

Interaktion von Nop5 mit dem Exosom und natürliche Substrate des Exosoms von *Sulfolobus solfataricus*

Inaugural Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Angelika Susann Gauernack

geboren am 25.12.1989 in Meißen, Deutschland

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, Dezember 2018

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, in der Zeit vom März 2014 bis Dezember 2018 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug angefertigt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Klug

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Kai Thormann

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Publikationen im Rahmen der Dissertation

Gauernack AS, Lassek C, Hou L, Dzieciolowski J, Evguenieva-Hackenberg E, Klug G., Nop5 interacts with the archaeal RNA exosome. FEBS Lett., 2017. 591(24):4039-4048.

Evguenieva-Hackenberg E, Gauernack AS, Klug G., The Archaeal Exosome: Degradation and Tailing at the 3'-End of RNA. RNA Metabolism and Gene Expression in Archaea (Springer Verlag), 2017. pp 115-128.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Datum

Susann Gauernack

1 Einleitung.....	11
1.1 Archaea.....	11
1.1.1 <i>Sulfolobus solfataricus</i>	12
1.2 RNA-Prozessierung und –Degradation in den drei Domänen des Lebens.....	13
1.2.1 Bakterielle RNA-Prozessierung und Degradation.....	14
1.2.1.1 Endo- und Exoribonukleasen von Bakterien.....	14
1.2.1.2 Das Degradosom der Bakterien.....	16
1.2.2 RNA Prozessierung und Degradation in Eukaryoten.....	18
1.2.2.1 Das eukaryotische Exosom.....	20
1.2.3 RNA Prozessierung und Degradation in Archaea.....	21
1.2.3.1 Das archaeale Exosom.....	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Verbrauchsmaterialien/Geräte.....	31
2.1.2 Chemikalien.....	32
2.1.3 Antibiotika.....	34
2.1.4 Bakterien- und Archaea-Stämme.....	34
2.1.5 Plasmide.....	35
2.1.6 Oligonukleotide.....	38
2.1.6.1 Oligonukleotide für Klonierungen.....	38
2.1.6.2 Oligonukleotide für <i>in vitro</i> Transkripte.....	44
2.1.6.3 Oligonukleotide für RT-PCR.....	45
2.1.6.4 Sonden für Northern-Blot.....	46
2.1.7 Radioaktive Nukleotide.....	47
2.1.8 Kits.....	47
2.1.9 Enzyme.....	47
2.1.10 Größenstandards.....	48
2.1.11 Antikörper.....	48
2.1.12 Medium.....	48
2.1.13 Software.....	49
2.1.14 Puffer und Lösungen.....	49
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	50

2.2.1 Messung der optischen Dichte	50
2.2.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	50
2.2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> auf Nährplatten.....	50
2.2.2.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> in Flüssigmedium	51
2.2.3 Glycerinkulturen <i>E. coli</i>	51
2.2.4 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	51
2.2.5 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i>	52
2.2.6 Transformation mittels Hitzeschock von <i>E. coli</i>	52
2.2.7 Transformation mittels Elektroporation von <i>E. coli</i>	53
2.2.8 Flüssigkulturen von <i>Sulfolobus solfataricus</i>	53
2.2.9 Glycerinkulturen <i>S. solfataricus</i>	54
2.3 Molekularbiologische Methoden	54
2.3.1 Elektrophorese – Techniken.....	54
2.3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	54
2.3.1.2 Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese von DNA.....	55
2.3.1.3 Gelelektrophorese von RNA.....	55
2.3.1.4 SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) von Proteinen	56
2.3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen über Kit.....	56
2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	57
2.3.4 Isolation chromosomaler DNA von <i>S. solfataricus</i>	57
2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> - PCR)	58
2.3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Fusion von Einzelfragmenten (PCR)	58
2.3.5.2 Kolonie-PCR	60
2.3.6 Klonierung mittels Restriktionsverdau und Ligation	61
2.3.6.1 Restriktionsverdau	61
2.3.6.2 Ligation	62
2.3.7 Klonierung mittels Gibson <i>Assembly</i>	62
2.3.8 pJET - Klonierungen	63
2.3.9 Plasmid-Minipräparation (alkalische Lyse) von <i>E. coli</i>	64
2.3.10 <i>Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Assay</i>	65
2.3.11 SDS-PAGE (<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>) von Proteinen .	66
2.3.12 Western-Blot	69
2.3.13 Färbemethoden von SDS-Gelen	70

