5'-Ende unterscheiden sich die untersuchten RNAs chemisch und tatsächlich erwies sich die Bloteffizienz der 5'-methylierten gegenüber der 5'-phosphorylierten RNA als geringer (nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz, die vom Modell abgeleitete Vorhersage für das miRNA-Bindungsverhalten der Ago2-Y529-Mutanten wird insgesamt durch die Ergebnisse der zwei Versuche zum Einbau von 5' unterschiedlich elektrisch geladenen RNAs bestätigt.

Im Gegensatz zur Ago2-Y529F-Mutante kann die Seitenkette des Tyr529 vom Ago2-Wildtypprotein phosphoryliert werden. Folglich sollte die F-Mutante gemäß der aufgestellten Hypothese mehr RNA binden und eine größere *slicer*-Aktivität zeigen als das Wildtypprotein. Tatsächlich wurde dieses Ergebnis jedoch nie beobachtet (Abschnitt 4.2.4.2 f). Allerdings wurde bei den *in vitro* Experimenten mit den Y529-Mutanten auf Phosphataseinhibitorzugabe verzichtet. Unter diesen Bedingungen ist das Wildtypprotein ebenso unphosphoryliert wie die F-Mutante, was die Beobachtungen möglicherweise erklärt. Dass auch bei den *in vivo* Luciferase-Reporterassays (Abb. 4.39 und 4.40) keine höhere Repression durch die Phenylalanin-austauschmutante beobachtet wurde, könnte ein Indiz dafür sein, dass *in vivo* nur ein geringer Anteil der Ago2-Moleküle Y529-phosphoryliert vorliegt.

#### **5.2.3.4 Modell zur Regulation von Ago2 durch Phosphorylierung von Y529**

Ähnlich wie die Tyrosin-Glutaminsäure-Substitution würde die Phosphorylierung von Tyr-529 eine negative Ladung in der miRNA-Bindungstasche von endogenem Ago2 positionieren

(Abb. 4.45). Es ist daher anzunehmen, dass die Eigenschaften von Ago2-Y529E auf das Y529-phosphorylierte, endogene Protein übertragen werden können. Folglich sollte die Phosphorylierung der Tyr529-Seitenkette die Bindung 5'-phosphorylierter miRNAs ausschließen. Das illustriert unser Modell (Abb. 5.1). Durch den Verlust der miRNA-Bindung würde auch die Assemblierung eines funktionalen miRNPs und somit eine aktive Rolle des phosphorylierten Proteins in der posttranskriptionalen Expressionsregulation verhindert werden. Demnach stellt die Phosphorylierung von Y529 einen potentiellen molekularen Mechanismus zur Regulation der Ago2-Aktivität im Kontext der miRNA-vermittelten Genexpressionsregulation dar.

Wie wird die Modifikation etabliert? Posttranslationale Modifikationen betreffen häufig Seitenketten auf der Oberfläche eines Proteins. Y529 befindet sich dagegen im Zentrum der miRNA-Bindungstasche und ist möglicherweise für mutmaßlich involvierte Tyrosinkinasen nur schwer zu erreichen. Mehrere Studien sprechen dafür, dass Ago2 infolge seiner verschiedenen Funktionen und Aktivitäten Konformationsänderungen erfährt (Yuan *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009 (c); Boland *et al.*, 2010). Möglicherweise gelangt Y529 im Verlauf dieser strukturellen Umwandlungen in eine Position, in der die Seitenkette für Kinasen besser zugänglich ist. Eine Alternative wäre die Phosphorylierung von Y529 durch entsprechend spezialisierte Enzyme. Eine dritte Variante, die sich aus dem Strukturmodell der Bindungstasche erschließt (Abb. 4.45), wäre die Y529-Phosphorylierung durch eine unmittelbare Übertragung der 5'-Phosphorylgruppe der miRNA auf den Tyrosinrest 529 von Ago2. Chemisch gesehen handelt es sich dabei um eine Umesterung, bei der die Phosphorylgruppe von der 5'-Hydroxylgruppe des ersten miRNA-Nukleotids auf die Hydroxylgruppe der Tyrosinseitenkette übergeht. Energetisch neutrale Umesterungen treten beispielsweise zwischen Ribonukleotiden bei *splicing*-Reaktionen auf. DNA-Topoisomerasen geben zudem ein Beispiel für die kovalente Verbindung zwischen Tyrosinseitenketten eines Proteins und endständigen Phosphorylgruppen von Nucleinsäuren. Daher erscheint ein Transfer der Phosphatgruppe von der RNA auf Ago nicht ausgeschlossen. Zu dieser Vermutung wurden

im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit einleitende Experimente durchgeführt. Tatsächlich ließ sich ein 5'-Phosphatrest *in vitro* auf Y529 von Ago2 übertragen (Abb. 4.51 und 4.53). Zu diesem Zeitpunkt ist nicht auszuschließen, dass die Phosphorylgruppe möglicherweise durch andere Mechanismen als einen direkten Transfer von der RNA auf Ago2 übertragen wurde, beispielsweise infolge einer Abbau-bedingten Freisetzung des Phosphatrest, was mit der durchgeführten, wenig sensitiven RNA-PAGE nicht detektiert werden konnte (Abb. 4.52). Jedoch spricht einerseits dagegen, dass nur die 5'-Phosphorylgruppe nicht aber die am 3'-Ende der RNA am Protein nachweisbar war (Abb. 4.53), und andererseits, dass der Phosphatrest nicht an einer beliebigen Aminosäure angefügt wurde, sondern spezifisch an Y529 (Abb. 4.51).

Nichtsdestotrotz, verschiedene Aspekte eines direkten Phosphatgruppentransfers sind derzeit unverstanden: Erstens dürfte der Transfer nicht vor einer *target*-RNA-Repression erfolgen, andernfalls wäre die Ago-Phosphorylierung und eine damit eventuell einhergehende miRNA-Entladung im Kontext der RNA-vermittelten Expressionsregulation wenig sinnvoll. Der Transfer müsste demnach gesteuert werden. Zweitens würde aufgrund der energetischen Neutralität der Umesterungsreaktion ein richtungsbestimmender Parameter entfallen, was einen steten Austausch des Phosphatrestes zwischen RNA und Protein impliziert. Eine biologische Bedeutung dessen ist zu diesem Zeitpunkt nicht ersichtlicht. Denkbar wäre jedoch, dass eventuell zeitgleich mit der Phosphorylierung erfolgende Konformationsänderungen des Proteins als richtungsweisende Größe auftreten. Drittens und am bedeutendsten ist jedoch die Tatsache, dass bei einem direkten Übertrag des Phosphatrestes keine gleichnamigen Ladungen in der Bindungstasche auftreten. Demnach käme es in Folge Ago-Phosphorylierung zu keiner Abstoßung und somit zu keiner Freigabe der miRNA. Eine regulierende Bedeutung der Ago2-Y529-Phosphorylierung, wie sie im Modell vorgeschlagen wird (Abb. 5.1), wäre damit hinfällig.

Hinsichtlich der biologischen Bedeutung der Ago2-Y529-Phosphorylierung ist die Vorstellung eines Recycling-Mechanismus faszinierend. Die Modifikation von Ago2-Y529 würde

dabei zur miRNA-Entladung des Proteins führen. Das phosphorylierte, nun freie Ago2 würde schließlich dephosphoryliert und stünde daraufhin für eine erneute miRNA-Beladung zur Verfügung. Dieses Szenario ist jedoch nicht ohne weiteres mit dem zuvor diskutierten direkten Übertrag der 5'-Phosphorylgruppe von der RNA auf die Seitenkette von Y529 zu vereinbaren. Außerdem müsste die Y529-Phosphorylierung an miRNA-beladenem Ago-Protein erfolgen. Das scheint aufgrund der sterischen Verhältnisse in der Bindungstasche unwahrscheinlich (Abb. 4.45 B).

Es ist in weiterführenden Studien zu klären, ob nur unbeladenes Ago2 phosphoryliert wird, was laut dem eingangs erwähnten Modell die Beladung von Ago mit miRNAs verhindern würde, oder ob auch miRNA-beladene Proteine modifiziert werden können, was eine direkte Beeinflussung der miRNA-Bindung durch die Modifikation bedeuten würde. Nur wenn sich letzteres bewahrheitet, wäre ein Recycling-Mechanismus vorstellbar.

#### **5.2.4 Aspekte für das weitere Studium der Regulation humaner Argonaute-Protein durch posttranslationale Modifikationen**

Am Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit stand die Identifikation der Ursache für die endonukleolytische Inaktivität von humanem Ago3-Protein im Vergleich zu humanem Ago2. Als ein möglicher molekularer Auslöser wurden posttranslationale Modifikationen der Argonaute-Proteine in Betracht gezogen. Im Verlauf der experimentellen Untersuchungen stellte sich heraus, dass unter anderem Y529, ein entwicklungsgeschichtlich hoch konservierter Aminosäurerest der 5'-miRNA-Bindungstasche von Ago2, *in vivo* phosphoryliert wird. Tyrosinphosphorylierungen stellen verhältnismäßig seltene Ereignisse dar und so wurde die Charakterisierung dieser Entdeckung schließlich zum zentralen Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Folglich steht die Ergründung der molekularen Ursache für die differente Aktivität der humanen Ago-Proteine 2 und 3 weiterhin aus und ist nicht zuletzt hinsichtlich der medizinischen Anwendung der RNAi-Technologie und ihrem therapeutischen Nutzen von unvermindertem Interesse.

Angesichts des hohen Konservierungsgrades von Tyrosin-529 (Abb. 4.17) sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung dieser Aminosäure ebenfalls konserviert ist und bei allen acht humanen Argonaute-Proteinen auftritt, bzw. warum und mit welchen Konsequenzen dem nicht so ist. Eine Konservierung scheint nahe liegend, da auch Ago1, 3 und 4 miRNAs binden (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004 (b)) und die Phosphorylierung als potentieller Regulationsmechanismus hier angreift.

In den vorangegangenen Abschnitten 5.2.1-5.2.3 wurde bereits auf noch durchzuführende Untersuchungen im Rahmen der Charakterisierung der Ago2-Phosphorylierung hingewiesen. Dazu gehören unter anderem die Verifizierung der Y529-Phosphorylierung für das endogene Ago2-Protein und der Nachweis der physiologischen Relevanz dieser Modifikation. Sollten die zukünftigen Studien belegen können, dass der miRNA-Beladungsstatus und infolgedessen die Funktionalität von Ago2 *in vivo* über die Phosphorylierung von Y529 reguliert wird, wäre das auch für die Medizin und Pharmaindustrie von großer Bedeutung. Für verschiedene Krankheiten, bei denen die Fehlexpression von miRNAs eine Rolle spielt, z.B. bei einigen Krebserkrankungen (Croce, 2009), würde die Inaktivierung von Ago2 durch Y529-Phosphorylierung eine neue Option für die Medikamentenentwicklung und Therapie darstellen.

Schließlich sollte die massenspektrometrische Analyse von Ago-Proteinen auf weitere posttranslationale Modifikationen ausgedehnt werden. Beispielsweise hat man PRMT5 in Ago-Proteinreinigungen nachweisen können (Meister *et al.*, 2005). Da auch PIWI-Proteine in einer PRMT5-katalysierten Reaktion methyliert werden (Chen *et al.*, 2009; Kirino *et al.*, 2009; Nishida *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Vagin *et al.*, 2009; Abschnitt 2.7.2), scheint der Ansatz viel versprechend.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben wurden die Chemikalien in Analyse-Qualität von *GE Healthcare* (Buckinghamshire, UK), *Biorad* (Hercules, USA), *Merck* (Darmstadt, Deutschland), *Qiagen* (Hilden, Deutschland), *Roche Diagnostics* (Penzberg, Deutschland), *Carl Roth GmbH + Co. KG* (Karlsruhe, Deutschland), *AppliChem* (Darmstadt, Deutschland), *PAA* (Pasching, Österreich) und *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland) bezogen. Radiochemikalien wurden bei *Perkin Elmer* (Waltham, USA) bestellt. Enzyme stammten von den Firmen *New England Biolabs* (Ipswich, USA), *Promega* (Mannheim, Deutschland) und *Fermentas* (Burlington, Kanada).

#### 6.1.2 Plasmide

VP5	erlaubt die Expression des Gens von Interesse als Fusion mit N-terminalem FLAG/HA-Fusionspeptid (FH-) in Säugerzellen
VP5-FAME	VP5-Plasmid ergänzt um die <i>FseI</i> - <i>AscI</i> -Kassette (Abschnitt 4.1.1); FAME = <i>FseI</i> - <i>AscI</i> -Kassette <b>Meister-AG</b>
pCS2	erlaubt die Expression des Gens von Interesse mit N-terminalem, sechsfachem myc-Fusionspeptid in Säugerzellen
pCS2-FAME	pCS2-Plasmid ergänzt um die <i>FseI</i> - <i>AscI</i> -Kassette (Abschnitt 4.1.1); FAME = <i>FseI</i> - <i>AscI</i> -Kassette <b>Meister-AG</b>
pCIneo-NHA	gestattet die Expression des Wunschproteins in Fusion mit dem $\lambda$ N-HA-Peptid, letzteres steht N-terminal
pCIneo-HA	gestattet die Expression des Wunschproteins in Fusion mit dem HA-Peptid, letzteres steht N-terminal

pCI-RL-5boxB	Kodiert den <i>open reading frame</i> (ORF) der <i>Renilla</i> -Luziferase in Fusion mit einer 3' gelegenen, fünffachen Kopie des Hämoglobin boxB-Aptamers
pMIR	kodiert den ORF der <i>Firefly</i> -Luziferase unter Kontrolle des CMV Promotors; <i>multiple cloning site</i> (MCS) in der 3'-UTR (engl. <i>untranslated region</i> ) erlaubt die Klonierung und Analyse von miRNA-Bindungssequenzen
pMIR-RNL-Tk	trägt die kodierenden Sequenzen für die <i>Renilla</i> und die <i>Firefly</i> -Luziferase; erstere unter Kontrolle des SV40-, zweitere unter der Kontrolle des HSV-Tk-Promotors (Höck <i>et al.</i> , 2007). In der 3'UTR der <i>Firefly</i> -Luziferase befindet sich die MCS, was die Klonierung und Analyse von miRNA-Bindungssequenzen erlaubt.

**Tabelle 6.1**  
**Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidkonstrukte**

Protein	Konstrukt	Plasmid	5' - / 3'-RE	Mutation
Ago1	FH-Ago1	pIRESneo	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>	WT
	myc <sub>6</sub> -Ago1	pCS2	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	WT
Ago2	FH-Ago2	pIRESneo	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>	WT
	myc <sub>6</sub> -Ago2	pCS2	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	
	λN-HA-Ago2	pCIneo-λN-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	
Ago3	HA-Ago2	pCIneo-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	WT
	FH-Ago3	pIRESneo	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>	
Ago4	myc <sub>6</sub> -Ago3	pCS2	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	WT
	FH-Ago4	pIRESneo	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>	WT
Dicer	myc <sub>6</sub> -Ago4	pCS2	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	WT
	FH-Dicer-His <sub>6</sub> (M. Loef)	pDEST-puro	<i>SalI</i> / <i>NotI</i>	WT
	FH-Dicer	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	WT
	myc <sub>6</sub> -Dicer	pCS2-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	WT
Imp8 (Weinmann <i>et al.</i> , 2009)	FH-Imp8	VP5	<i>NotI</i> / <i>BamHI</i>	WT
TNRC6B	myc <sub>6</sub> -TNRC6B	pCS2-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	WT
GST	myc <sub>6</sub> -GST	pCS2-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	pGEX-6p1 Sequenz
PABPC1	FH-PABPC1	VP5	<i>NotI</i> / <i>BamHI</i>	WT
GFP	FH-GFP	VP5	von G. Meister	
	myc <sub>6</sub> -GFP	pCS2-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	VP5-GFP-Sequenz
PRMT5 (Meister <i>et al.</i> , 2005)	FH-PRMT5	PENTR-4 / Destination	<i>SalI</i> / <i>NotI</i>	WT
FMRP	λN-HA-FMRP	pCIneo-λN-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	WT
	HA-FMRP	pCIneo-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	WT