2.3.13.1 Silberfärbung	70
2.3.13.2 Coomassie-Färbung	71
2.3.14 Kopplung von Antikörpern an A-Sepharose- <i>beads</i>	72
2.3.15 Dichtegradientenzentrifugation mittels Glycerolgradient	73
2.3.16 Dialyse – Umpuffern von Proteinen	73
2.3.17 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	73
2.3.17.1 NanoDrop	73
2.3.17.2. BSA – Konzentrationsvergleichsgele	74
2.3.18 Rekonstitution von Proteinkomplexen	75
2.3.18.1 Rekonstitution des hexameren Ringes ohne His ₆ - <i>tag</i>	75
2.3.18.2 Rekonstitutionen von exosomalen Komplexen.....	76
2.3.19 Co-Immunopräzipitation	76
2.3.20 Surface Plasmon Resonance (SPR) / Biacore.....	78
2.3.21 Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli</i>	79
2.3.21.1 Induktion von rekombinanten Proteinen / Proteinkomplexen aus <i>E. coli</i>	79
2.3.21.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen / Proteinkomplexen aus <i>E. coli</i>	80
2.3.22 His ₆ - <i>tag Pull down</i>	84
2.3.23 RNA <i>in vitro</i> Transkription	85
2.3.23.1 Annealing des T7-Promotors an ein DNA-Oligonukleotid.....	85
2.3.23.2 <i>in vitro</i> Transkription nicht-radioaktiv markierter RNA.....	86
2.3.23.3 <i>in vitro</i> Transkription radioaktiv markierter RNA.....	87
2.3.23.4 <i>in vitro</i> Transkription radioaktiv markierter RNA mittels Ambion Kit.....	88
2.3.23.5 Verdau der <i>template</i> -DNA nach <i>in vitro</i> Transkription	88
2.3.23.6 Beseitigung von überschüssigen freien radioaktiven Nukleotiden.....	88
2.3.23.7 Analyse der radioaktiv markierten <i>in vitro</i> Transkripte	89
2.3.23.8 Analyse der nicht radioaktiv markierten <i>in vitro</i> Transkripte	89
2.3.24 Aufreinigung der RNA-Transkripte	89
2.3.24.1 Gelextraktion.....	90
2.3.24.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Fällung der RNA.....	90
2.3.25 Markierung von RNA am 5' Ende mittels [γ -P ³²]-ATP.....	91
2.3.26 Markierung von DNA-Sonden am 5' Ende mittels [γ -P ³²]-ATP.....	92
2.3.27 Polyadenylierungs- und Degradationsassays	92
2.3.28 Electro mobility shift assay (EMSA).....	96
2.3.29 RNA-Isolationsmethoden	98