Protein	Konstrukt	Plasmid	5'- / 3'-RE	Mutation
Ago2-H807R	FH-Ago2-H807R	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	katalytische Triade
Ago2-PAZ9 (Liu <i>et al.</i> , 2005)	FH-Ago2-PAZ9	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Bindungstasche für miRNA 3' Ende
	$\lambda$ N-HA-PAZ9	pCIneo-NHA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	
	HA-PAZ9	pCIneo-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	
Ago2- $\Delta$ N	FH-Ago2- $\Delta$ N	VP5	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>	Deletion des N-Terminus
Ago2- $\Delta$ NL	FH-Ago2- $\Delta$ NL	VP5	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>	Deletion von N-Terminus und L1
Ago2-S253A	FH-Ago2-S253A	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Ser ähnlich, nicht phosphorylierbar
Ago2-S253E	FH-Ago2-S253E	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	imitiert Phosphoserin
Ago2-S300A	FH-Ago2-S300A	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Ser ähnlich, nicht phosphorylierbar
Ago2-S300E	FH-Ago2-S300E	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	imitiert Phosphoserin
Ago2-T303V	FH-Ago2-T303V	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Thr ähnlich, nicht phosphorylierbar
Ago2-T303,307V	FH-Ago2-T303,307V	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Thr-Reste zu nicht phosphorylierbaren Val-Resten mutiert
Ago2-S387A	FH-Ago2-S387A	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Ser ähnlich, nicht phosphorylierbar
Ago2-S387E	FH-Ago2-S387E	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	imitiert Phosphoserin
Ago2-Y393A	FH-Ago2-Y393A	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Standardmutante
Ago2-Y393F	FH-Ago2-Y393F	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Tyr ähnlich, nicht phosphorylierbar
Ago2-Y393Q	FH-Ago2-Y393Q	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Partialladungen
Ago2-Y393,529F	FH-Ago2-Y393,529F	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Doppelmutante
Ago2-Y529A	FH-Ago2-Y529A	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Standardmutante
	myc <sub>6</sub> -Ago2-Y529A	pCS2-FAME		
	$\lambda$ N-HA-Ago2-Y529A	pCIneo- $\lambda$ N-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	
	HA- Ago2-Y529A	pCIneo-HA		
Ago2-Y529F	FH-Ago2-Y529F	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Tyr ähnlich, nicht phosphorylierbar
	myc <sub>6</sub> -Ago2-Y529F	pCS2-FAME		
	$\lambda$ N-HA-Ago2-Y529F	pCIneo- $\lambda$ N-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	
	HA- Ago2-Y529F	pCIneo-HA		
Ago2-Y529E	FH-Ago2-Y529E	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	negative Ladung in miRNA- Bindungstasche
	myc <sub>6</sub> -Ago2-Y529E	pCS2-FAME		
	$\lambda$ N-HA-Ago2-Y529E	pCIneo- $\lambda$ N-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	
	HA- Ago2-Y529E	pCIneo-HA		
Ago2-Y529Q	FH-Ago2-Y529Q	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Partialladungen
	myc <sub>6</sub> -Ago2-Y529Q	pCS2-FAME		
	$\lambda$ N-HA-Ago2-Y529Q	pCIneo- $\lambda$ N-HA	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	
	HA- Ago2-Y529Q	pCIneo-HA		
Ago2-Y529E,L642P	FH-Ago2-Y529E,L642P	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Tyr529 zu Glu, Leu642 zu Pro
Ago2-S798A	FH-Ago2-S798A	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Ser ähnlich, nicht phosphorylierbar
Ago2-S798E	FH-Ago2-S798E	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	imitiert Phosphoserin
Ago2-S798,824E	FH-Ago2-S798,824E	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	Doppelmutante, imitiert Phosphoserin

Protein	Konstrukt	Plasmid	5'- / 3'-RE	Mutation
Ago2-S824E	FH-Ago2-S824E	VP5-FAME	<i>FseI</i> / <i>AscI</i>	imitiert Phosphoserin
Abl-Kinase (A. Ullrich-AG, MPIB)	Abl	pRK5		konstitutiv aktive Mutante
Lyn-Kinase (A. Ullrich-AG, MPIB)	Lyn	pA puro		konstitutiv aktive Mutante
pMIR-RNL-Tk-miR21 (Höck <i>et al.</i> , 2007)	<i>Firefly</i> -Luziferase- mRNA-Reporter mit miR-21- Bindungssequenz in der 3'UTR	pMIR-RNL-Tk	<i>SacI</i> / <i>NaeI</i>	WT

Für verwendete aber nicht selbst erzeugte Konstrukte ist die Originalquelle angegeben. Indizes, die die Kopienanzahl der Fusionspeptide wiedergeben, sind in den nachfolgenden Kapiteln nicht mit angeführt. RE, Restriktionsenzym

### 6.1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 6.2**  
**Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (DNA und RNA)**

Bezeichnung	Sequenz
<b>Vektormodifikation</b>	
FA-fwd-baccis	ataggatcctattatagccggccattaataggcgcgcatatatgaattctat
FA-rev-baccis	atagaattcatatatggcgcgcctattaatggccggcctataataggatcctat
pCS2-FA-fw	aattcaaggccggcccaggcctc
pCS2-FA-rev	tcgagaggcctggccggccttg
VP5-FA-fwd	atagcggccgctattatagccggccattaataggcgcgcatatatagaattctat
VP5-FA-rev	atagaattctatatatggcgcgcctattaatggccggcctataatagcggccgctat
<b>Sequenzierprimer</b>	
pGEX6p1_seq869-891fwd	gggctggcaagccacgtttggg
pGEX6p1_seq1031-1056_rev	ccgggagctgcatgtgtcagagg
pET28a_seq239-216_fwd	atggctagcatgactggtggacag
pET28a-seq115-93-rev	gcagccaactcagcttcttctg
VP5 sequ fwd	cgaaattaatcagactcactatag
VP5 sequ rev	ccaacagctggcgcctcgcaga
pMIR 3'UTR fwd	gaaagtccaaattgctcgag
pMIR 3'UTR rev	accaacacacagatccaatg
pCIneo-NHA fwd_1121	gcgtcgcgctgagaacaagc
pCIneo-HA fwd_1055	ggctagagtacttaatacagactcac
pCIneo rev_1300-1400	gcttataatggttacaataaagcaatagc
pCS2 sequ fwd	tggtcttttgcaggatcccatc
pCS2 sequ rev	gttggtttgtccaaactcatc
Dicer_1/8sequ. fwd	ggttgaactgctgaagcagc
Dicer_2/8sequ. fwd	gattctactttaatttcgaaacag
Dicer_3/8sequ. fwd	gagggtgtgatataccaaaatgc
Dicer_4/8sequ. fwd	ggatagttatcccagacctg
Dicer_5/8sequ. fwd	ggaccacacatctcaagac
Dicer_6/8sequ. fwd	ccagccccagcccagcgatg
Dicer_7/8sequ. fwd	gataatagttaatggggctcagg
Dicer_8/8sequ. fwd	ctgtggccagttcacgctctctg
<b>Klonierungsprimer</b>	
2nd Dicer Fse fwd	ataggccggccatgaaaagccctgctttgcaac
Dicer Asc rev	ataggcgcgcctcagctattgggaacctgagg

Bezeichnung	Sequenz
<b>Klonierungsprimer</b>	
KIAA1093-fw-Fse (TNRC6B)	ttaggccggccatgagagagaaggagcaagaaaggg
KIAA1093-rev-Asc (TNRC6B)	aatggcgcgccctcagattgaatccgacctctccc
GST-fw-Fsel	ataggccggccatgtcccctatactaggttat
GST-rev-Ascl	ataggcgcgcccagggggcccctggaacagaac
PABPC1orf-fwNotI	ttagcggccgcatgaaccccagtgccccagctac
PABPC1orf_revBamHI	acgtggatcctaaacagttggaacaccgggtggcactg
GFP-fw-Fsel	ataggccggccatggtgagcaagggcgag
GFP-rev-Ascl	ataggcgcgccctacttctgtacag
Fw-FMR1-EcoRI	cgctgaattcatggaggagctggtggtgga
Rev-FMR1-NotI	cgctgcgccgcttaggtactccattcac
hAgo1-fw-Fsel	ataggccggccatggaagcgggaccctcggg
hAGO1_rev_AscI	ataggcgcgcccaagcgaagtacatggtgcg
hAGO2_fwd_EcoRI	agcgaattccatgtactcgggagccggccc
hAGO2_rev_NotI	gtagcggccgctcaagcaaagtacatggtgcgag
Ago2-Fsel-fw (für pCS2)	atctggccggcccatgtactcgggagccggccccgcac
hAgo2-fw-Fse (für pCS2-FAME)	aaaggccggccatgtactcgggagccggcc
Ago2-Ascl-rev	atctggcgcgccctatcaagcaaagtacatggtgcgagagt
hAgo2_EcoRI_rev	atagaattcctcaagcaaagtacatggtgcgag
hAgo3-Fse-fw	aaaggccggccatggaatcggctccgcagg
hAgo3-Asc-rev	ataggcgcgccctattaagcgaagtacattgtg
hAgo4-Fse-fw	aaaggccggccatgagggcgtgggaccgg
hAgo4-Asc-rev	ataggcgcgccctcaggcaaaatacatcgtgtgc
<b>Mutageneseprimer</b>	
Ago2-H807R-fw	ccagcactactcgtcgcctggtggcc
hAgo2-N_Not_fwd	atagcggccgcatgtccatgaggtacacccccg
hAgo2-NL_Not_fwd	atagcggccgcatggcacagccagtaatcagat
Ago2-S253A-rev	ctttacccttggcatctgtcagagg
Ago2-S253E-rev	ctttacccttggcatctgtcagagg
Ago2-S300A-rev	ctgcccggcctcctgctggagcggg
Ago2-S300E-rev	ctgcccctcctcctgctggagcggg
Ago2-T303/307V-rev	ccaccacgcactccaccacctgcccgtctcctgctggagcg
Ago2-S387A-rev	ggatccgtgttgaaggctgcacttcgc
Ago2-S387E-rev	ggatccgtgttgaattctgcacttcgc
Ago2-Y393A-rev	ggactgctggatccgtgttgaacttcgc
Ago2-Y393F-rev	ggacgaatggatccgtgttgaacttcgc
Ago2-Y393Q-rev	ggacctgtggatccgtgttgaacttcgc
Ago2-Y529A-fw	gcccgggaagacgcccgtggcagccgagg
Ago2-Y529F-fw	gcccgggaagacgcccgtgttcgcccgagg
Ago2-Y529E-fw	gcccgggaagacgcccgtggaggccgagg
Ago2-Y529Q-fw	gcccgggaagacgcccgtgcaggccgagg
Ago1/2-S798A-fw	gcacacgctccgtggccatcccagcgcagc
Ago1/2-S798E-fw	gcacacgctccgtggagatcccagcgcagc
Ago2-S824E-fw	gtggataaggaacatgacgaggctgaagg
<b>siRNAs</b>	
hsAgo2 sense	r(gcacggaaguccaucugaau)dt
hsAgo2 antisense	r(uucagauaggacuuccgugcu)dt
hAg2 3'UTR_Is	r(ccgucccagauuucaacu)dt
hAg2 3'UTR_las	r(aaguuuuagaaucugggacgg)dt
UNBIAS sense forward	r(uugucuugcauucgacuaau)dt
UNBIAS antisense reverse	r(uuagucgaauugcaagacaau)dt
21.27	r(ucgaaguauuccgcuacgu)dt
21.28	r(cguacgcggaauacuucgau)dt
CH <sub>3</sub> -21.27	CH <sub>3</sub> -r(ucgaaguauuccgcuacgu)dt
P-21.27	P-r(ucgaaguauuccgcuacgu)dt

Bezeichnung	Sequenz
<b>RT-Primer</b>	
Rap1a-q-fwd	tctcactgcaccttcaatgg
Rap1a-q-rev	ctgtcagagcagacttcca
GAPDH RT fwd	tggtatcgtggaaggactcatgac
GAPDH RT rev	atgccagtgagctcccgttcagc
<b>sonstige DNA-Oligonukleotide</b>	
T7 primer cleavage	taatacgactcactatagaacaattgcttttacag
SP6 primer cleavage	atttaggtgacactataggcataaagaattgaaga
miR-19b Sonde	tcagtttgcattggattgcaca
21.27 Sonde	cgtacgcggaataactcgat
21.28 Sonde	tcgaagtattccgcgtacgt

### 6.1.4 Antikörper

**Tabelle 6.3**

**Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper**

Name	Antigen	Ursprung	Referenz/Hersteller
$\alpha$ -HA	HA	Maus, monoklonal	<i>HISS Diagnostics</i>
$\alpha$ -myc	myc	Kaninchen, polyklonal	<i>Sigma-Aldrich</i>
$\alpha$ -LSm4	LSm4	Huhn, monoklonal	<i>Geneway</i>
$\alpha$ -rS6	ribosomales Protein S6	Kaninchen, monoklonal	<i>Cell Signaling Technology</i>
$\alpha$ -Actin (AC-15)	$\alpha, \beta$ -Actin	Maus, monoklonal	<i>Abcam</i>
$\alpha$ -hsAgo2 (11A9)	Ago2-Peptid	Ratte, monoklonal	Rüdel <i>et al.</i> , 2008
$\alpha$ -FLAG (3H3)	FLAG-Peptid	Ratte, monoklonal	E. Kremmer, Helmholtz-Zentrum München
$\alpha$ -Phosphotyrosin ( $\alpha$ -pY) (4G10)	Phosphotyrosin	Maus, monoklonal	freundlicherweise bereitgestellt von der A. Ullrich-AG (MPIB)
$\alpha$ -RMC (16D2)	C4-Protein des Komplementsystems von Ratten/Mäusen	Ratte, monoklonal	E. Kremmer, Helmholtz-Zentrum München
$\alpha$ -Maus IgG, Peroxidase-konjugiert		Ziege, polyklonal	<i>Sigma</i>
$\alpha$ -Ratte IgG, Peroxidase-konjugiert		Ziege, polyklonal	<i>Jackson laboratories</i>
$\alpha$ -Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert		Ziege, polyklonal	<i>Sigma</i>
$\alpha$ -Ratte IgG, TexasRed-konjugiert		Ziege, polyklonal	<i>Vector laboratories</i>
$\alpha$ -Huhn IgY, FITC-konjugiert		Kaninchen, polyklonal	<i>Sigma</i>
$\alpha$ -Maus IgG, TexasRed-konjugiert		Pferd, polyklonal	<i>Vector laboratories</i>

### 6.1.5 Organismen und Zelllinien

Bakterienstämme:	<i>E. coli</i> -Stamm XL1 blue		
humane Zelllinien:	HEK 293	HeLa	RPE-1
	T98G	C33A	H1299
	HCT116	U2-OS	RD#33
	A549	MCF-7	CRL-1973
	CRL-1740		
weitere Zelllinien (murin):	N2A	MEF Ago2 <sup>-/-</sup> (Liu <i>et al.</i> , 2004)	

### 6.1.6 Kulturmedien

Für die Kultivierung der oben aufgeführten Säugerzelllinien und die Experimente wurden folgende Zellkulturmedien verwendet:

#### Vollmedium:

500 ml	DMEM <i>high glucose</i> (4,5 g/l) mit L-Glutamin und Natriumpyruvat (PAA)
10% (v/v)	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Biochrom, Berlin, Deutschland)
1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin (PAA)

#### Einfriermedium:

Vollmedium mit 10% (v/v) DMSO (Zellkulturqualität)

#### Medium für die Transfektion mit kommerziellen Transfektionsreagenzien:

Opti-MEM (*Gibco*)

#### Markierungsmedium (*in vivo* Markierung mit <sup>32</sup>P):

500 ml	DMEM <i>high glucose</i> (4,5 g/l) mit L-Glutamin und Natriumpyruvat (PAA)
2% (v/v)	<i>Fetal Bovine Serum</i> ( <i>Biochrom, Berlin, Deutschland</i> )
0,2% (v/v)	Penicillin/Streptomycin (PAA)

Für die Kultivierung von Bakterien und molekularbiologische Arbeiten wurden folgende Medien verwendet:

<u>LB</u>	1% (w/v)	Trypton
	1% (w/v)	NaCl
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt

<u>Selektionsmedien:</u>	LB mit 0,1 mg/ml Ampicillin
	LB mit 0,03 mg/ml Kanamycin

### 6.1.7 Puffer und Lösungen

PBS ( <i>phosphate-buffered saline</i> )	130 mM	NaCl
	77,4 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)
	22,6 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
TBS ( <i>Tris-buffered saline</i> )	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	150 mM	NaCl
1x TBE	89 mM	Tris/HCl pH 8,3
	89 mM	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
Proteinprobenpuffer 4x	400 mM	Tris/HCl pH 6,8
	5 mM	EDTA
	1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
	50% (v/v)	Glycerin
	10% (v/v)	β-Mercaptoethanol
DNA-Ladepuffer 5x	30% (w/v)	Saccharose
	0,025% (w/v)	Xylencyanol
	0,025% (w/v)	Bromphenolblau

RNA-Probenpuffer	90% (v/v)	Formamid
	0,025% (w/v)	Xylencyanol
	0,025% (w/v)	Bromphenolblau

### 6.1.7.1 Lösungen für RNA-Arbeiten

Proteinase K Reaktionspuffer 2x	200 mM	Tris/HCl pH 7,5
	25 mM	EDTA
	300 mM	NaCl
	2% (w/v)	SDS
Proteinase K Lagerungspuffer	200 mM	Tris/HCl pH 7,5
	25 mM	EDTA
	300 mM	NaCl
	50% (v/v)	Glyzerin
RNA-Gelelutionspuffer	500 mM	Ammoniumazetat
	10 mM	Magnesiumazetat
	0,1 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	SDS
Guanylyltransferase-Reaktionspuffer	400 mM	Tris/HCl pH 8,0
	60 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 mM	DTT
	20 mM	Spermidin
RISC-Assay	40 mM	KCl
2x Reaktionspuffer	5 mM	DTT
	1 mM	ATP
	0,2 mM	GTP
	1,2 U	RNase-Inhibitor
	4 mM	MgCl <sub>2</sub>

RNase T1-Lösung	25 mM	Natriumcitrat pH 5,0
	7 M	Harnstoff
	0,05% (w/v)	Xylencyanol
	0,05% (w/v)	Bromphenolblau
	1400 U	RNase T1

<i>carrier</i> -RNA-Lösung	28 mM	Natriumcitrat pH 5,0
	7,8 M	Harnstoff
	0,05% (w/v)	Xylencyanol
	0,05% (w/v)	Bromphenolblau
	0,12 µg/µl	tRNA

### 6.1.7.2 Reagenzien für die Northern-Blotanalyse

EDC-Lösung	160 mM	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)
	gelöst in 130 mM	1-Methylimidazole, pH 8.