2.3.29.1 Hot Phenol Extraktion von Gesamt-RNA aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	98
2.3.29.2 TRIzol Extraktion von Gesamt-RNA aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	99
2.3.29.3 DNase-Verdau	100
2.3.30 Behandlung von TRIzol verdauter RNA mit RNase R.....	101
2.3.30.1 Erste RNase R Behandlung	102
2.3.30.2 Zweite RNase R Behandlung.....	102
2.3.31 Nachweis zirkulärer RNA mittels RT-PCR über Agilent Kit	103
2.3.32 Northern Blot	105
2.3.33 iCLIP (individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation)	106
2.3.33.1 Crosslink	106
2.3.33.2 Herstellung des Zellextraktes	107
2.3.33.3 DNA und limitierter RNA Verdau.....	107
2.3.33.4 Co-Immunopräzipitation	108
2.3.33.5 <i>On-bead</i> PNK-treatment.....	108
2.3.33.6 NU-PAGE und Nitrozellulose-Übertragung	109
2.3.33.7 RNA-Extraktion und Prozessierung bis zur Sequenzierung	109
3 Ergebnisse.....	110
3.1 Untersuchungen zur Poly(A)-Präferenz des Exosoms von <i>Sulfolobus solfataricus</i>	110
3.1.1 Substitution einzelner Aminosäuren der S1-Domäne von Rrp4	110
3.1.2 Substitution der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4	112
3.1.2.1 Festlegung des Substitutionsbereiches der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4	112
3.1.2.2 Keine Interaktion von Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 mit dem hexameren Ring	113
3.1.2.3 Untersuchung der Aktivität des hexameren Ringes in Gegenwart von Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4.....	115
3.2 Nop5 interagiert mit dem archaealen Rrp4-Exosom	118
3.2.1 Die Interaktion von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom ist spezifisch und wird nicht durch His ₆ -tags des hexameren Ringes vermittelt.....	118
3.2.2 Nop5 interagiert sehr wahrscheinlich über seine Coiled-Coil Domäne mit Rrp4	120
3.2.3 Untersuchung der Interaktion von Nop5 mit Rrp4 mittels <i>in vitro</i> Co-Immunopräzipitation	122
3.2.4 Untersuchung der Interaktion von Nop5 mit Rrp4 über His ₆ -tag pull down	123
3.2.5 Nachweis der Interaktion zwischen Rrp4 und Nop5 mittels Biacore/SPR	125
3.2.6 Untersuchungen der Interaktion von MBP-fusionierten Einzeldomänen von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom mittels <i>in vitro</i> Co-Immunopräzipitation	126
3.2.7 Untersuchungen von Nop5-His ₆ mittels Größenausschlusschromatographie.....	129

3.2.8 Nop5 steigert die Polyadenylierung, aber nicht die Degradation von RNA durch das Rrp4-Exosom	132
3.2.8.1 Untersuchungen zur Polyadenylierung mittels Poly(A)-RNA als Substrat	132
3.2.8.2 Untersuchungen zur Degradation mittels Poly(A)-RNA als Substrat	133
3.2.8.3 Untersuchungen zur Bindung von RNA durch Nop5 mittels Poly(A)-RNA und 16S rRNA als Substrat	134
3.2.8.4 Untersuchungen zur Polyadenylierung mittels 121 nt <i>nuoH</i> Transkript als Substrat ..	135
3.2.8.5 Untersuchungen zur Degradation mittels 121 nt <i>nuoH</i> Transkript als Substrat	136
3.3 Untersuchungen bezüglich der Interaktion von EF1 α und SSO_RS01100 mit dem Exosom	137
3.4 Untersuchungen des <i>in vivo</i> rekonstituierten DnaG-Csl4-Exosoms	138
3.4.1 Rekonstitution des DnaG-Csl4-Exosoms in <i>E. coli in vivo</i>	138
3.4.1.1 Klonierungsschema	138
3.4.1.2 Isolation des Csl4-Exosoms über Heparinsäule und Gelfiltration	139
3.4.1.2 Isolation des DnaG-Csl4-Exosoms über Heparinsäule und Gelfiltration	141
3.4.2 Untersuchung des DnaG-Csl4-Exosoms mittels Glycerolgradienten	144
3.4.3 Untersuchungen bezüglich der Aktivität des DnaG-Csl4-Exosoms mittels Degradationsassays	145
3.4.3.1 Die <i>in vivo</i> in <i>E. coli</i> rekonstituierten Csl4- und DnaG-Csl4-Exosome zeigen verringerte Aktivität	145
3.4.3.2 BSA steigert die Aktivität des Csl4-Exosoms und DnaG-Csl4-Exosoms	146
3.4.4 Untersuchungen des Csl4-Exosoms und DnaG-Csl4-Exosoms mittels Elektronenmikroskopie	148
3.4.4.1 Untersuchungen des DnaG-Csl4-Exosoms mittels Elektronenmikroskopie nach Zugabe von DDM.....	149
3.5 iCLIP	151
3.5.1 Experimente zur Vorbereitung und Optimierung des iCLIP	151
3.5.1.1 Bestimmung der NaCl-Konzentration des Waschpuffers für die Co-Immunopräzipitation.....	151
3.5.1.2 Effektive Vernetzung zwischen RNA und Exosom mittels UV-Crosslink	152
3.5.2 Wachstumskurve <i>S. solfataricus</i> und Experimentverlauf.....	154
3.5.3 Sequenzierungsdaten - an das Genom von <i>S. solfataricus</i> kartierte <i>reads</i>	157
3.5.4 Nicht kartierte <i>reads</i> weisen einen hohen Adenin-Anteil auf.....	158
3.5.5 Das Exosom bindet zirkuläre RNA	159
3.5.6 Das Exosom bindet spezifisch RNA.....	168
3.5.6.1 Northern Blots gegen die <i>antisense</i> tRNA ^{Ser}	177
4 Diskussion	179