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

Denhardt's Lösung 50x	1% (w/v)	Albumin (Fraktion V)
	1% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon K30
	1% (w/v)	Ficoll 400

Hybridisierungslösung	5x	SSC
	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,2
	7% (w/v)	SDS
	1x	Denhardt's Lösung
	0,1 mg/ml	sonifizierte DNA aus Lachssperma

Northern-Blot-Waschlösung I	5x	SSC
	1% (w/v)	SDS

Northern-Blot-Waschlösung II	1x	SSC
	1% (w/v)	SDS

### 6.1.7.3 Lösungen für die Protein-Analytik

Sammelpuffer 8x	0,92 M	Trisbase	pH 6,8
	0,8% (w/v)	SDS	
Trennpuffer 4x	1,44 M	Trisbase	pH 8,8
	0,4% (w/v)	SDS	
1x SDS-Gellaufpuffer	200 mM	Glycin	pH 7,5
	25 mM	Trisbase	
	25 mM	SDS	
Western-Blot-Transferpuffer ( <i>Towbin buffer</i> )	192 mM	Glycin	
	0,025 mM	Trisbase	
	20% (v/v)	Methanol	
Western-Blot-Waschpuffer	30 mM	Tris/HCl pH 7,5	
	150 mM	NaCl	
	0,25%	Tween-20	
Western-Blot- <i>Stripping</i> -Lösung	62,5 mM	Tris/HCl pH 6,7	
	2% (w/v)	SDS	
	100 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol	
Detektionslösung für Western-Blots	10 ml	Lösung A (1,25 mM Luminol in 100 mM Tris/HCl pH 8,5)	
	150 $\mu$ l	6,8 mM p-Kumarinsäure in DMSO	
	4% (v/v)	Wasserstoffperoxidlösung (30%ig)	
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v)	Coomassie R250	
	50% (v/v)	Methanol	
	10% (v/v)	Essigsäure	
Coomassie-Entfärbelösung	30% (v/v)	Methanol	
	10% (v/v)	Essigsäure	

#### 6.1.7.4 Lösungen für die Silberfärbung (für die Massenspektrometrie geeignet)

Fixierer	50% (v/v)	Methanol
	12% (v/v)	Essigsäure
Natriumthiosulfatlösung	200 mg/l	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silberlösung	2 g/l	AgNO <sub>3</sub>
	375 µl/l	Formaldehyd (37%ig)
Färbelösung	60 g/l	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	5 mg/l	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	250 µl/l	Formaldehyd (37%ig)

#### 6.1.7.5 Lösungen für immunbiochemische Protein-Arbeiten

IP-Waschpuffer (Standard)	300 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,05% (v/v)	NP-40
Ago2-Peptidpuffer	300 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,05%	NP-40

#### 6.1.7.6 Zellysepuffer

Lysepuffer Säugerzellen (für Gesamtzelllysate)	150 mM	NaCl
	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	2 mM	EDTA
	0,5%	NP-40
	1 mM	NaF
	0,5 mM	DTT
	1 mM	AEBSF (Proteaseinhibitor)
	nach Bedarf 1-10 mM	Natriumpervanadat (Phosphataseinhibitor)

Roeder A-Puffer	10 mM	KCl
(für Zytoplasmaextrakte)	10 mM	Hepes/KOH (pH 7,9)
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	DTT
	1 mM	AEBSF
nach Bedarf	1-10 mM	Natriumpervanadat (Phosphataseinhibitor)
Roeder A- Ergänzungspuffer 5x	450 mM	KCl
	2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50% (v/v)	Glyzerin
Roeder C-Puffer	420 mM	KCl
(für Zellkernextrakte)	10 mM	Hepes/KOH (pH 7,9)
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	DTT
	0,2 mM	EDTA
	5%	Glyzerin
	1 mM	AEBSF
nach Bedarf	1-10 mM	Natriumpervanadat (Phosphataseinhibitor)

### 6.1.7.7 Lösungen für die Immunfluoreszenz (IF)

IF-Stoppuffer	100 mM	Glycin in PBS
IF-Blockpuffer	3% (w/v)	BSA
	0,2% (v/v)	Triton x100 in PBS
IF-Waschpuffer	0,2% (w/v)	BSA
	0,1% (v/v)	Tween-20

**6.1.7.8 Puffer für Luziferase-Reporterassays**

<i>Renilla</i> -Luziferase-Puffer	1,1 M	NaCl
(vor Lichteinfall schützen)	220 mM	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	2,2 mM	EDTA
	0,44 mg/ml	BSA
	1,3 mM	NaN <sub>3</sub>

pH 5,0 mit KOH

Zugabe des in Ethanol gelösten Substrates Coelenterazin zu 14,3 µM unmittelbar vor Anwendung.

<i>Firefly</i> -Luziferase-Puffer	20 mM	Tricin
(vor Lichteinfall schützen)	0,1 mM	EDTA
	5,34 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	530 µM	ATP
	270 µM	Coenzym A

pH 8,0 einstellen, 470 µM D-Luciferin ergänzen

Zugabe von DTT zu 33 mM unmittelbar vor Anwendung.

**6.1.7.9 weitere Puffer**

2fach HEPES	274 mM	NaCl
(Kalziumphosphattransfektion)	54,6 mM	HEPES
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

pH 7,1

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

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 6.2.1.1 Allgemeine Methoden

Nicht näher erläuterte Standardmethoden wie Restriktionsverdau und andere enzymatische *in vitro*-Reaktionen, DNA- und RNA-Gelelektrophorese oder Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989) oder gemäß den jeweiligen Herstellerempfehlungen. Protokolle und Pufferzusammensetzungen sind ebenfalls in den Erzeugeran-gaben zu finden. Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* kamen der „Plasmid Mini-Kit“ (OMEGA bio-tek) und „Nucloebond AX“ (Macherey-Nagel) zum Einsatz. Die Isolation von DNA aus PCR-Ansätzen oder Agarosegelen wurde mit dem Kit „Nucleospin“ (Macherey-Nagel) durchgeführt.

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* XL1blue wurde die  $\text{CaCl}_2$ -/Hitzeschockmethode angewendet (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 6.2.1.2 Klonierungen

Zu klonierende DNA-Sequenzen wurden mittels PCR (engl.: *polymerase chain reaction*) entweder von bereits bestehenden Plasmidkonstrukten oder aus der „Marathon-cDNA“-Bank, die aus humanen, fötalen Gehirnen erstellt wurde (Clontech), amplifiziert. Die dazu verwendeten DNA-Oligonukleotide (Primer) waren so konstruiert, dass sie nicht nur mit der zu amplifizierenden Sequenz hybridisieren konnten, sondern darüber hinaus am 5'- bzw. 3'-Ende auch die Erkennungssequenzen für die gemäß Klonierungsprotokoll nachfolgend einzusetzenden Restriktionsenzyme enthielten. Aus diesem Grund wurde die PCR mit zweierlei *annealing*-Temperaturen durchgeführt: Anfangs fünf Amplifikationszyklen mit niedriger *annealing*-Temperatur (z.B. 56°C), anschließend, da nun komplementäre Sequenzen über die gesamte Länge der DNA-Oligonukleotide vorliegen, bei höheren Temperaturen (z.B. 64°C). Die letzt-

lich gewählten *annealing*-Temperaturen und Syntheszeiten richteten sich nach dem jeweiligen Primerpaar und der zu amplifizierenden DNA-Sequenz.

Die isolierten und gereinigten PCR-Produkte wurden einem Restriktionsverdau unterzogen und schließlich in den jeweiligen, ebenfalls verdauten und dephosphorylierten Vektor ligiert. Nach Selektion positiver Klone wurden selbige via DNA-Sequenzierung verifiziert.

#### 6.2.1.3 In vitro Mutagenese

Das Einbringen von Mutationen in proteinkodierende DNA-Sequenzen erfolgte mittels Mutagenese-DNA-Oligonukleotiden, welche die gewünschten Sequenzveränderungen trugen. Mit dem Mutagenese-Primer und einem entgegengesetzt gerichteten, der am nächstgelegenen Ende der Matrize ansetzte, sowie dem Wildtyp *open-reading-frame* (ORF) als Matrize, wurde in einer ersten PCR ein die Mutation tragendes DNA-Fragment synthetisiert. Dieses wurde aufgereinigt und in der zweiten PCR als Primer eingesetzt. Der Gegenprimer hybridisierte am entgegengesetzten Ende des ORFs, so dass als Produkt ein der Länge nach vollständiger ORF resultierte, jedoch inklusive der gewünschten Mutation. Als Matrize fungierte wiederum die Wildtypsequenz. Die DNA-Oligonukleotide, die an den Enden des ORFs ansetzten, trugen für die anschließende Klonierung der mutierten Sequenzen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme.

#### 6.2.1.4 Proteinase K-Verdau

Für den proteolytischen Abbau von Proteinen wurde eine Lösung aus Proteinase K und Proteinase K-Puffer mit einer Enzymkonzentration von 100 µg/ml hergestellt. Von dieser Proteinase K-Lösung wurde soviel zu der zu behandelnden Probe gegeben, dass das Endvolumen 180-190 µl betrug. Dieser Ansatz wurde für fünf Minuten bei 50°C inkubiert.

#### 6.2.1.5 Isolierung von RNA

Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurde mit dem Reagenz PeqGOLD TriFast (*Peqlab*) gemäß den Herstellerangaben isoliert.

RNA aus Lösungen, z.B. Geleluaten, wurde mit zwei Volumenteilen saurem Phenol, gefolgt von zwei Volumenteilen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und schließlich einem Volumenteil Chloroform schrittweise extrahiert (Phenol-Chloroform-Extraktion) und daraufhin mit Ethanol präzipitiert. Bei Bedarf ist hierzu die Salzkonzentration mit Natriumazetat 3M pH 5,2 auf 300 mM eingestellt worden.

Bei der Isolierung von RNA aus immunpräzipitierten RNA-Protein-Komplexen war der erste Schritt ein Proteinase K-Verdau. Im Anschluss wurden eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation durchgeführt.

#### 6.2.1.6 Gelreinigung von RNA

Die aufzureinigende RNA oder der Reaktionsansatz wurden mit einem Volumenteil denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und auf ein denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel geladen. Die RNA-Visualisierung erfolgte wenn möglich autoradiographisch, andernfalls durch *UV-shadowing*. Das Gelstück mit der RNA wurde ausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß mit 400 µl RNA-Gelelutionspuffer bei Raumtemperatur über Nacht eluiert. Anschließend wurde die RNA präzipitiert und in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 6.2.1.7 Radioaktive 5'-Endmarkierung chemisch synthetisierter Nukleinsäuren

Die radioaktive 5'-Endmarkierung erfolgte durch den Übertrag der  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-Phosphorylgruppe von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP auf das 5'-Hydroxylende der chemisch synthetisierte RNA oder DNA katalysiert durch das Enzym Polynukleotidkinase (PNK).

## Reaktionsansatz:

20-80 pmol RNA oder DNA  
2  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (3000 Ci/mmol)  
2  $\mu\text{l}$  10x T4-PNK-Reaktionspuffer  
1  $\mu\text{l}$  PNK (10 U/ $\mu\text{l}$ )  
ad 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Fall einer RNA-Markierung wurde anschließend denaturierender Probenpuffer zugesetzt und die RNA über ein Harnstoff-Polyacrylamidgel gereinigt. Die Visualisierung erfolgte autoradiographisch. Bei DNA-Oligonukleotiden erfolgte die Aufreinigung mittels Gelfiltration: Die PNK-Reaktion wurde mit 30  $\mu\text{l}$  EDTA 300 mM abgestoppt und auf eine nach Herstellerangaben vorbereitete MicroSpin<sup>TM</sup> G-25-Säule (*GE Healthcare*) aufgetragen. Die weitere Handhabung erfolgte gemäß den Erzeugerempfehlungen.

#### 6.2.1.8 3'-Endmarkierung einzelsträngiger siRNAs

Die 3'-Endmarkierung einzelsträngiger (engl.: *single stranded*, abgekürzt ss) RNA erfolgte durch T4-RNA-Ligase und [ $^{32}\text{P}$ ]-pCp.

Der Reaktionsansatz ist bei Raumtemperatur zu pipettieren, um die Präzipitation des DMSO in der Kälte zu vermeiden.

## Reaktionsansatz:

750 pmol ss-siRNA  
3  $\mu\text{l}$  10x Reaktionspuffer  
3  $\mu\text{l}$  DMSO  
1,5  $\mu\text{l}$  T4-RNA-Ligase (20 U/ $\mu\text{l}$ , NEB)  
21  $\mu\text{l}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-pCp (3000 Ci/mmol)  
ad 30  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde die markierte RNA über ein denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel gereinigt.

### 6.2.1.9 Hybridisieren einzelsträngiger siRNAs

Gleiche Stoffmengen der zu hybridisierenden Einzelstränge wurden vereint und das gewünschte Endvolumen mit H<sub>2</sub>O eingestellt. Der Ansatz wurde für eine Minute bei 92°C inkubiert, um die ss-siRNA zu denaturieren. Beim anschließenden Abkühlen auf Raumtemperatur bei 550 rpm im Thermoschüttler hybridisierten die komplementären Einzelstränge miteinander.

Zur Qualitätskontrolle wurde eine native Agarosegelelektrophorese (4%iges Gel) durchgeführt. Die Visualisierung durch Ethidiumbromidfärbung erfordert 300-400 pmol einzelsträngige und 10-40 pmol doppelsträngige RNA. Letztere migriert langsamer im Gel als die einzelsträngige und erlaubt so die Beurteilung des Hybridisierungsergebnisses.

### 6.2.1.10 In vitro Transkription

Aufgereinigte PCR-Produkte mit SP6- und T7-RNA-Promotorsequenz dienen als Matrize für die enzymatische *in vitro* Synthese von RNA. Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind bereits beschrieben (Martinez *et al.*, 2002; Meister *et al.*, 2004 (b)).

Reaktionsansatz:

- 20 µl 5x Ribonukleotidmix (ATP, CTP, UTP je 5 mM; 8mM GTP)
- 20 µl 5x Transkriptionspuffer
- 1 µl DTT 1M
- 1,25 µl U RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- 1 µg PCR-Produkt als Matrize
- 1,5 µl T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)
- ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte für zwei Stunden bei 37°C. Daraufhin wurde der Ansatz mit einem Volumenteil RNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 8%-iges Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die RNA wurde mittels *UV-shadowing* sichtbar gemacht und anschließend eluiert. Die Resuspension erfolgte in 20 µl H<sub>2</sub>O.

### 6.2.1.11 Endogene radioaktive Markierung von RNA

Die endogene Markierung von RNA mit radioaktiven Nukleotiden erfolgte bei der enzymatischen *in vitro* Synthese (Transkription). Die Matrizen-DNA wurde durch Hybridisierung zweier DNA-Oligonukleotide erhalten, von denen einer die Sequenz des T7-Promotors trägt.

Reaktionsansatz:

- 8 µl 5x Ribonukleotidmix (ATP,CTP à 5 mM; 8 mM GTP; 0,1 mM UTP)
- 8 µl 5x Transkriptionspuffer
- 0,5 µl DTT 1M
- 1,25 µl U RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- 100 pmol Matrizen-DNA
- 1 µl T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)
- 5 µl  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-UTP (3000 Ci/mmol)
- ad 40 µl H<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Daraufhin wurde der Ansatz mit einem Volumenanteil RNA-Probenpuffer versetzt und mittels Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (Harnstoff-PAGE) gereinigt. Die RNA wurde autoradiographisch im Gel lokalisiert und schließlich eluiert. Die Resuspension erfolgte in 20 µl H<sub>2</sub>O.

### 6.2.1.12 Radioaktive 5'-Cap-Markierung von RNA

Durch den Übertrag eines [<sup>32</sup>P]-GMP-Restes auf das 5'-Ende einer enzymatisch, *in vitro* synthetisierten RNA – d.h. mit drei Phosphatresten am 5'-Ende - wird letztere in einer Guanylyltransferase-Reaktion radioaktiv markiert und zugleich mit einer *Cap*-Struktur versehen.

Reaktionsansatz:

- 2 µl 10x GT-Puffer
- 1 µl S-Adenosylmethionin 500 mM
- 1 µl DTT 100 mM
- 0,25 µl U RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- 20 pmol RNA (≥ eine im *UV-shadowing* klar erkennbare Bande)
- 2 µl Guanylyltransferase
- 2 µl  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-GTP (3000 Ci/mmol)
- ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde für vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem Volumenanteil denaturierendem RNA-Ladepuffer versetzt. Die RNA wurde mittels Harnstoff-PAGE gereinigt, autoradiographisch visualisiert und letztlich in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 6.2.1.13 In vitro Phosphorylierung von Proteinen

Die zu phosphorylierenden Proteine wurden immunopräzipitiert und mit TBS statt PBS gewaschen. Für die Serin- und Threoninphosphorylierung *in vitro* wurde Casein Kinase II (CK II) verwendet. Dieses Enzym phosphoryliert vor allem Serin- und zu einem geringeren Teil Threoninreste. Als Erkennungssequenz fungieren saure Aminosäureseitenketten an den Positionen -2 bis +5 bezogen auf den zu modifizierenden Rest. Als Hauptmotiv wird **SXXD/E** angesehen.

Reaktionsansatz:

15 µl Immunopräzipitat (in TBS)  
2,5 µl 10x CK II-Reaktionspuffer  
0,25 µl Phosphataseinhibitor 0,1 M  
0,1 µl ATP 100 mM  
0,5 µl  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol)  
0,2 µl CK II (500 U/µl)  
ad 25 µl H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Immunopräzipitate erneut gewaschen und ihrem weiteren Verwendungszweck zugeführt. Für nicht radioaktive Arbeiten wurde  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP durch 100 mM ATP ersetzt.

#### 6.2.1.14 In vitro Dephosphorylierung von Proteinen

Für die Dephosphorylierung von Immunopräzipitaten *in vitro* wurde alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (engl. *calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) verwendet. Dieses Enzym entfernt Phosphorylgruppen von Serin-, Threonin und Tyrosinseitenketten.