4. 1 Untersuchungen bezüglich der Poly(A)-Präferenz des Rrp4-Exosoms.....	179
4. 2 Untersuchungen bezüglich Nop5 im Kontext des archaealen Exosoms	183
4.2.1 Verifikation der Interaktion zwischen Nop5 mit dem Rrp4-Exosom.....	183
4.2.2 Funktion von Nop5 im Kontext des Exosoms	185
4.2.3 Größenausschlusschromatographie von Nop5	187
4.3 Untersuchungen bezüglich der Interaktion von EF1 α und SSO_RS01100 mit dem Exosom	187
4.4 Untersuchungen des <i>in vivo</i> rekonstituierten DnaG-Csl4-Exosoms.....	188
4.5 iCLIP - <i>individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation</i>	191
5 Zusammenfassung / Summary	196
6 Abkürzungsverzeichnis	200
7 Literaturverzeichnis	202
8 Anhang.....	216
Danksagung	225

1 Einleitung

1.1 Archaea

Die Existenz der Archaea wurde 1977 erstmalig durch Carl Woese beschrieben [1]: Bis zu diesem Zeitpunkt wurde nur zwischen Eukaryoten und Prokaryoten unterschieden. Jedoch konnte nun durch die phylogenetischen Analyse der 16S rRNA, zwischen Bakterien und Archaeabakterien differenziert werden. Trotz dessen wurden die Archaeabakterien, als dritte Domäne des Lebens, zunächst nur schwer in der wissenschaftlichen Gemeinschaft akzeptiert und stark kritisiert. Der Nobelpreisträger Salvador Luria war einer der Kritiker [2]. Erst 1990 wurden die Archaea, unter ihrem verkürzten Namen, aufgrund ihrer Einzigartigkeit, als selbstständige Gruppe in die Taxonomie aufgenommen. Seitdem gibt es drei Domänen des Lebens: Bakterien, Eukaryoten und Archaea [3].

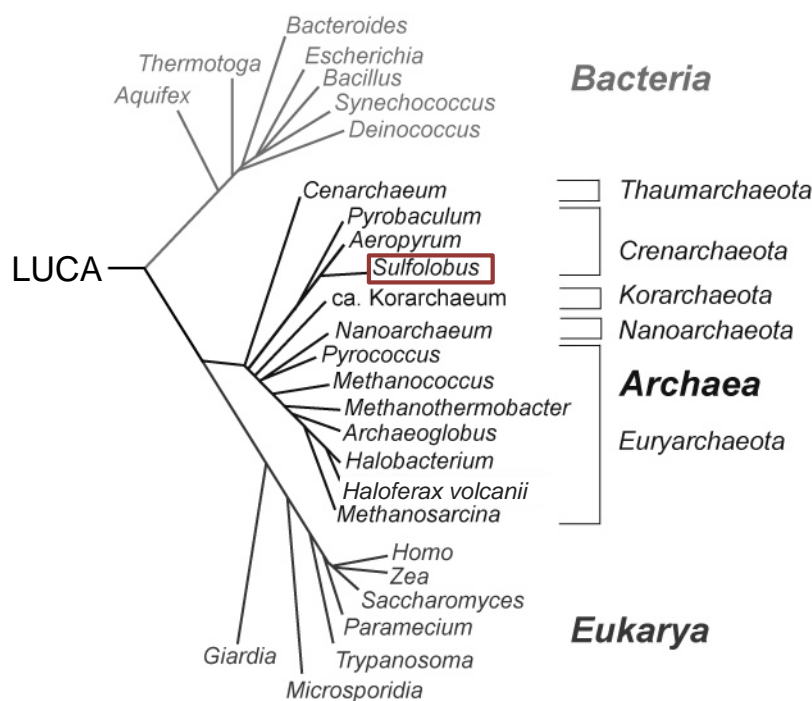


Abbildung 1. Phylogenetischer Stammbaum, in welchem die drei Domänen des Lebens, Bakterien, Archaea sowie Eukaryoten, mit ihren jeweiligen Untergruppen, dargestellt sind. Hervorgehoben ist die Gattung von *Sulfolobus solfataricus*, auf welchen sich die hier vorliegende Arbeit bezieht. LUCA, Last Universal Common Ancestor. Modifiziert nach [4].

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht sind die Archaea näher mit der Domäne der Eukaryoten verwandt als mit der Domäne der Bakterien. Morphologisch betrachtet ähneln sie jedoch den Bakterien: Beide Domänen, sowohl Bakterien als auch Archaea, besitzen keinen Zellkern und tragen Ribosomen vom

Typ 70S. Zudem sind beide Domänen ähnlich in Bezug auf Zellgröße und Art der Zellteilung [5]. Betrachtet man allerdings die physiologischen Eigenschaften der Archaea, insbesondere bezogen auf DNA-Replikation und -Reparatur, Transkriptions- sowie Translationsmechanismen sind Archaea den Eukaryoten ähnlich. Untersuchungen an Archaea führten dazu, dass ein Großteil des Verständnisses von eukaryotischen Proteinen, wie deren Struktur und Funktionsweise, durch archaeale Proteine gewonnen werden konnte, wie beispielsweise der RNA-Polymerase II oder von Rad51 der Eukaryoten [6-8]. Archaea besitzen jedoch auch einzigartige Eigenschaften: In ihrer Membran ist Glycerol mit Isoprenoiden über Ether verbunden, im Gegensatz zu Bakterien, welche Esterbindungen besitzen [9]. Zellwände sind bei Archaea aus Pseudomurein oder *Surface-Layern*, einer Zellwand aus einzelnen glykosylierten Proteinen, aufgebaut, wohingegen die bakterielle Zellwand aus Peptidoglycan besteht [10]. Archaea besitzen einzigartige Modifikationen ihrer tRNA wie Archaeosin oder Agmatidine; Gene für tRNAs können geteilt oder permutiert vorliegen [11]. Zudem gibt es unter den Archaea einige Arten, welche Methanogenese, d.h. die Reduktion von Kohlendioxid zu Methan, betreiben können [12].

Archaea sind zwar dafür bekannt in extremen Habitaten zu leben (saure oder alkalische heiße Quellen, marine Solen), machen jedoch insgesamt 20% der weltweiten Biomasse aus [13, 14]. Sie sind ihrerseits in weitere Abteilungen unterteilt: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Nanoarchaeota, Korarchaeota sowie Thaumarchaeota [15], wobei die beiden Hauptgruppen von den Euryarchaeota und den Crenarchaeota gebildet werden.

1.1.1 *Sulfolobus solfataricus*

Die hier vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit *Sulfolobus solfataricus* als Modellorganismus, welcher der Abteilung der Crenarchaeota zugeordnet ist. *S. solfataricus* wurde erstmals aus den heißen Quellen bei Solfatara, Italien, isoliert, wodurch er seinen Namen erlangte. Generell wächst der thermo- und acidophile Organismus in heißen vulkanischen Gebieten, bei Temperaturen um 80°C (60 – 92°C) und pH Werten zwischen 2 und 4 [16, 17]. Der pH Wert des Zytoplasmas liegt dagegen bei 5.8 - 6.5, und wird durch atmungsbedingte Protonenextrusion aufrecht erhalten [18, 19]. *S. solfataricus* ist strikt aerob und in der Lage Schwefel zur Energiegewinnung zu nutzen, wobei heterotrophes Wachstum ohne Schwefel, aus einer Vielzahl von Kohlenstoffquellen (Trypton, verschiedenen Zuckern, Aminosäuren) ebenfalls erfolgen kann [16, 20]. Das Genom, ein zirkuläres Chromosom mit 2,99 Mio bp, wurde 2001 vollständig sequenziert und umfasst ca. 3000 Gene [21]. *S. solfataricus* ist Modellorganismus sowohl für DNA-Replikations- und Reparaturmechanismen als