Reaktionsansatz:

15  $\mu$ l Immunopräzipitat  
2  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer  
1  $\mu$ l CIAP (10 U/ $\mu$ l)  
ad 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Immunopräzipitate erneut gewaschen und ihrem weiteren Verwendungszweck zugeführt.

## 6.2.2 Zellkulturmethoden

### 6.2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Säugerzelllinien wurden in Vollmedium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit in beschichteten Zellkulturschalen herangezogen. Beim Erreichen von 90-100% Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen auf der Platte einmal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin von der Kulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden zum Vereinzeln sorgfältig resuspendiert und je nach Verwendungsabsicht auf 4-10 Platten ausgesät. Das Splitten und damit die Versorgung der Zellen mit frischem Medium erfolgte alle 2-3 Tage.

### 6.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen von Zellen wurde zügig und mit Eis gearbeitet, um die toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen gering zu halten.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst und in einem Reaktionsgefäß mit Vollmedium gesammelt. Durch Zentrifugation bei 1200 rpm für zwei Minuten wurden die Zellen schonend pelletiert, schließlich in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen, zu 0,5-1 ml in Kryoröhrchen abgefüllt und unmittelbar auf Eis zur Lagerung bei -80°C gebracht.

Zum Auftauen wurde 37°C warmes Vollmedium auf die gefrorenen Zellen gegeben und diese durch Resuspendieren in Lösung gebracht. Sobald ein Teil aufgetaut war, wurde dieser in ein großes Volumen vorgewärmten Vollmediums gebracht, so dass die DMSO-Konzentration rasch verringert wurde.

#### 6.2.2.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA nach der Kalziumphosphatmethode

Die Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen nach der Kalziumphosphatmethode erfolgte frühestens drei Stunden nach Aussaat der Zellen.

Transfektionsansatz für eine zu 30% konfluente Zellkulturplatte mit 15 cm Durchmesser und einem Medienvolumen von 20 ml:

1,075 ml H<sub>2</sub>O

152,5 µl CaCl<sub>2</sub> 2 M

x µl Plasmid-DNA:	8 µg	VP5-Konstrukt oder
	12-15 µg	pCS2-Konstrukt oder
	1-2 µg	GFP-kodierende Konstrukte.

Diese drei Komponenten wurden vermischt und 1,25 ml 2x HEPES tropfenweise unter Schütteln zugesetzt. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Mix tropfenweise auf die Zellen gegeben. Diese wurden ohne Mediumwechsel 48 Stunden weiter kultiviert und schließlich lysiert. Sollten jedoch zytoplasmatische Extrakte aus den transfizierten Zellen hergestellt werden, wurde das Medium mit dem Transfektionsmix 24 Stunden vor der Ernte gegen frisches Vollmedium ausgetauscht, um das Trypsinisieren zu erleichtern.

Mit der HEPES-Zugabe werden pH-Bedingungen geschaffen, unter denen es zur Bildung eines schwerlöslichen Komplexes aus Kalziumionen und der DNA (Phosphatrückrat) kommt, was an der Eintrübung des Transfektionsmixes erkennbar ist. Während der 10minütigen Inkubationszeit bilden sich die Kalziumphosphatkomplexe, deren Größe eine effiziente Auf-

nahme in die Zellen gestattet. Die Aufnahmeeffizienz sinkt mit zunehmender Größe der Komplexe, ergo mit der Inkubationsdauer.

Für die Transfektion von Zellen in einem Zellkulturgefäß mit anderen Abmessungen ist der Transfektionsmix entsprechend dem Volumen- und nicht dem Flächenfaktor anzupassen, da der pH-Wert eine entscheidende Rolle spielt.

#### 6.2.2.4 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit kommerziellen Transfektionsreagenzien

Die Transfektion von Plasmid-DNA in HEK 293, HeLa oder MEF Ago2<sup>-/-</sup> Zellen mit Lipofectamin 2000 (*Invitrogen*) erfolgte frühestens drei Stunden nach Aussaat der Zellen, meist jedoch 10-12 Stunden später. Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf eine Kavität einer 48er-Zellkulturplatte mit einem Kulturvolumen von 200 µl Vollmedium und einer Konfluenz von 20-50%, je nach experimentellem Ablauf und den zu transfizierenden Zellen.

Transfektionsmix:

25 µl Opti-MEM wurden vorsichtig aber sorgfältig mit 0,2 µl Lipofectamin 2000 vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden 25 µl Opti-MEM mit 100 ng bei HEK 293 Zellen bzw. 600 ng Plasmid-DNA bei HeLa und MEF Ago2<sup>-/-</sup> Zellen vermischt. Schließlich wurden beide Lösungen vereint und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die 50 µl Transfektionsmix auf die Zellen getropft wurden.

Bei der Transfektion von proteinkodierenden Plasmiden wurden die Zellen für mindestens 48 Stunden ohne Mediumwechsel weiterkultiviert, bei Luziferase-Reporterplasmiden genügten 24 Stunden.

#### 6.2.2.5 Transiente Transfektion von siRNAs in Säugerzellen

Die Transfektion von doppelsträngigen siRNAs in HEK 293 oder HeLa Zellen erfolgte im 6er Zellkulturplattenformat zeitgleich mit der Aussaat der Zellen (reverse Transfektion).

HEK 293 Zellen wurden zu 30% Konfluenz ausgesät, HeLa Zellen zu 40-50%.

Transfektionsansatz:

1 ml Opti-MEM wurde mit der siRNA (Endkonzentration 65  $\mu\text{M}$ ) in der Kavität der Zellkulturplatte vermischt, 1  $\mu\text{l}$  Lipofectamin RNAiMAX (*Invitrogen*) zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die trypsinierten und in Vollmedium aufgenommenen Zellen zugegeben. Das Gesamtvolumen beträgt 2,5 ml je Kavität.

Bis zur Lyse wurden die Zellen weitere 96 Stunden kultiviert und bei Bedarf gesplittet.

#### 6.2.2.6 Radioaktive Markierung von Phosphoproteinen in HEK 293 Zellen

Durch die Zugabe von radioaktivem ortho-Phosphat zu lebenden Zellen wurde untersucht, ob die Proteine von Interesse *in vivo* phosphoryliert werden. Zu diesem Zweck wurden unbehandelte oder transfizierte HEK 293 Zellen auf Zellkulturplatten mit 10 cm Durchmesser bis zu 80% Konfluenz in Markierungsmedium kultiviert. Auf phosphatfreies Medium konnte nicht zurückgegriffen werden. Die Zellen wurden zweimal mit TBS gewaschen und schließlich für vier Stunden in 4 ml Markierungsmedium mit 0,5 mCi/ml [ $^{32}\text{P}$ ]-ortho-Phosphat weiterkultiviert und schließlich mit Phosphataseinhibitor behandelt. Totallysate wurden hergestellt und die Proteine von Interesse bei Raumtemperatur für zwei Stunden immunopräzipitiert. Die in Probenpuffer aufgenommenen Immunopräzipitate wurden via 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine Coomassie gefärbt und das Gel auf *Whatman*-Filterpapier über Nacht unter Vakuum bei 45°C auf einem Geltrocknungstisch getrocknet. In mindestens 3 cm Abstand zum Gel wurden vereinzelte, schwachradioaktive und mit Probenpuffer angefärbte Markierungen getupft. Diese erlaubten es, das Autoradiogramm bei der Auswertung exakt am getrockneten Gel auszurichten, so dass der Größenstandard auf den Film übertragen werden konnte.

#### 6.2.2.7 Behandlung von Säugerzellen mit Phosphataseinhibitor (PPI)

Um speziell auch Phosphotyrosinreste während der Zellyse zu konservieren, wurden zelluläre Phosphatasen mit Pervanadat inhibiert. Zur Darstellung einer 0,2 M Natriumvanadat-Stammlösung wurde die entsprechende Menge Salz in 3/4 des Endvolumens in Wasser gelöst, in der Mikrowelle kurz aufgekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure von ca. 13 auf pH 11 eingestellt. Dabei verfärbte sich die Lösung intensiv gelb-orange. Sie wurde nun erneut bis zur Farblosigkeit aufgekocht und abgekühlt. Schließlich wurde der finale pH 10 und das Endvolumen eingestellt. Die Stammlösung wurde für maximal 6 Wochen bei -20°C aufbewahrt.

Für die Inhibierung von Phosphatasen wurde 1 ml Natriumvanadat-Lösung 0,1 M mit 34 µl Wasserstoffperoxid (30%ig) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es kommt dabei zu einer Gelbfärbung. Die gebrauchsfertige Lösung (Pervanadat) wurde bei einer Endkonzentration von mindestens 1 mM und höchstens 10 mM direkt in das Zellkulturmedium gegeben. Lokal auftretende Konzentrationspitzen sind zu minimieren, zum Beispiel durch leichtes Schwenken während der Zugabe. Die Zellen wurden für weitere 10 Minuten kultiviert und dann lysiert. Die gebrauchsfertige PPI-Lösung wurde allen Puffern zugesetzt, mit denen die noch unlysierten Zellen bei der Ernte längere Zeit in Berührung kamen, und ebenso dem Lysispuffer.

### 6.2.3 Biochemische Methoden

#### **Lysat- und Extraktpräparationen**

Wenn nicht anders angegeben erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis. Die verwendeten Lösungen waren vorgekühlt. DTT und der Proteaseinhibitor AEBSF wurde erst unmittelbar vor Verwendung des Puffers zugesetzt.

### 6.2.3.1 Totallysate von Säugerzellen

Das Medium einer zu 100% konfluenten 15 cm-Zellkulturschale wurde abgesaugt, die Zellen auf der Platte mit PBS gewaschen und 450 µl Lysepuffer darüber verteilt. Die Zellen wurden von der Platte heruntergeschabt und in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Dabei wurde mehrfach langsam auf- und abpipettiert. Nach fünf Minuten Inkubation wurden Zelltrümmer vom Lysat in zehn Minuten bei 17000 g in einer gekühlten Tischzentrifuge abgetrennt. Der klare Überstand stellte das Lysat dar und wurde entweder direkt verwendet oder in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Es ergaben sich ca. 800 µl Totallysat.

### 6.2.3.2 Zytoplasmatische Extrakte

Die Präparation zytoplasmatischer Extrakte geht auf das Protokoll von Dignam *et al.*, 1983 zurück. Die Zellen wurden mittels Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst, bei 1200 rpm für zwei Minuten pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und schließlich im Fünffachen ihres Eigenvolumens in Roeder A-Puffer resuspendiert. Nach zehn Minuten Inkubation auf Eis zum Quellen wurden die Zellen pelletiert, in zwei Volumenteilen Roeder A-Puffer aufgenommen und in einen Glashomogenisator überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch zehn Pistillstöße. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm für zehn Minuten von der Zytoplasmafraktion abgetrennt. Der zytoplasmatische Extrakt wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 6.2.3.3 Nukleäre Extrakte

Das aus der Zytoplasmaextrakt-Präparation verbliebene Kernpellet wurde einmal mit PBS gewaschen, in Roeder C-Puffer resuspendiert und in einen Glashomogenisator überführt. Der Aufschluss erfolgte mit 15 Pistillstößen. Die Suspension wurde bei 13300 rpm für 30 Minuten zentrifugiert und der Kernextrakt als klarer Überstand abgenommen. Er wurde in dieser Form direkt experimentell eingesetzt oder schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## Gelsysteme

### 6.2.3.4 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (denaturierende Harnstoff-PAGE)

Die denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel wurden mit dem Kitsystem „Ultra Pure SequaGel“ (*national diagnostics*) gegossen. Die Auftrennung der RNA erfolgte während der Elektrophorese bedingt durch ihre negative Ladung, die sich weitgehend proportional zur Molekülgröße verhält. Für kleine RNAs bis zu 30 nt Länge wurden Gele mit 12-15% Acrylamid, für größere RNAs mit bis zu 200 nt Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 8% verwendet. Die auspolymerisierten Gele konnten bei Bedarf gekühlt und feucht für 24 Stunden gelagert werden. Neben Harnstoff wurde auch Hitze als Denaturierungsmittel eingesetzt, weshalb die Gele einem ca. 30minütigen Vorlauf unterzogen wurden, bis sie warm waren, und die Proben vor dem Laden zwei Minuten bei 95°C erhitzt wurden. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die Elektrophoresebedingungen waren wie folgt: 17 cm x 23 cm-Gele mit 350-500V und 30 cm x 39 cm mit 55-65 W bis zum gewünschten Auftrennungsgrad.

### 6.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Molekülmasse wurden im Rahmen dieser Arbeit 8-10%ige Polyacrylamidtrenn- und 4%ige Polyacrylamidsammelgele gegossen. Die Elektrophorese der 17 cm x 12 cm-Gele erfolgte in 1x SDS-Gellaufpuffer bei 35-55 mA.

## Proteinfärbetechniken

### 6.2.3.6 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde das Trenngel in Coomassie-Färbelösung gelegt und eine Stunde unter leichter Bewegung inkubiert. Bei Bedarf konnte die Färbung durch kurzzeitiges Erhitzen in der Mikrowelle beschleunigt werden. Zum Entfärben des nicht-proteinogenen Hintergrundes wurde die Färbelösung über Aktivkohle abgekippt, das Gel mehrfach mit destilliertem Wasser durchgespült und schließ-

lich mit saugstarkem Papier in Coomassie-Entfärberlösung inkubiert. Auch hier wurde der Vorgang gegebenenfalls durch kurzzeitiges Erhitzen beschleunigt. Der Entfärber wurde bis zum Erreichen des gewünschten Entfärbungsgrades mehrfach erneuert.

#### 6.2.3.7 Silberfärbung (für die Massenspektrometrie geeignet)

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Trenngel für zweimal 30 Minuten in Fixierer leicht schwenkend inkubiert und anschließend dreimal für je 20 Minuten in 50% (v/v) Ethanol. Nach diesem Fixierungsschritt wurde die Färbung eingeleitet: Das Gel wurde für eine Minute in Natriumthiosulfatlösung gelegt und anschließend zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgten 20 Minuten in Silberlösung, ein einmaliges Spülen mit Wasser und schließlich die Inkubation in der Färbelösung. Sobald der gewünschte Färbungsgrad erreicht war, wurde das Gel kurz mit Wasser gewaschen und in 12% (v/v) Essigsäure gelegt, wodurch die Färbereaktion gestoppt wurde. Für die längerfristige Verwahrung wurde 1% (v/v) Essigsäure verwendet.

### 6.2.4 Immunologische und Immunbiochemische Methoden

#### 6.2.4.1 Analyse via Western-Blot

Für die Western-Blotanalyse wurden die Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE mit einer *semi-dry*-Blotapparatur aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurden entsprechend der Größe des Gels jeweils drei Lagen *Whatman*-Filterpapier ober- und unterhalb von Gel und Membran positioniert, wobei jede Schicht mit Western-Blot-Transferpuffer getränkt worden war. Der Proteintransfer erfolgte für drei Stunden bei 13 V oder 3 mA/cm<sup>2</sup>. Anschließend wurde die Membran zum Absättigen von Proteinbindungsstellen in Western-Blot-Waschpuffer mit 5% (w/v) Milchpulver für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert („*blocking*“). Anschließend wurde sie mit Western-Blot-Waschpuffer gewaschen und mit dem Primärantikörper für mindestens eine Stunde inkubiert. Daraufhin erfolgte erneutes Waschen und schließlich die Behandlung mit

dem Sekundärantikörper für eine weitere Stunde. Nach einem letztmaligen Waschen der Membran wurden die Proteine detektiert: Die Sekundärantikörper waren mit dem Enzym Peroxidase konjugiert, deren Aktivität nach fünfminütiger Inkubation in der Detektionslösung Chemilumineszenz freisetzt, was zur Schwärzung des aufgelegten Filmes führte.

Hybridoma-Kulturüberstände wurden 1:10, der gereinigte  $\alpha$ -hAgo2-Antikörper 1:5000 und kommerzielle Primärantikörper gemäß den Herstellerempfehlungen oder doppelt so hoch in Western-Blot-Waschpuffer verdünnt eingesetzt. Sekundärantikörper wurden in 1:5000-8000facher Verdünnung verwendet.

#### 6.2.4.2 „Stripping“ von Western-Blots

Unter „Stripping“ versteht man das Entfernen der von einer vorangegangenen Analyse verbliebenen, gebundenen Antikörper von der Western-Blotmembran. Die Membran wurde in Western-Blot-Stripping-Lösung mit frisch zugesetztem  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert, währenddessen zweimal auf dem 95°C Heizblock erwärmt und schließlich in Western-Blot-Waschpuffer äquilibriert bis der Mercaptoethanolgeruch nicht mehr wahrzunehmen war.

#### 6.2.4.3 Kopplung monoklonaler Antikörper an Protein G-Sepharose

Für die Kopplung monoklonaler Antikörper wurde Protein G-Sepharose (*GE Healthcare*) als Matrix verwendet. Es wurden 25-100  $\mu$ l Matrix dreimal mit kaltem PBS gewaschen und schließlich mit 1,5 ml Hybridoma-Kulturüberstand für wenigstens zwei und höchstens zwölf Stunden unter Rotation bei 4°C zum Koppeln der Antikörper inkubiert. Der Hybridomaüberstand wurde anschließend gesammelt und für eine weitere Antikörperkopplung bei 4°C verwahrt. Die nun mit Antikörpern bestückte Protein G-Sepharose wurde erneut dreimal mit kaltem PBS gewaschen und im Experiment eingesetzt oder mit wenig PBS bei 4°C aufbewahrt. Ansätze mit Protein G-Sepharose wurde stets bei 500 g für eine Minute zentrifugiert.