auch für das eukaryotische Exosom (siehe Kapitel 1.2.2.1). Beim Menschen führen Defekte in der Stabilitätsregulierung von mRNA bzw. dem Exosom zu schweren Erkrankungen wie chronischen Entzündungen, Krebs- und Kardiovaskulären Erkrankungen [22, 23].

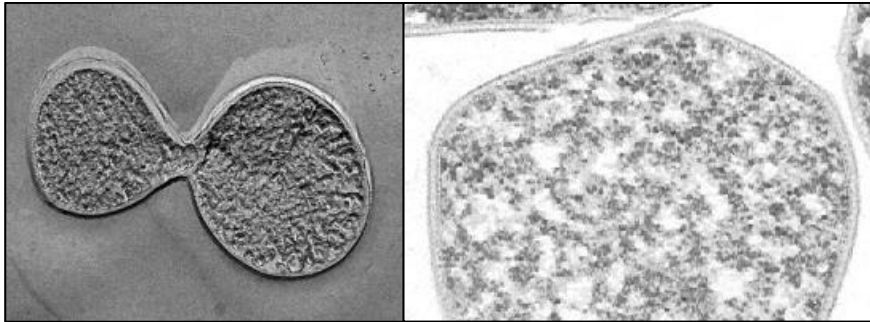


Abbildung 2. Mikroskopische Aufnahmen von *S. solfataricus*. ([24], D. Janckovik und W. Zillig, 1980)

1.2 RNA-Prozessierung und –Degradation in den drei Domänen des Lebens

RNA-Prozessierung und -Degradation sind essentielle Prozesse im Leben, welche strenger Kontrolle unterliegen und in jeder Domäne des Lebens zu finden sind. Fast jede RNA (ribosomale RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA), small RNA (sRNA), small nuclear RNA (snRNA)) wird nach ihrer Transkription prozessiert, um sie in ihre reife und funktionelle Form zu überführen. Neben Faltungen und Modifikationen der RNA oder der Assoziation von RNA mit Proteinen spielt dabei auch der gezielte Abbau der RNA eine wichtige Rolle. Einerseits ist die gezielte Degradation von RNA Teil von Prozessierungsschritten während der Reifung von RNA, andererseits müssen defekte RNAs schnellstmöglich abgebaut werden. Auch die Stabilität bzw. die zeitliche Verfügbarkeit für Translationsprozesse wird über den gezielten Abbau von RNA beeinflusst. Enzyme, welche den Vorgang des Abbaus von RNA übernehmen sind meist Endo- und Exoribonukleasen. Während Endoribonukleasen innerhalb des RNA-Moleküls schneiden, spalten Exoribonukleasen vom 3' Ende der RNA (3'-5' Exoribonukleasen) oder vom 5' Ende der RNA her (5'-3' Exoribonukleasen) her [25, 26].

1.2.1 Bakterielle RNA-Prozessierung und Degradation

rRNA und tRNA machen ca. 95% der Gesamt-RNA der Zelle aus, die mRNA hingegen nur ca. 5%. Die Lang- oder Kurzlebigkeit einer RNA beeinflusst dabei stark den Level der Genexpression. Faktoren, welche die Stabilität von RNA beeinflussen sind z.B. deren Assoziation mit Proteinen sowie deren Strukturiertheit. Vor allem rRNA und tRNA zeichnen sich durch starke Sekundärstrukturen und somit stärkere Stabilität aus. mRNAs dagegen sind vor allem dann vor RNasen geschützt, wenn sie von Proteinen der Translationsmaschinerie gebunden sind. Auch das Triphosphat am 5' Ende oder Haarnadelstrukturen am 3' Ende bzw. 5' UTR (*untranslated region*) der mRNA haben eine stabilisierende Wirkung [27, 28]. Auf den Abbau von RNAs wirken sich hingegen Poly(A)-*tails* oder heteropolymerische A-reiche *tails* am 3' Ende der RNA positiv aus. Poly(A)-*tails* werden vor allem durch die Poly(A)-Polymerase und heteropolymerische A-reiche *tails* durch die PNPase synthetisiert [29-31].