#### 6.2.4.4 Immunopräzipitation (IP)

Für Immunopräzipitationen (IPs) wurden entweder selbst erstellte Antikörpermatrizes (Abschnitt 6.2.4.3) oder kommerzielle, wie anti-c-myc-Agarose oder ANTI-FLAG™ M2-Agarose aus Maus (beides *Sigma*), verwendet. Zum Pelletieren wurden die kommerziellen Matrizes kurz auf 17000 g zentrifugiert, die selbst erstellten Protein G-Sepharosematrizes dagegen für eine Minute bei 500 g.

Zur IP wurde die in PBS äquilibrierte Matrix mit Zellextrakt oder -lysat inkubiert, wobei je nach Abundanz des zu präzipitierenden Proteins maximal 50 µl Matrix mit mindestens 800 µl Lysat vereint wurden, was einer zu 100% konfluenten 15 cm-Zellkulturschale entsprach. Der IP-Ansatz wurde mit PBS auf das Maximalvolumen aufgefüllt, um die Kontaktfläche von Proteinlösung zu Luft zu minimieren, und für mindestens 90 Minuten rotierend bei 4°C inkubiert. Im Anschluß wurde der Überstand gesammelt und nach Entnahme von Proben für eine SDS-PAGE bei -80°C aufbewahrt. Die Matrix wurde zweimal mit IP-Waschpuffer gewaschen, einmal mit PBS und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je nach Verwendungszweck wurde das Immunopräzipitat in Protein-Probenpuffer aufgenommen oder in einem Assay eingesetzt.

#### 6.2.4.5 Immunopräzipitation von Phosphoproteinen

Monoklonaler  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ -pY-Antikörper) wurde im Verhältnis 1,5 µg Antikörper je µl Matrix über Nacht bei 4°C und leichter Rotation an Protein G-Sepharose gekoppelt. Die Matrix wurde daraufhin mit PBS inkl. 0,1% Triton X 100, einmal mit PBS und noch mal mit PBS inkl. 0,1% Triton X 100 gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden 20 µl Matrix mit 300 µl BSA (10 µg/µl) und 1,2 ml PBS für 90 Minuten in der Kälte inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und schließlich zur Immunopräzipitation von Proteinen mit phosphorylierten Tyrosinseitenketten mit 1,5 ml zytoplasmatischen Extraktes versetzt. Dieser Extrakt ist zuvor bereits einmal für die Immunopräzipitation verwendet, danach schockgefroren und bei -80°C gelagert worden. Zur Konservierung der

Phosphotyrosinreste wurden die Zellen vor der Ernte mit 10 mM Natriumpervanadat behandelt (Abschnitt 6.2.2.7). Nach 4,5 Stunden Immunopräzipitation wurde das Präzipitat erst mit IP-Waschpuffer verschiedener Natriumchloridkonzentrationen gewaschen - dreimal mit 1,2 M und zweimal mit 0,6 M - und schließlich mit PBS inkl. 0,1% Triton X 100 und PBS. Für die Analyse wurden zwei Volumenteile Proteinprobenpuffer zugesetzt, der die doppelte SDS-Menge enthielt, und die Probe zweimal für nicht mehr als 2 Minuten bei 95°C inkubiert.

#### 6.2.4.6 Saure Elution von immunopräzipitierten Proteinen

Auf 25 µl Immunopräzipitat in minimalem Puffervolumen wurden für einige Minuten 100 µl Glycin 0,1 M pH 2,3 gegeben und das Eluat anschließend in einem Reaktionsgefäß mit vorgelegten 7,5 µl Tris/HCl 1,5 M pH 8,8 aufgefangen. Dadurch hatte das Eluat letztlich einen neutralen pH.

#### 6.2.4.7 Isolierung des *RNA-induced silencing complexes* (RISC) durch $\alpha$ -hAgo2-IP und Elution mit Ago2-Peptid

RISC wurde mit an Protein G-Sepharose gekoppeltem  $\alpha$ -hAgo2-Antikörper immunopräzipitiert und stringent gewaschen: zweimal mit IP-Waschpuffer mit 500 mM NaCl, danach 40 Minuten unter Rotation mit 0,5 ml IP-Waschpuffer 500 mM NaCl und 1 ml Standard IP-Waschpuffer (367 mM NaCl Endkonzentration) und abschließend nochmals mit IP-Waschpuffer 500 mM. Für die peptidinduzierte RISC-Elution wurde das Immunopräzipitat in PBS äquilibriert und anschließend 25 µl mit 100 µl Ago2-Peptid (1 µg/µl) für 90 Minuten bei 25°C und 550 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Eine Polyrep-Säule (*Biorad*) wurde mit dem Ago2-Peptidpuffer äquilibriert, der Elutionsansatz hineingegeben und das Eluat auf Eis aufgefangen.

#### 6.2.4.8 Immunofluoreszenz-Mikroskopie

Für die Immunofluoreszenz-Mikroskopie (IF) wurden Säugerzellen auf sterilen Deckgläschen in Zellkulturplatten mit sechs Kavitäten bis zu einer Konfluenz von 60-70% herangezogen. Transfektionen erfolgten zwei Tage vorab nach der Kalziumphosphatmethode und ohne Medienwechsel. Sämtliche für die IF-Probenpräparation verwendeten Lösungen wurden filtriert und die Antikörper bei 17000 g für zwei Minuten zentrifugiert. Dadurch wurden Präzipitate entfernt und somit der Hintergrund bei den IF-Proben reduziert.

Die IF-Proben wurden für die Mikroskopie wie folgt präpariert: Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, durch 1-2 ml eiskaltes PBS mit 3,7% (v/v) Formaldehyd je Kavität ersetzt und die Zellkulturplatte für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Darauf folgte eine fünfminütige Inkubation in 1-2 ml IF-Stopplösung bei 4°C. Schließlich wurden die Zellen durch Permeabilisierung und „*blocking*“ (Abschnitt 6.2.4.1) für die Antikörperbehandlung vorbereitet, wozu sie zehn Minuten bei 4°C in IF-Blockpuffer inkubiert wurden. Für die Antikörperbehandlung wurden die Deckgläschen mit den behandelten Zellen auf Parafilm gelegt und zweimal mit IF-Waschpuffer gewaschen, bevor der Primärantikörper oder die Primärantikörperkombination für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen wurde. Die Antikörper wurden in IF-Waschpuffer verdünnt eingesetzt: Hybridoma-Kulturüberstände 1:10-50,  $\alpha$ -LSm4 1:400 und  $\alpha$ -HA 1:300. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit IF-Waschpuffer gewaschen und der Sekundärantikörper oder die Sekundärantikörperkombination als 1:300- bis 1:400-Verdünnung zugesetzt. Nach 45 Minuten Inkubation in Dunkelheit wurde erneut fünfmal gewaschen, wobei dem IF-Waschpuffer im ersten Schritt 1  $\mu$ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) zum Anfärben der DNA beigelegt worden war. Schließlich wurden die Deckgläschen mit den präparierten Zellen eingebettet in VECTASHIELD Hard Set-Einbettungsmedium und mit Nagellack versiegelt. Die Proben wurden bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Die Analyse erfolgte an einem Leica TCS SP2 konfokalem *Laser Scanning* Mikroskop. Die Datenverarbeitung und -analyse wurde mit der *Leica Confocal Software* vorgenommen.

#### 6.2.4.9 Quantifizierung der *P-body*-Lokalisierung von Ago-Proteinen

Für die quantitative Analyse der Lokalisierung der Ago2-Y529-Mutanten in *P-bodies* (PBs) wurden von jeder Probe 12 z-Sektionenbilder aufgenommen und mit Hilfe der *Leica Confocal Software* zur maximalen Projektion vereinigt. Punktförmige Strukturen, in denen sich LSM4-Proteine nachweisen ließen, wurden als PBs deklariert. Für jede Ago2-Mutante wurden von unterschiedlichen IF-Probenpräparationen 100 PBs hinsichtlich Co-Lokalisierung von Mutante und LSM4 analysiert. Die Anzahl der PBs, die für beide Proteine positiv waren, wurde ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtanzahl der pro Zelle registrierten PBs. Mit dem Computerprogramm Excel (für Mac, Version 11.5) wurden die Werte je Mutante gemittelt und die dazugehörige Standardabweichung bestimmt. Das Ergebnis wurde im Balkendiagramm dargestellt.

### 6.2.5 Experimente zur Funktionsanalyse von Argonaute-Proteinen

#### 6.2.5.1 Massenspektrometrie

Die in Probenpuffer aufgenommenen Immunopräzipitate wurden mittels eindimensionaler SDS-PAGE aufgetrennt und einer für die Massenspektrometrie geeigneten Silberfärbung unterzogen. Für die Herstellung des Proteingeles waren sterilfiltrierte Lösungen verwendet worden. Das gefärbte Gel wurde zur Durchführung der massenspektrometrischen Analyse an die Abteilung Oesterhelt (MPI für Biochemie, Martinsried) abgegeben. Die gewünschten Banden und ein Gelstück zum Hintergrundabgleich wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die Peptide an einem MALDI (Reflex III)-Gerät analysiert. Die ermittelten Peptidmassen wurden mit SwissProt, Taxonomie „Human“ ausgewertet.

#### 6.2.5.2 Dichtegradientenzentrifugation

Saccharose wurde zu 15% und 55% (w/v) in 1x Gradientenpuffer in der Kälte gelöst. Das Zentrifugenröhrchen wurde zuerst mit der niederprozentigen Lösung befüllt und diese anschließend mit der höherprozentigen unterschichtet. Mit Hilfe eines Gradientenmischers

wurde nach Herstellerangaben ein stufenloser Gradient von 15-55% erstellt. Dieser wurde kühl gelagert bis die Probenpräparation abgeschlossen war. 750 µl Totallysat wurden schließlich aufgetragen und das Probenröhrchen in einem SWI-41 Ausschwingrotor bei 4°C und 30000 rpm für 18 Stunden zentrifugiert. Es wurden Fraktionen von 500 µl abgenommen und je 20 µl für die Western-Blotanalyse mit Proteinprobenpuffer versetzt.

#### 6.2.5.3 Northern-Blotanalyse

Von Immunopräzipitaten wurde die RNA wie unter 6.2.1.5 beschrieben isoliert, präzipitiert und in denaturierendem RNA-Probenpuffer aufgenommen. Für die denaturierende Harnstoff-PAGE wurde ein 15%iges Gel und 1x TBE als Laufpuffer verwendet und 30 µg Gesamt-RNA bzw. das Äquivalent einer zu 100% konfluenten 15 cm-Zellkulturplatte bei IP-Proben geladen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die Nukleinsäuren anschließend im *semi-dry*-Blotverfahren bei 20 V für 30 Minuten auf eine Hybond-N<sup>+</sup>-Membran (*GE Healthcare*) transferiert. Der Blotaufbau entspricht demselben wie bei der Western-Blotanalyse, nur dass die einzelnen Lagen mit monodestilliertem Wasser getränkt waren. Zur Kontrolle des Transfers wurde das Gel danach erneut mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Membran dagegen wurde auf ein *Whatman*-Filterpapier gelegt, das mit frisch angesetzter EDC-Lösung getränkt war, in Klarsichtfolie eingeschlagen und zur kovalenten Bindung der 5'-Enden der Nukleinsäuren an die Membran (*crosslink*) bei 50°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit monodestilliertem Wasser gewaschen, trocken gefönt, mit Bleistift beschriftet und schließlich für eine Stunde bei 50°C in Hybridisierungslösung äquilibriert. Daraufhin wurde die radioaktive DNA-Sonde (Abschnitt 6.2.1.7) zugegeben und die Inkubation für mindestens eine Stunde oder über Nacht fortgesetzt. Schließlich wurde die behandelte Membran zweimal für je zehn Minuten in Northern-Blot-Waschlösung I und einmal zehn Minuten in Northern-Blot-Waschlösung II gewaschen und zur Aufnahme des Autoradiogramms mit Verstärker-Screen und Film inkubiert.

#### 6.2.5.4 „Stripping“ von Northern-Blotmembranen

Destilliertes Wasser wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, SDS zu einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) zugegeben und die Northern-Blotmembran darin unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Sobald die Lösung abgekühlt war, wurde sie abgekippt und die Membran zweimal kurz mit neuer heißer SDS-Lösung durchgespült. Zur Überprüfung, ob die vorab assoziierte DNA-Sonde vollständig entfernt worden ist, wurde ein Autoradiogramm aufgenommen. Vor der Inkubation mit einer neuen Sonde wurde die Membran in Hybridisierungslösung äquilibriert.

#### 6.2.5.5 In vitro Dicer-Assay

Die Endonuclease Dicer katalysiert die Prozessierung von miRNA-Vorläufermolekülen (pre-miRNAs) zu reifen miRNAs, die dann in Argonaute-Proteine eingebaut werden. Die Dicer-Reaktion kann *in vitro* mit radioaktiv markierter RNA und IP-Proben rekonstituiert werden (Meister *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit als Dicersubstrat verwendete RNA war pre-miR-27a (Landthaler *et al.*, 2004), die durch Einbau von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-UMP radioaktiv markiert worden ist (Abschnitt 6.2.1.11). Die Sequenz von pre-miR-27a mit der fett gedruckten reifen miR-27a lautet:

TTA ATA CGA CTC ACT ATA GCT GAG GAG CAG GGC TTA GCT GCT TGT GAG CAG  
GGT CCA CAC CAA GTA GTG **TTC ACA GTG GCT AAG TTC CGC** CCC CCA GC.

Reaktionsansatz:

1 $\mu$ l	ATP 0,1 mM
0,15 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> 1M
0,1 $\mu$ l	RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	radioaktive pre-miR-27a (2 Bq/(cm <sup>2</sup> x $\mu$ l))
0-15 $\mu$ l	Immunopräzipitat in PBS
ad 20 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt und die RNA gereinigt. Die in RNA-Probenpuffer aufgenommene RNA wurde

mittels 12-15%iger denaturierender Harnstoff-PAGE und Autoradiographie analysiert. Als Größenstandard wurde ein Strang einer beliebigen 21 nt-langen siRNA eingesetzt, der in einer PNK-Reaktion radioaktiv markiert worden ist (Abschnitt 6.2.1.7).

#### 6.2.5.6 Partieller RNase T1-Verdau

4  $\mu$ l RNase T1-Lösung wurden mit 83,6  $\mu$ l *carrier*-RNA-Lösung vermischt und bei -80°C als RNase T1-Verdünnung aufbewahrt. 5  $\mu$ l dieser Mischung wurden mit 1  $\mu$ l radioaktiv 5'-*Cap*-markierter RNA (1 Bq/(cm<sup>2</sup> x  $\mu$ l)) für zehn Minuten bei 50°C inkubiert. Bis zur Verwendung wurde der Ansatz bei -20°C gelagert.

Zeigte sich, dass die RNase T1-Aktivität zu stark gewesen ist, so dass lange RNA-Abbauprodukte unterrepräsentiert waren, wurde die Inkubationszeit verkürzt und/oder die RNase T1-Verdünnung mit einer 1:10 verdünnten RNase T1-Lösung hergestellt.

#### 6.2.5.7 In vitro RISC-Assay

Die Ago2-katalysierte Endonukleolyse einer *target*-RNA kann *in vitro* mit <sup>32</sup>P-*Cap*-markierter *target*-RNA rekonstituiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten RISC-Substrate sind ca. 170 Nukleotide lang und beinhalten einen zu einer spezifischen kleinen RNA perfekt komplementären Sequenzabschnitt. Die Sequenzen sind publiziert: „luci II“ ist zu finden in Martinez *et al.*, 2002 und „86.1“ in Meister *et al.*, 2004 (b).

Für den Einbau künstlicher kleiner RNAs in Ago-Proteine wurde RISC vorab immunopräzipitiert, um die kleine RNA vor Degradation durch zelluläre RNasen zu schützen. Dem Immunopräzipitat wurde dann lediglich der einzubauende Einzelstrang zugesetzt:

12,5 $\mu$ l	RISC-Assay 2x Reaktionspuffer
2,5 $\mu$ l	einzelsträngige siRNA (1 $\mu$ M)
ad 24 $\mu$ l	Immunopräzipitat

Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Zugabe von 1  $\mu$ l <sup>32</sup>P-*target*-RNA (1 Bq/(cm<sup>2</sup> x  $\mu$ l)) erfolgte. Wurde im Experiment dagegen eine endogene miRNA adres-

siert, so wurde die künstliche kleine RNA durch Wasser ersetzt und die  $^{32}\text{P}$ -*target*-RNA (1 Bq/(cm<sup>2</sup> x  $\mu\text{l}$ ) direkt zugesetzt. Nach einer Stunde bei 30°C wurde die RISC-Reaktion mittels Proteinase K-Verdau gestoppt. Die gereinigte und in denaturierendem Probenpuffer aufgenommene RNA wurde auf einem 8%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel auf *Whatman*-Filterpapier getrocknet und zur Aufnahme des Autoradiogramms ein Film aufgelegt. Als Größenstandard diente die im Experiment verwendete und einem partiellen RNase T1-Verdau unterzogene  $^{32}\text{P}$ -*target*-RNA.

#### 6.2.5.8 Zeitabhängige *in vitro* Untersuchung von RISC-Aktivität: Durchführung und Auswertung

Ein Vielfaches eines 25  $\mu\text{l}$  *in vitro* RISC-Assayansatzes wurde bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 25  $\mu\text{l}$  entnommen und für die nachfolgende RNA-Analyse mittels denaturierender Gelelektrophorese und Autoradiographie sofort einem Proteinase K-Verdau unterzogen. Weitere 25  $\mu\text{l}$  wurden entnommen und für die Western-Blotanalyse mit Proteinprobenpuffer versetzt.

Bei der Auswertung wurden für jeden Zeitpunkt, sprich für jede Spur im gescannten Autoradiogramm, die Signalintensitäten des *cleavage*-Produktes und der jeweiligen Gelspur im Ganzen mit dem Computerprogramm „ImageGauge“ (Version 4.1, *Fuji*) ermittelt und um den Hintergrund korrigiert. Das Signalverhältnis von *cleavage*-Produkt zur Gesamtmenge wurde in Abhängigkeit zur Inkubationszeit graphisch dargestellt.

#### 6.2.5.9 RISC-Rekonstitution mit kleinen 5'-CH<sub>3</sub>- und 5'-P-RNAs: Durchführung und Auswertung

Für die RISC-Rekonstitution *in vitro* wurden die zu untersuchenden Immunopräzipitate aufgeteilt und in einem Endvolumen von je 50  $\mu\text{l}$  unter Pufferbedingungen eines *in vitro* RISC-Assays entweder 1 pmol 5'-P-21.27 RNA oder 6 pmol 5'-CH<sub>3</sub>-21.27 RNA zugesetzt. Die Reaktionansätze wurden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die größere Menge an CH<sub>3</sub>-

21.27 sollte die geringere Bloteffizienz der methylierten RNA ausgleichen. Anschließend wurde RISC mittels IP erneut isoliert und von jeder Probe eine Hälfte der Proteinanalyse via Western-Blot zugeführt, die andere der RNA-Analyse via Northern-Blot.

Die Signalintensitäten der erhaltenen Autoradiogramme zweier unabhängiger Experimente wurden mit dem „ImageGauge“-Computerprogramm (Version 4.1, *Fuji*) quantifiziert, bezüglich des Hintergrundes korrigiert und der Mittelwert für jede Probe im Balkendiagramm inklusive Standardabweichung (Excel für Mac, Version 11.5) dargestellt. Um die RISC-Assemblierungseffizienz der Ago2-Mutanten in Abhängigkeit der 5'-Modifikation der RNA zu veranschaulichen, wurde auf Ago2-Y529F normalisiert.

#### 6.2.5.10 Übertragung der Phosphorylgruppe kleiner RNAs auf Ago-Proteine

750 pmol 21.27 RNA wurden entweder am 5'- oder 3'-Ende radioaktiv markiert und mittels denaturierender Harnstoff-PAGE gereinigt. Gleiche Mengen des Gegenstranges 21.28 wurden identischen Arbeitsschritten unterzogen, jedoch in Gegenwart von Wasser anstelle von radioaktiven Nukleotiden. Beide Stränge wurden in Wasser aufgenommen und hybridisiert.

In Gegenwart von Phosphataseinhibitor wurde von HEK 293 Zellen, die FH-Fusionsproteine exprimierten, zytoplasmatische Extrakte hergestellt. Nach zwei Minuten Zentrifugation bei 17000 g wurden diese auf 100 mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> und 10% (v/v) Glycerin eingestellt, indem vier Volumenteile Extrakt ein Volumenteil 5x Roeder A-Ergänzungspuffer zugesetzt wurde. Nach Zugabe der radioaktiven kleinen RNA-Duplices wurden die Proben für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, daraufhin um lucIII-RNA ohne 5'-Cap ergänzt und die Inkubation für weitere 45 Minuten fortgesetzt, bevor die Fusionsproteine in Gegenwart von 4 mg/ml RNase A immunopräzipitiert wurden. Die gewaschenen Immunopräzipitate wurden in PBS nochmals mit RNase A behandelt, gewaschen und schließlich in Proteinprobenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte via SDS-PAGE und Autoradiographie des getrockneten, Coomassie-gefärbten Proteingels (Abschnitt 6.2.2.6). Die restlichen 10% (v/v) jeder Probe wurden zur Western-Blotanalyse verwendet. Für die Dokumentation der RNase A-Aktivität

wurden den Reaktionsansätzen während des Experimentes mehrmals Proben entnommen, mit RNA-Probenpuffer auf 2 (Bq/cm<sup>2</sup>)/ $\mu$ l verdünnt und via denaturierender Harnstoff-PAGE und nachfolgender Autoradiographie analysiert.

#### 6.2.5.11 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription (RT) wurde Gesamt-RNA von 5-10% (v/v) des im Experiment eingesetzten Lysates bzw. von 50% (v/v) des Immunopräzipitates isoliert, wobei der Proteinase K-Verdau in PBS durchgeführt und die präzipitierte RNA zusätzlich mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen wurde. Die RNA wurde schließlich in 10  $\mu$ l Wasser aufgenommen und mit DNase I behandelt.

DNase I- Reaktionsansatz:

- 1,8  $\mu$ l 10x DNase I-Reaktionspuffer
- 0,6  $\mu$ l DNase I (1 U/ $\mu$ l)
- 0,04  $\mu$ l RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)
- 10  $\mu$ l RNA-Lösung
- ad 18  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Proben zur Inhibierung der DNase I für zehn Minuten bei 65°C inkubiert. 1  $\mu$ l des Reaktionsansatzes wurde schließlich für die RT eingesetzt, die mit dem „*First strand cDNA Synthesis Kit*“ (Fermentas) durchgeführt wurde.

RT-Reaktionsansatz:

- 1  $\mu$ l DNaseI-behandelte RNA-Lösung
- 1  $\mu$ l Hexamere mit Zufallssequenzen
- ad 11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Nach fünf Minuten bei 70°C wurde den Proben auf Eis je

- 4  $\mu$ l 5x Reaktionspuffer
- 1  $\mu$ l RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l dNTP-Mix (à 10 mM)

zugewetzt. Nach fünf Minuten bei 25°C erfolgte schließlich die Zugabe von

- 2  $\mu$ l M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/ $\mu$ l),

womit die cDNA-Synthese gestartet wurde. Nach einer Stunde bei 37°C wurde die Reaktion durch 10minütige Inhibierung des Enzyms bei 70°C gestoppt.

#### 6.2.5.12 Quantitative Echtzeit-PCR (engl. *quantitative real-time* PCR, qRT-PCR)

qRT-PCR ermöglicht die Quantifizierung der RNA von Interesse in Kombination mit hoher Sensitivität. Der praktische Ablauf skizziert sich wie folgt: Ein Pool an RNA wird in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription Abschnitt 6.2.5.11). Anschließend wird mittels spezifischer DNA-Oligonukleotide ein Abschnitt der DNA-Sequenz via PCR amplifiziert, der von der RNA von Interesse herrührt. Zwischen den Denaturierungsschritten in jedem PCR-Zyklus tritt die DNA wieder zu Doppelsträngen zusammen, in die ein im PCR-Reaktionsmix enthaltener Farbstoff interkaliert. Dabei verändert dieser seine Eigenschaften, was man als Messgröße und damit zur Bestimmung der PCR-Produktmenge in Echtzeit ausnutzt. Die Produktmenge steht in den ersten Zyklen in direktem Verhältnis zur Ausgangsmenge des untersuchten Transkriptes. Als Größe wird der so genannte  $C_t$ -Wert angegeben. Er bezeichnet den PCR-Zyklus, in dem die Produktmenge die Basislinie überschreitet, ergo aus dem Hintergrundrauschen heraustritt (engl. *threshold cycle*  $C_t$ ). Der  $C_t$ -Wert ist umso kleiner, je abundanter das Transkript ist. Im Rahmen dieser Arbeit war die mRNA von Interesse „Rap1a“, eine *target* RNA von miR-19b aus HEK 293 Zellen (unveröffentlichte Daten von Dr. M. Beitzinger, Uni Regensburg, AG Meister), deren relative Abundanz verglichen zur mRNA des Haushaltgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in Immunopräzipitaten verschiedener Ago2-Mutanten bestimmt wurde.

Für die qRT-PCR wurde cDNA wie unter Abschnitt 6.2.5.11 beschrieben angefertigt und mit Wasser auf 100  $\mu$ l verdünnt. Für die qRT-PCR wurde der 2x Reaktionsmix „MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay w/fluorescein“ (*Eurogentec*) verwendet.

qRT-PCR-Reaktionsansatz:

6,67 $\mu$ l	verdünnte cDNA-Lösung
7,5 $\mu$ l	2x Reaktionsmix von <i>Eurogentec</i>
0,6 $\mu$ l	Primermix (à 5 $\mu$ M)
ad 15 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Die Datenaufnahme erfolgte an einem „MyiQ™ Single Color Real-Time PCR“-Gerät (BIO-RAD) und die Datenanalyse mit der mitgelieferten Software „Biorad iQ5-Software“ Version 2.1. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

1x:	3 min	95°C
40x:	10 sec	95°C
	30 sec	60°C, Echtzeitmessung
1x:	1 min	95°C
1x	1 min	60°C
71x:	10 sec	60°C, Aufnahme Schmelzkurve

Für jede cDNA-Primer-Kombination wurden vier einzelne Reaktionen angesetzt. Von den erhaltenen  $C_t$ -Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt (Excel für Mac, Version 11.5). Die Differenz der IP- und Input-Werte jeder Probe geben Auskunft über die Anreicherung des Transkriptes im Zuge der IP. Die Anreicherungsfaktoren für die Rap1a-mRNA und die der GAPDH-mRNA wurden für jeden IP-Ansatz voneinander subtrahiert. Somit erhält man das Maß der Anreicherung des untersuchten Transkriptes relativ zur Kontrolle. Es sei daran erinnert, dass die PCR-Produktmenge sich proportional zu  $2^{\text{PCR-Zyklus}}$  verhält. Daher entspricht die Differenz einer Verhältnisbildung. Die beschriebene Rechenoperation lässt sich zusammenfassen in:

$$\text{mRNA-Anreicherung}_{\text{Probe}} = 2^{-\Delta\Delta C_t(\text{Probe})} / 2^{-\Delta\Delta C_t(\text{Kontrolle})} \quad (\text{Livak und Schmittgen, 2001})$$

Der Fehler wurde wie folgt bestimmt: Die größte Standardabweichung bei den Messwerten wurde auf das berechnete Ergebnis angewendet. Aus der Abweichung des Originalergebnisses von dem unter Berücksichtigung der größten Standardabweichung wurde der angegebene Fehler kalkuliert.

## Luziferase-Reporterassays

### 6.2.5.13 Luziferase-Aktivitätsmessung

Die Puffer sind unter 6.1.7 „Puffer für RNA-Reporter-Assays“ aufgeführt. Vor der Messung wurden 10 ml *Renilla*-Luziferase-Puffer um 10 µl Coelenterazin 1000x ergänzt und 10 ml *Firefly*-Luziferasepuffer mit 333 µl DTT 1 M versetzt. Die zur Messung der Luziferase-Aktivität eingesetzte Lysatmenge richtete sich nach der Enzymaktivität. Das Lysat wurde gegebenenfalls mit 1x „passive lysis buffer“ (*Promega*) auf 20 µl verdünnt. Dieses Mindestvolumen gewährleistete eine gute Durchmischung mit den Reagenzien während der Messung. Die Bedienung des Gerätes „Mithras LB940“ (*Berthold*) erfolgte über die Software „MicroWIN 2000“ Version 4.34. Es wurde eine Endpunktmessung im *well-per-well*-Modus mit 60 µl Pufferinjektionsvolumen durchgeführt. Die Durchmischung erfolgte automatisch und dauerte inklusive der Reagenzienzugabe drei Sekunden. Die Messzeit der *Firefly*-Luziferase-Aktivität betrug drei Sekunden, die der anschließend gemessenen *Renilla*-Luziferase fünf Sekunden.

Die erhaltenen Daten wurden um den Hintergrund korrigiert und wie folgt ausgewertet:

Beim *tethering*-Assay wurde der *Renilla*-Luziferase-Messwert durch den der *Firefly*-Luziferase dividiert und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Mehrfachansätze bestimmt (Excel for Mac Version 11.5). Für die graphische Darstellung wurde auf die Daten der Kontrollansätze ohne  $\lambda$ N-Peptid normiert. Das gilt auch für die Standardabweichung.

Für die *in vivo rescue*-Experimente wurde der *Firefly*-Luziferase-Messwert durch den der *Renilla*-Luziferase dividiert und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Mehrfachansätze bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden auf den Ansatz normiert, bei dem das proteinkodierende Plasmid transfiziert worden war, das jedoch keine kodierenden Sequenzen enthielt.

6.2.5.14 In vivo rescue-Experimente

Um die Funktionalität der Ago2-Mutanten *in vivo* zu analysieren, wurden Luziferase-Reporterassays durchgeführt. Als Reporterplasmid wurde pMIR-TK-RNL-miR-21 eingesetzt. Dieses kodiert neben dem *Renilla*- auch den *Firefly*-Luziferase-ORF. In der 3'-UTR der *Firefly*-Luziferase befindet sich eine perfekt komplementäre Sequenz für miRNA-21 (Höck *et al.*, 2007). Die Expression der *Firefly*-Luziferase steht daher unter Kontrolle der endogenen miRNA-21 und wird reprimiert, wenn der miRNA-*silencing*-Signalweg funktional ist. Die Expression der *Renilla*-Luziferase erfolgt dagegen unabhängig und dient der Bewertung der Transfektionseffizienz sowie die Normierung der Messwerte.

HEK 293 oder HeLa Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten ausgesät und dabei entweder mit einer siRNA (80 ng/μl), die gegen einen Sequenzabschnitt in der 3'-UTR von humanem Ago2-Protein gerichtet war, oder mit einer Kontroll-siRNA, für die keine spezifischen Bindungssequenzen *in vivo* bekannt sind (Weinmann *et al.*, 2009), reverse transfiziert (Abschnitt 6.2.2.5). 48 Stunden später wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten verteilt und mit dem proteinkodierenden Plasmid sowie dem Reporterplasmid transfiziert (Abschnitt 6.2.2.4). Die transfizierten Plasmidmengen waren:

<u>HEK 293 Zellen:</u>	bzw.	<u>HeLa Zellen:</u>
80 ng proteinkodierendes Plasmid (VP5 oder pCS2)		450 ng proteinkodierendes Plasmid (VP5 oder pCS2)
20 ng Reporterplasmid (pMIR-RNL-Tk)		50 ng Reporterplasmid (pMIR-RNL-Tk)

Bei Experimenten mit MEF Ago2<sup>-/-</sup> Zellen wurde ausschließlich dieser zweite Transfektionsschritt durchgeführt und 500 ng DNA eingesetzt.

48 Stunden später wurden die Zellen in 90 μl 1x *passive lysis*-Puffer (*Promega*) leicht schüttelnd für 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate wurden daraufhin entweder bei -20°C verwahrt oder 20 μl unmittelbar für die Messung der Luziferase-Aktivitäten verwendet.

6.2.5.15 Tethering-Assay

Mit dem *tethering*-Assay wurde untersucht, wie die Ago-Mutanten unabhängig von ihrem miRNA-Bindungsvermögen *in vivo* auf eine Reporter-*target*-RNA wirken. Der Reporter trug eine fünffache Kopie des Hämoglobin boxB-Aptamers in der 3'-UTR (Gehring *et al.*, 2003). An das Protein von Interesse wurde N-terminal das Bakteriophagen  $\lambda$ N-Peptid fusioniert. Diese Komponenten übernahmen die Funktion von miRNA und miRNA-Bindungsstelle, um das zu untersuchende Protein in die räumliche Nähe der Reporter-RNA zu bringen. Folgende drei Plasmide waren zu transfizieren:

- 1) Plasmid für die Expression des zu untersuchenden Proteins  
Dieses trug N-terminal entweder das RNA-bindende  $\lambda$ N-HA- oder das nicht an RNA-bindende und daher als Kontrolle fungierende HA-Peptid.
- 2) Reporterplasmid, das für die *Renilla*-Luziferase mit einer fünffachen Kopie der boxB-Aptamersequenz in der 3'-UTR kodierte, wobei das  $\lambda$ N-Peptid spezifisch an letztere auf Stufe der RNA bindet.
- 3) Plasmid zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und Normierung der Messdaten  
Diesem Zweck diente die Co-expression der *Firefly*-Luziferase.

Alle drei Plasmide wurden in Dreifachansätzen in HEK 293 oder HeLa Zellen im 48er-Zellkulturplattenformat transfiziert. Es galt:

<u>HEK 293 Zellen:</u>	bzw.	<u>HeLa Zellen:</u>
75 ng proteinkodierendes Plasmid (=pCIneo- $\lambda$ N-HA- oder pCIneo-HA-Plasmid)		400 ng proteinkodierendes Plasmid (=pCIneo- $\lambda$ N-HA- oder pCIneo-HA-Plasmid)
15 ng Reporterplasmid (pRL-5boxB)		120 ng Reporterplasmid (pRL-5boxB)
10 ng Normierungsplasmid (pMIR)		80 ng Normierungsplasmid (pMIR)

48 Stunden später wurden die Zellen in 90  $\mu$ l 1x „passive lysis buffer“ (*Promega*) leicht schüttelnd für 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate wurden entweder bei -20°C verwahrt oder 20  $\mu$ l direkt zur Messung der Luziferase-Aktivität eingesetzt.

## 7. Quellenverzeichnis

### 7.1 Internetquellen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>  
(Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information)

[http://www.uniprot.org/uniprot/Q92922#section\\_comments](http://www.uniprot.org/uniprot/Q92922#section_comments)  
(SMRC1-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes)

<http://141.61.102.18/phosida/index.aspx>  
(Datenbank zu posttranslationalen Modifikationen)

<http://pictar.mdc-berlin.de/>  
(miRNA-*target*-RNA-Paare)

<http://www.targetscan.org/>  
(miRNA-*target*-RNA-Paare)

<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/aminosaeuren/prot-as.html>  
(Aminosäurestrukturen in zweidimensionaler Fischer-Projektion)

### 7.2. Literaturverzeichnis

**Adams** BD, Claffey KP, White BA. (2009) Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology* 150(1):14-23.

Ahlquist P. (2002) RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296(5571):1270-3. Review.

Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol.* 13(10):807-18.

Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. (2007) Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* 130(1):101-12.

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Lührmann R. (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11(5):717-27.

Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA. (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol.* 11(13):1017-27.

Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5(2):337-50.

- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442(7099):203-7
- Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. (2007 a) Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 316(5825):744-7.
- Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. (2007 b) The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318(5851):761-4. Review.
- Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ. (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 31(6):785-99.
- Azuma-Mukai A, Oguri H, Mituyama T, Qian ZR, Asai K, Siomi H, Siomi MC. (2008) Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(23):7964-9.
- Babiarz** JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. (2008) Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22(20):2773-85.
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455(7209):64-71.
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122(4):553-63.
- Baillat D, Shiekhattar R. (2009) Functional dissection of the human TNRC6 (GW182-related) family of proteins. *Mol Cell Biol.* (15):4144-55.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol.* (8):839-45. Review.
- Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281-97. Review.
- Bartel DP. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215-33. Review.
- Baulcombe DC. (2007) Molecular biology. Amplified silencing. *Science* 315(5809):199-200.
- Baumberger N, Baulcombe DC. (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33):11928-33.

- Bayne EH, White SA, Kagansky A, Bijos DA, Sanchez-Pulido L, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Ponting CP, Rappsilber J, Allshire RC. (2010) *Stc1*: a critical link between RNAi and chromatin modification required for heterochromatin integrity. *Cell* 140(5):666-77.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. (2006 a) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20(14):1885-98.
- Behm-Ansmant I, Massenet S, Immel F, Patton JR, Motorin Y, Branlant C. (2006 b) A previously unidentified activity of yeast and mouse RNA:pseudouridine synthases 1 (Pus1p) on tRNAs. *RNA* 12(8):1583-93.
- Beilharz TH, Humphreys DT, Clancy JL, Thermann R, Martin DI, Hentze MW, Preiss T. (2009) microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One* 4(8):e6783.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28(2):328-36.
- Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125(6):1111-24.
- Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C. (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* 17(1):170-80.
- Boland A, Tritschler F, Heimstädt S, Izaurralde E, Weichenrieder O. (2010) Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep.* 11(7):522-7.
- Bregues M, Teixeira D, Parker R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310(5747):486-9.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3(3):e85.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128(6):1089-103.
- Brennecke J, Malone CD, Aravin AA, Sachidanandam R, Stark A, Hannon GJ. (2008) An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* 322(5906):1387-92.
- Brower-Toland B, Findley SD, Jiang L, Liu L, Yin H, Dus M, Zhou P, Elgin SC, Lin H. (2007) *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev.* 21(18):2300-11.
- Buchan JR, Parker R. (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36(6):932-41. Review.

Bühler M, Spies N, Bartel DP, Moazed D. (2008) TRAMP-mediated RNA surveillance prevents spurious entry of RNAs into the *Schizosaccharomyces pombe* siRNA pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 15(10):1015-23.

**Carmell MA**, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16(21):2733-42. Review.

Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ. (2007) MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 12(4):503-14.

Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhäuser N, Marchisio PC, Biffo S. (2003) Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426(6966):579-84.

Champoux JJ, Schultz SJ. (2009) Ribonuclease H: properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription. *FEBS J.* 276(6):1506-16. Review.

Chatterjee S, Grosshans H. (2009) Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 461(7263):546-9.

Chekulaeva M, Filipowicz W, Parker R. (2009) Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA* 15(5):794-803.

Chekulaeva M, Filipowicz W. (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol.* 21(3):452-60. Review.

Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. (2010) A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465(7298):584-9.

Chekulaeva M, Parker R, Filipowicz W. (2010) The GW/WG repeats of *Drosophila* GW182 function as effector motifs for miRNA-mediated repression. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jun 8. [Epub ahead of print]

Chen PY, Weinmann L, Gaidatzis D, Pei Y, Zavolan M, Tuschl T, Meister G. (2008) Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA* 14(2):263-74.

Chen C, Jin J, James DA, Adams-Cioaba MA, Park JG, Guo Y, Tenaglia E, Xu C, Gish G, Min J, Pawson T. (2009) Mouse Piwi interactome identifies binding mechanism of Tdrkh Tudor domain to arginine methylated Miwi. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(48):20336-41.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436(7051):740-4.

Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447(7146):823-8.

- Chiu YL, Rana TM. (2003) siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 9(9):1034-48.
- Chu CY, Rana TM. (2006) Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* 4(7):e210.
- Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA, Giraldez AJ. (2010) A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328(5986):1694-8.
- Cikaluk DE, Tahbaz N, Hendricks LC, DiMattia GE, Hansen D, Pilgrim D, Hobman TC. (1999) GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell.* 10(10):3357-72.
- Cole C, Sobala A, Lu C, Thatcher SR, Bowman A, Brown JW, Green PJ, Barton GJ, Hutvagner G. (2009) Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA* 15(12):2147-60.
- Coller J, Parker R. (2004) Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:861-90. Review.
- Cougot N, Babajko S, Séraphin B. (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol.* 165(1):31-40.
- Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12(23):3715-27.
- Croce CM. (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 10(10):704-14. Review.
- Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, Perrimon N, Kellis M, Wohlschlegel JA, Sachidanandam R, Hannon GJ, Brennecke J. (2008) An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 453(7196):798-802.
- Deng** W, Lin H. (2002) miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell.* 2(6):819-30.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432(7014):231-5.
- Deribe YL, Pawson T, Dikic I. (2010) Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol.* 17(6):666-72. Review.
- Diederichs S, Haber DA. (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131(6):1097-108.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11(5):1475-89.

- van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Séraphin B. (2002) Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* 21(24):6915-24.
- Ding L, Spencer A, Morita K, Han M. (2005) The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* 19(4):437-47.
- Ding XC, Slack FJ, Grosshans H. (2008) The let-7 microRNA interfaces extensively with the translation machinery to regulate cell differentiation. *Cell Cycle* 7(19):3083-90.
- Ding XC, Grosshans H. (2009) Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J.* 28(3):213-22.
- Djuranovic S, Zinchenko MK, Hur JK, Nahvi A, Brunelle JL, Rogers EJ, Green R. (2010) Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 17(2):144-50.
- Doench JG, Sharp PA. (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18(5):504-11.
- Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, Mower JP, Wolfe KH, Fink GR, Bartel DP. (2009) RNAi in budding yeast. *Science* 326(5952):544-50.
- Eacker** SM, Dawson TM, Dawson VL. (2009) Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 10(12):837-41. Review.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. (2001 a) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2):188-200.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. (2001 b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20(23):6877-88.
- EI-Shami M, Pontier D, Lahmy S, Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T. (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* 21(20):2539-44.
- Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, Pfeffer S, Rajewsky N, Meister G. (2008) A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell.* 32(4):519-28.
- Ender C, Meister G. (2010) Argonaute proteins at a glance. *J Cell Sci.* 123(Pt 11):1819-23.
- Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E. (2007 a) Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* 21(20):2558-70.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. (2007 b) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):9-22. Review.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. (2007 c) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27(11):3970-81.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. (2008) GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol.* 15(4):346-53.

Eulalio A, Tritschler F, Büttner R, Weichenrieder O, Izaurralde E, Truffault V. (2009 a) The RRM domain in GW182 proteins contributes to miRNA-mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 37(9):2974-83.

Eulalio A, Helms S, Fritsch C, Fauser M, Izaurralde E. (2009 b) A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA* 15(6):1067-77.

Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. (2009 c) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 15(8):1433-42. Review.

Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. (2009 d) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15(1):21-32.

Eystathioy T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ. (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 13(4):1338-51.

Eystathioy T, Jakymiw A, Chan EK, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ. (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9(10):1171-3.

**Fabian** MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, Chen CY, Shyu AB, Yates JR 3rd, Hannon GJ, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. (2009) Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell.* 35(6):868-80.

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* 79:351-79. Review.

Faehnle CR, Joshua-Tor L. (2007) Argonautes confront new small RNAs. *Curr Opin Chem Biol.* 11(5):569-77. Review.

Farazi TA, Juranek SA, Tuschl T. (2008) The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* 135(7):1201-14. Review.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9(2):102-14. Review.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11.

- Frank F, Sonenberg N, Nagar B. (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465(7299):818-22.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19(1):92-105.
- Gehring** NH, Neu-Yilik G, Schell T, Hentze MW, Kulozik AE. (2003) Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol Cell.* 11(4):939-49.
- Ghildiyal M, Zamore PD. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 10(2):94-108. Review.
- Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 11(9):1143-9. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2009 Oct;11(10):1272.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312(5770):75-9.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442(7099):199-202.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432(7014):235-40.
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123(4):631-40.
- Grewal SI, Jia S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet.* 8(1):35-46. Review.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27(1):91-105.
- Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. (2007) A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315(5818):1587-90.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466(7308):835-40.
- Hall** TM. (2005) Structure and function of argonaute proteins. *Structure* 13(10):1403-8. Review.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441):950-2.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404(6775):293-6.

- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293(5532):1146-50.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18(24):3016-27.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125(5):887-901.
- Höck J, Weinmann L, Ender C, Rüdel S, Kremmer E, Raabe M, Urlaub H, Meister G. (2007) Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep.* 8(11):1052-60.
- Höck J, Meister G. (2008) The Argonaute protein family. *Genome Biol.* 9(2):210. Review.
- Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, Zamore PD. (2007) The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol.* 17(14):1265-72.
- Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronenbold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RH, Hannon GJ, Draper BW, Ketting RF. (2007) A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 129(1):69-82.
- Houwing S, Berezikov E, Ketting RF. (2008) Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J.* 27(20):2702-11.
- Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P. (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics.* 10:413.
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(47):16961-6.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293(5531):834-8.
- Hutvagner G, Simard MJ. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):22-32. Review.
- Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. (2007) A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 315(5808):97-100.
- Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhashi I, Meshi T, Ishikawa M. (2010) In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell.* 39(2):282-91.

- Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Lührmann R, Achsel T. (2002) The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA* 8(12):1489-501.
- Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell*. 39(2):292-9.
- Jackson** RJ, Hellen CU, Pestova TV. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(2):113-27. Review.
- Jakymiw A, Ikeda K, Fritzler MJ, Reeves WH, Satoh M, Chan EK. (2006) Autoimmune targeting of key components of RNA interference. *Arthritis Res Ther*. 8(4):R87.
- Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK. (2005) Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol*. 7(12):1267-74. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2006 Jan;8(1):100.
- Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, Ram R, Hardy D, Shames DS, Minna JD, Corey DR. (2005) Inhibiting gene expression at transcription start sites in chromosomal DNA with antigene RNAs. *Nat Chem Biol*. 1(4):216-22.
- Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, Ram R, Nordsell R, Shames DS, Minna JD, Corey DR. (2006) Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol*. 13(9):787-92.
- Jinek M, Fabian MR, Coyle SM, Sonenberg N, Doudna JA. (2010) Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nat Struct Mol Biol*. 17(2):238-40.
- Kai** ZS, Pasquinelli AE. (2010) MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 17(1):5-10. Review.
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*. 19(4):489-501.
- Karginov FV, Hannon GJ. (2010) The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell* 37(1):7-19. Review.
- Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Ørom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E, Agami R. (2007) RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131(7):1273-86.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*. 169(6):871-84.

- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet.* 39(10):1278-84.
- Khvorov A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2):209-16. Erratum in: *Cell.* 2003 Nov 14;115(4):505.
- Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ. (2006) Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol.* 13(9):793-7.
- Kim VN, Han J, Siomi MC. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(2):126-39. Review.
- Kinch LN, Grishin NV. (2009) The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif. *Biol Direct.* 4:2.
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinakis S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129(6):1141-51.
- Kirino Y, Mourelatos Z. (2007) Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol.* 14(4):347-8.
- Kirino Y, Kim N, de Planell-Saguer M, Khandros E, Chiorean S, Klein PS, Rigoutsos I, Jongens TA, Mourelatos Z. (2009) Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat Cell Biol.* 11(5):652-8.
- Kirino Y, Vourekas A, Sayed N, de Lima Alves F, Thomson T, Lasko P, Rappaport J, Jongens TA, Mourelatos Z. (2010) Arginine methylation of Aubergine mediates Tudor binding and germ plasm localization. *RNA* 16(1):70-8.
- Kocerha J, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Huang J, Ramsey AJ, Caron MG, Sales N, Willoughby D, Elmen J, Hansen HF, Orum H, Kauppinen S, Kenny PJ, Wahlestedt C. (2009) MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(9):3507-12.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 37(5):495-500.
- Krol J, Buskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribi S, Richter J, Duebel J, Bicker S, Fehling HJ, Schübeler D, Oertner TG, Schratt G, Bibel M, Roska B, Filipowicz W. (2010 a) Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* 141(4):618-31.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010 b) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 11(9):597-610. Review.
- Kulkarni M, Ozgur S, Stoecklin G. (2010) On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans.* 38(Pt 1):242-51. Review.

- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin H, Matsuda Y, Nakano T. (2004) Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131(4):839-49.
- Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T. (2008) DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22(7):908-17.
- Landthaler M**, Yalcin A, Tuschl T. (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol.* 14(23):2162-7.
- Landthaler M, Gaidatzis D, Rothballer A, Chen PY, Soll SJ, Dinic L, Ojo T, Hafner M, Zavolan M, Tuschl T. (2008) Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* 14(12):2580-96.
- Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, Kingston RE. (2006) Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313(5785):363-7.
- Lazzaretti D, Tournier I, Izaurralde E. (2009) The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* 15(6):1059-66.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956):415-9.
- Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25(3):522-32.
- Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA. (2006) Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(48):18125-30.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120(1):15-20.;
- Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. (2006) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(46):17337-42.
- Li S, Lian SL, Moser JJ, Fritzler ML, Fritzler MJ, Satoh M, Chan EK. (2008) Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing. *J Cell Sci.* 121(Pt 24):4134-44.
- Lian SL, Li S, Abadal GX, Pauley BA, Fritzler MJ, Chan EK. (2009) The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA* 15(5):804-13.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433(7027):769-73.

Lin H, Spradling AC. (1997) A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124(12):2463-76.

Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. (2003) Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426(6965):465-9.

Lingel A, Sattler M. (2005) Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol.* 15(1):107-15. Review.

Lipardi C, Paterson BM. (2009) Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* involved in RNAi and transposon suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(37):15645-50.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437-41.

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. (2005 a) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 7(7):719-23.

Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ. (2005 b) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* 7(12):1261-6. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2006 Jan;8(1):100.

Liu Q, Paroo Z. (2010) Biochemical principles of small RNA pathways. *Annu Rev Biochem.* 79:295-319. Review.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303(5654):95-8.

**Ma** JB, Ye K, Patel DJ. (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429(6989):318-22.

Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434(7033):666-70.

Maniataki E, Mourelatos Z. (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* 19(24):2979-90.

Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol.* 13(12):1102-7.

- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110(5):563-74.
- Martinez J, Tuschl T. (2004) RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18(9):975-80.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317(5845):1764-7.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123(4):607-20.
- Matzke MA, Birchler JA. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet.* 6(1):24-35. Review.
- Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. (2004 a) Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* 10(3):544-50.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. (2004 b) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 15(2):185-97.
- Meister G, Tuschl T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431(7006):343-9. Review.
- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. (2005) Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol.* 15(23):2149-55.
- Miyoshi K, Okada TN, Siomi H, Siomi MC. (2009) Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the *Drosophila* miRNA pathway. *RNA* 15(7):1282-91.
- Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. (2010) Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics* 284(2):95-103. Review.
- Moazed D. (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457(7228):413-20. Review.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305(5688):1289-92.
- Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, Gerber SA, Gygi SP, Moazed D. (2004) Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell* 119(6):789-802.

- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16(6):720-8.
- Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. (2005) Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(34):12135-40.
- Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM, Hannon GJ. (2007) Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev.* 21(6):682-93.
- Napoli C**, Lemieux C, Jorgensen R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2(4):279-289.
- Nelson PT, De Planell-Saguer M, Lamprinaki S, Kiriakidou M, Zhang P, O'Doherty U, Mourelatos Z. (2007) A novel monoclonal antibody against human Argonaute proteins reveals unexpected characteristics of miRNAs in human blood cells. *RNA* 13(10):1787-92.
- Nishida KM, Saito K, Mori T, Kawamura Y, Nagami-Okada T, Inagaki S, Siomi H, Siomi MC. (2007) Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA* 13(11):1911-22.
- Nishida KM, Okada TN, Kawamura T, Mituyama T, Kawamura Y, Inagaki S, Huang H, Chen D, Kodama T, Siomi H, Siomi MC. (2009) Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *EMBO J.* 28(24):3820-31.
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* 13(12):1108-14.
- Nykänen A, Haley B, Zamore PD. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107(3):309-21.
- Ohrt T**, Mütze J, Staroske W, Weinmann L, Höck J, Crell K, Meister G, Schülle P. (2008) Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. *Nucleic Acids Res.* 36(20):6439-49.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130(1):89-100.
- Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. (2008) The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* 453(7196):803-6.
- Okamura K, Lai EC. (2008) Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(9):673-8. Review.
- Olsen PH, Ambros V. (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* 216(2):671-80.

- Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, Gnad F, Cox J, Jensen TS, Nigg EA, Brunak S, Mann M. (2010) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*. 3(104):ra3.
- Orban TI, Izaurralde E. (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11(4):459-69.
- Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 30(4):460-71.
- Pall** GS, Hamilton AJ. (2008) Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc*. 3(6):1077-84.
- Paradela A, Albar JP. (2008) Advances in the analysis of protein phosphorylation. *J Proteome Res*. 7(5):1809-18. Review.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434(7033):663-6.
- Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q. (2009) Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139(1):112-22.
- Partridge JF, DeBeauchamp JL, Kosinski AM, Ulrich DL, Hadler MJ, Noffsinger VJ. (2007) Functional separation of the requirements for establishment and maintenance of centromeric heterochromatin. *Mol Cell* 26(4):593-602.
- Pauley KM, Eystathioy T, Jakymiw A, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK. (2006) Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO Rep*. 7(9):904-10.
- Perron MP, Provost P. (2009) Protein components of the microRNA pathway and human diseases. *Methods Mol Biol*. 487:369-85. Review.
- Peter ME. (2010) Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene* 29(15):2161-4. Review.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21(4):533-42.
- Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10(10):1518-25.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309(5740):1573-6.
- Qi** Y, Denli AM, Hannon GJ. (2005) Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol Cell* 19(3):421-8.
- Qi HH, Ongusaha PP, Myllyharju J, Cheng D, Pakkanen O, Shi Y, Lee SW, Peng J, Shi Y. (2008) Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455(7211):421-4.

- Rajewsky N.** (2006) microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 38 Suppl:S8-13. Review.
- Rana TM. (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):23-36. Review.
- Rand TA, Ginalski K, Grishin NV, Wang X. (2004) Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(40):14385-9.
- Rashid UJ, Paterok D, Koglin A, Gohlke H, Piehler J, Chen JC. (2007) Structure of Aquifex aeolicus argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA-induced silencing complex function. *J Biol Chem.* 282(18):13824-32.
- Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E. (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11(11):1640-7.
- Reinhart BJ, Bartel DP. (2002) Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 297(5588):1831.
- Reuter M, Chuma S, Tanaka T, Franz T, Stark A, Pillai RS. (2009) Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat Struct Mol Biol.* 16(6):639-46.
- Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol.* 12(4):340-9.
- Robb GB, Brown KM, Khurana J, Rana TM. (2005) Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol.* 12(2):133-7.
- Robb GB, Rana TM. (2007) RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* 26(4):523-37.
- Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H, Bartel DP. (2006) Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* 127(6):1193-207.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448(7149):83-6.
- Rüdel S, Flatley A, Weinmann L, Kremmer E, Meister G. (2008) A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. *RNA* 14(6):1244-53.
- Rüdel S, Wang Y, Lenobel R, Körner R, Hsiao HH, Urlaub H, Patel D, Meister G. (2010) Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Res.* 2010 Nov 10. [Epub ahead of print]
- Rybak A, Fuchs H, Hadian K, Smirnova L, Wulczyn EA, Michel G, Nitsch R, Krappmann D, Wulczyn FG. (2009) The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol.* 11(12):1411-20.

- Saito K**, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. (2007) Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* 21(13):1603-8.
- Saraiya AA, Wang CC. (2008) snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* 4(11):e1000224.
- Sarot E, Payen-Groschène G, Bucheton A, Péliisson A. (2004) Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *Genetics* 166(3):1313-21.
- Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82(3):323-30.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2):199-208.
- Schwarz DS, Tomari Y, Zamore PD. (2004) The RNA-induced silencing complex is a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease. *Curr Biol.* 14(9):787-91.
- Seggerson K, Tang L, Moss EG. (2002) Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol.* 243(2):215-25.
- Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455(7209):58-63.
- Sen GL, Blau HM. (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol.* 7(6):633-6.
- Siomi MC, Mannen T, Siomi H. (2010) How does the royal family of Tudor rule the PIWI-interacting RNA pathway? *Genes Dev.* 24(7):636-46. Review.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305(5689):1434-7.
- Souquere S, Mollet S, Kress M, Dautry F, Pierron G, Weil D. (2009) Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci.* 122(Pt 20):3619-26.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432(7014):173-8.
- Su H, Trombly MI, Chen J, Wang X. (2009) Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev.* 23(3):304-17.
- Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Moazed D, Grewal SI. (2005) RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(1):152-7.

- Taft** RJ, Glazov EA, Lassmann T, Hayashizaki Y, Carninci P, Mattick JS. (2009) Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA* 15(7):1233-40.
- Tahbaz N, Carmichael JB, Hobman TC. (2001) GERp95 belongs to a family of signal-transducing proteins and requires Hsp90 activity for stability and Golgi localization. *J Biol Chem.* 276(46):43294-9.
- Tahbaz N, Kolb FA, Zhang H, Jaronczyk K, Filipowicz W, Hobman TC. (2004) Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep.* 5(2):189-94.
- Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S. (2009) Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* 15(6):1078-89.
- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ. (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453(7194):534-8.
- Tang X, Zhang Y, Tucker L, Ramratnam B. (2010) Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jun 16. [Epub ahead of print]
- Thermann R, Hentze MW. (2007) *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447(7146):875-8.
- Thomas M, Lieberman J, Lal A. (2010) Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol.* 17(10):1169-74.
- Tiemann K, Rossi JJ. (2009) RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med.* 1(3):142-51. Review.
- Till S, Lejeune E, Thermann R, Bortfeld M, Hothorn M, Enderle D, Heinrich C, Hentze MW, Ladurner AG. (2007) A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol.* 14(10):897-903.
- Tritschler F, Huntzinger E, Izaurralde E. (2010) Role of GW182 proteins and PABPC1 in the miRNA pathway: a sense of déjà vu. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(5):379-84.
- Vagin** VV, Wohlschlegel J, Qu J, Jonsson Z, Huang X, Chuma S, Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Aravin AA. (2009) Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev.* 23(15):1749-62.
- Vasudevan S, Steitz JA. (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128(6):1105-18.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318(5858):1931-4.

- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. (2008) Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7(11):1545-9.
- Vaucheret H. (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* 13(7):350-8. Review.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303(5658):672-6.
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297(5588):1833-7.
- Wang B**, Yanez A, Novina CD. (2008 a) MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(14):5343-8.
- Wang Y, Sheng G, Juranek S, Tuschl T, Patel DJ. (2008 b) Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* 456(7219):209-13.
- Wang J, Saxe JP, Tanaka T, Chuma S, Lin H. (2009 a) Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. *Curr Biol.* 19(8):640-4.
- Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E. (2009 b) Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol.* 16(11):1148-53.
- Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS, Tuschl T, Patel DJ. (2009 c) Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* 461(7265):754-61.
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H. (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453(7194):539-43.
- Weinmann L, Höck J, Ivancevic T, Ohrt T, Mütze J, Schwillle P, Kremmer E, Benes V, Urlaub H, Meister G. (2009) Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* 136(3):496-507.
- Weitzer S, Martinez J. (2007) The human RNA kinase hC1p1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature* 447(7141):222-6.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(11):4034-9.
- Wu Q, Ma Q, Shehadeh LA, Wilson A, Xia L, Yu H, Webster KA. (2010) Expression of the Argonaute protein PiwiL2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 396(4):915-20.
- Yang Z**, Jakymiw A, Wood MR, Eystathioy T, Rubin RL, Fritzler MJ, Chan EK. (2004) GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci.* 117(Pt 23):5567-78.

Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, Papapetrou EP, Sadelain M, O'Carroll D, Lai EC. (2010) Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis.

Proc Natl Acad Sci USA 107(34):15163-8.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA.

Science 304(5670):594-6.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev. 17(24):3011-6.

Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC. (2006) Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. Cell 127(4):747-57.

Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, Tomari Y. (2010) ATP-dependent human RISC assembly pathways. Nat Struct Mol Biol. 17(1):17-23.

Yuan YR, Pei Y, Ma JB, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, Chen HY, Dauter Z, Tuschl T, Patel DJ. (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage.

Mol Cell. 19(3):405-19.

**Zdanowicz** A, Thermann R, Kowalska J, Jemielity J, Duncan K, Preiss T, Darzynkiewicz E, Hentze MW. (2009) *Drosophila* miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. Mol Cell 35(6):881-8.

Zekri L, Huntzinger E, Heimstädt S, Izaurralde E. (2009) The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. Mol Cell Biol. 29(23):6220-31.

Zeng Y, Sankala H, Zhang X, Graves PR. (2008) Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. Biochem J. 413(3):429-36.

Zhou X, Guo H, Chen K, Cheng H, Zhou R. (2010) Identification, chromosomal mapping and conserved synteny of porcine Argonaute family of genes. Genetica. 2010 Jul;138(7):805-12.

Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, Filipowicz W. (2009) Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression.

RNA 15(5):781-93.

Zou C, Zhang Z, Wu S, Osterman JC. (1998) Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein. Gene 211(2):187-94.

## 8. Danksagung

Mein großer Dank geht an Gunter, heute Prof. Dr. Gunter Meister! Sein unglaublicher Ideenreichtum und seine beeindruckende Fähigkeit, finanzielle Mittel zur Realisierung diverser Forschungsvorhaben zur Verfügung stellen zu können, sowie seine Veranlagung, Doktoranden eine ausgesprochen große Freiheit in der Projektgestaltung zu gewähren, ihnen den Rücken freizuhalten, sie existenziell abzusichern und so eine kreative Atmosphäre ohne Leistungsdruck zu schaffen, verdienen besondere Hochachtung! Auch ist es seiner Einsatzbereitschaft geschuldet, dass ich meinen Namen heute in PubMed wieder finde.

Gunter, vielen Dank für alles!

Prof. Ralf-Peter Jansen und Prof. Klaus Förstemann möchte ich ganz herzlich für die zusätzliche Arbeit, Konzentration und allen damit verbundenen Unannehmlichkeiten danken, die sie sich mit der Betreuung meiner Doktorarbeit aufgeladen haben. Prof. Jansen, der diverse Seminare über sich ergehen lassen musste und Prof. Förstemann, der sich nach dem Umzug von Prof. Jansen nach Tübingen bereit erklärt hat, die Betreuung meiner Arbeit an seiner statt zu übernehmen - gut ein halbes Jahr wurde er in Habachtstellung gehalten, weil dieses Schriftstück nicht fertig werden wollte und durfte sie zur „Strafe“ auch noch pünktlich zur Weihnachtszeit durchwälzen - allen beiden: Vielen Dank!

Dr. Roman Körner, René Lenobel, Dr. Henning Urlaub, He-Hsuan Hsiao und der Abteilung Matthias Mann vom MPIB möchte ich für verschiedene massenspektrometrische Analysen im Rahmen des Ago-Phosphorylierungsprojektes danken und dem Massenspektrometrie-Service der Abteilung Oesterhelt für die Analyse der  $\alpha$ -Ago2-Immunopräzipitate.

Weiterhin wäre die Bearbeitung des Ago-Phosphorylierungsprojektes ohne den Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper, die Lyn- und Abl-Mutanten und vor allem die Kooperationsbereitschaft der Doktoranden von Prof. Axel Ullrich nicht denkbar gewesen. Herzlichen Dank!

Diese Arbeit würde zudem nicht existieren, wenn nicht Dr. Ralf Zenke kompetent, unermüdlich und stets mit motivierender Freundlichkeit und Geduld bereit gewesen wäre, mir auch zum zig-sten Mal den Umgang mit der Software des konfokalen Fluoreszenzmikroskopes zu erklären! Ebenso war sich Dr. Bernd Haas nie zu schade, die nachrückende Wissenschaftlergeneration an seinem gesammelten Erfahrungsschatz teilhaben zu lassen und hat uns stets mit qualitativ hochwertigen siRNAs unter Berücksichtigung diverser Sonderwünsche versorgt.

Olaf Stemmann danke ich für die Bereitstellung von cDNA und Plasmiden.

Eine große Rolle hat auch der ewig hilfsbereite und stets für neue, wissenschaftliche Themenfelder offene Dr. Stefan Hannus gespielt. Seine Geduld, das stets offene Ohr für diverse Probleme und natürlich das Korrekturlesen dieser Arbeit (inklusive Material und Methoden!) können nicht überbewertet werden. Herzlichen Dank dafür, Stefan, und für alles andere auch!

Prof. Elmar Wahle, Dr. Uwe Kühn und Gudrun Scholz gilt mein ganz großer Dank für eine wirklich gute Ausbildung in der RNA-Protein-Biochemie, ohne die ich heute sicherlich nicht hier wäre! Vielen Dank auch meinen Eltern für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Christian Pohl, Massimo, Marian, Kenji, Kempe, Michaela, Mathias, Sabine und allen alten und neuen Laborkollegen vielen Dank für Rat und Tat in beruflicher und privater Hinsicht!

Wie üblich das Beste zum Schluss: *Nero & Associates* – meinem Münchner Heim. Ohne euch hätte ich mich nie über dieses halbe Jahrzehnt München und Promotion halten können. Ihr wisst, wer ihr seid und um eure Bedeutung für mich. DANKE....!

## 9. **L**EBENS LAUF

### DATEN ZUR PERSON

---

Name	Sabine Rüdel
Geburtsdatum	09.08.1980
Geburtsort	Berlin, Deutschland
Staatsangehörigkeit	deutsch

### SCHULISCHE BILDUNG/STUDIUM

---

10/2000 - 10/2005	Biochemiestudium, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Diplom (Note: 1,0)
1993 – 07/2000	Hochschulreife, Rheingau-Oberschule (Gymnasium), Berlin Abitur (Note: 1,2)

### WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

---

09/2010 – heute	wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Gunter Meister Universität Regensburg, Lehrstuhl für Biochemie I, Regensburg, Deutschland <i>Eigenschaften, Funktion und Regulation von Argonaute-Proteinen</i>
12/2005 – 08/2010	Doktorandin bei Prof. Gunter Meister Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, Deutschland <i>Regulation der Genexpression durch kleine, nicht-kodierende RNAs</i>
11/2004 – 09/2005	Diplomandin bei Prof. Elmar Wahle Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland <i>Längenkontrolle der Polyadenylierung</i>

### VERÖFFENTLICHUNGEN

---

2010	<b>Rüdel S.</b> , Wang Y., Lenobel R., Körner R., Hsiao H., Urlaub H., Patel D., Meister, G. „Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding“ <i>Nucleic Acids Research</i> , 2010 Nov 10. [Epub ahead of print]
------	---

- 2009 Kühn U., Gündel M., Knoth A., Kerwitz Y., **Rüdel S.**, Wahle E.  
Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein  
regulating the interaction between poly(A) polymerase and the  
cleavage and polyadenylation specificity factor.  
*Journal of Biological Chemistry*, 284(34):22803-14
- 2008 **Rüdel S.**, Meister G.  
“Phosphorylation of Argonaute proteins: regulating gene regulators”  
*Biochemical Journal*, 413(3)
- 2008 **Rüdel S.**, Flatley A, Weinmann L, Kremmer E, Meister G.  
„A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal  
antibody“  
*RNA*, 14(6):1244-53
- 2007 Höck J., Weinmann L., Ender C., **Rüdel S.**, Kremmer E., Raabe M.,  
Urlaub H., Meister G.  
„Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-  
protein complexes in human cells“  
*EMBO Reports*, 8(11):1052-60
- 2007 **Rüdel S.**, Meister G.  
„Von der Grundlagenforschung zum Medikament“  
*BIOspektrum*, Sonderheft zur Biotechnica 2007, 13. Jahrgang

#### TEILNAHME AN WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNGEN

---

- 2010 Treffen europäischer RNA-Forscher in Seillac, Frankreich  
Vortragstitel *„Phosphorylation of Human Argonaute Proteins Affects  
Small RNA Binding“*
- 2009 Konferenz der RNA Society in Madison, Wisconsin, USA  
Vortragstitel *„Post-translational Modifications and their Impact on the  
Activity of Human Argonaute Protein“*
- 2008 Treffen der RNA-Forschergruppe in München, Deutschland  
Vortragstitel *„Purification of mRNAs regulated by let-7a: Introducing  
a new Ago2 antibody as powerful tool“*

#### WEITERE TÄTIGKEITEN

---

- 05/2008 – 05/2009 Mitorganisation des Münchner Doktorandensymposiums „interact“,  
Leitung der Buchhaltung, Administration
- 2007 und 2008 Betreuung von Bachelor-Studenten

- 09/2003 – 10/2003    Praktikum bei Prof. C. Wasternack,  
Leibniz-Inst. für Pflanzenbiochemie  
Vorbereitende Arbeiten zur Charakterisierung von *A. thaliana*- und  
Tomatenmutanten mit Defekten im Jasmonsäurestoffwechsel
- 08/2003 – 09/2003    Praktikum bei Prof. Ulbrich-Hofmann, Inst. für Biotechnologie (MLU)  
Überexpression und Reinigung rekombinanter Phospholipase A2; das  
von der betreuenden Doktorandin erstellte Protokoll wurde patentiert.
- 07/2003 – 08/2003    Praktikum bei Dr. Gutensohn, Inst. Für Pflanzenphysiologie (MLU)  
Generierung von Klonierungs- und Expressionskonstrukten für das  
Studium von Proteinimportmechanismen bei Plastiden
- 09/2001                Praktikum bei Dr. Bromme, Inst. für Pathophysiologie (MLU)  
Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von Alloxan mit zellulären  
Reduktionsmitteln
- 07/2000 - 10/2000    Praktikum in der klinischen Pharmakologie, Probenpräparation, -  
organisation und -versand, Verteilung der Befunde externer Labors im  
Haus; Parexel, Berlin

### **SONSTIGE ARBEITSERFAHRUNG**

---

- 10/1998 – 12/1999    Aushilfe im Supermarkt, überwiegend Kasse
- 06/1999 – 09/1999    Mithilfe bei der Organisation des Berlin Marathon durch den SportClub  
Charlottenburg (SCC), EDV-basierte Teilnehmererfassung und –  
verwaltung
- 01/1997                Berufspraktikum bei Weichardt Brot, Konditorei, Chocolaterie und  
Verkauf

### **SPRACHKENNTNISSE**

---

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (B2\*, selbstständige Sprachverwendung) & Fachkurs Biochemie Englisch am  
Sprachenzentrum der MLU; „gut“

Französisch (A2\*, elementare Sprachverwendung)

\* gemäß des „Gemeinsamen Europäischen Referenzrahmens für Sprachen  
(GER; auch GERS)“