Auch für die RNA-Prozessierung spielen RNasen eine wichtige Rolle. So werden rRNAs aus einem großen 30S-Primärtranskript endonukleolytisch gespalten (RNase III) und im Anschluss zu ihrer reifen (23S-, 16S- und 5S-rRNA) Form prozessiert. Auch tRNAs werden zunächst aus Primärtranskripten endonukleolytisch herausgeschnitten. Für die Reifung des 5' Endes der tRNA ist schließlich die RNase P verantwortlich [25].

1.2.1.1 Endo- und Exoribonukleasen von Bakterien

E. coli, der Modellorganismus der gram negativen Bakterien, besitzt verschiedene Endoribonukleasen (RNase E, RNase G und RNase III) sowie 3' – 5' Exoribonukleasen (PNPase, RNase II, RNase R, RNase D, RNase BN, RNase T, RNase PH, Oligoribonuklease). Eine in 5' – 3' arbeitende Exoribonuklease fehlt jedoch. Die RNA wird hauptsächlich exoribonukleolytisch abgebaut, behindert werden die 3' – 5' Exoribonukleasen dabei durch die meist vorhandenen Haarnadelstrukturen oder dem Triphosphat am 3' Ende der mRNA, welche der Stabilisierung dieser dienen. In Folge dessen beginnt bei *E. coli* die Degradation der RNA meist durch endoribonukleolytische Schnitte, welche ein zugängliches 3' Ende für den exoribonukleolytischen Angriff schaffen [26, 32]. Die RNase E ist dabei für die initialen endonukleolytischen Schnitte beim Abbau einer mRNA in *E. coli* verantwortlich [33, 34] und schneidet bevorzugt an AU-reichen, einzelsträngigen RNA-Sequenzen, ohne eine direkte Sequenzspezifität zu besitzen [35]. Die Bindung der RNase E an das 5' Ende einer mRNA bzw. die katalytische Aktivität der RNase E wird dabei durch nicht strukturierte oder nicht durch Ribosomen

geschützte 5' UTRs der mRNA ermöglicht [27, 36-38]. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Triphosphat am 5' Ende einer bakteriellen mRNA die Bindung der RNase E behindert, und erst durch Abspaltung der γ - und β -Phosphatreste die endonukleolytische Spaltung der mRNA durch die RNase E initialisiert wird [39]. Bisher war man davon ausgegangen, dass die Pyrophosphohydrolase RppH die Abspaltung der γ - und β -Phosphatreste übernimmt, neue Ergebnisse zeigen, dass ein noch unbekanntes Enzym das Triphosphat zu einem Diphosphat spaltet. Das Diphosphat ist im Anschluss das bevorzugte Substrat von RppH [40]. Nach der Abspaltung des Triphosphates ist es der RNase E möglich am monophosphorylierten 5' Ende einer mRNA zu binden und *downstream* die mRNA endonukleolytisch zu spalten. In Folge dessen werden neue monophosphatierte 5' mRNA Enden frei, welche wiederum Substrat der RNase E sind, wodurch die mRNA seriell abgebaut wird [34]. Die RNase E ist dabei ein essentielles Enzym in *E. coli* und Teil des RNA-degradierenden Multienzymkomplexes Degradosom [41]. Die RNase G ist das Paralog der RNase E, welche allerdings nicht essentiell ist, aber kurze 5' monophosphatierte einzelsträngige RNA-Substrate mit ähnlicher Sequenzspezifität zur RNase E schneidet [42]. Der weitere Abbau der entstandenen intermediären RNA-Fragmente erfolgt durch 3' - 5' Exoribonukleasen (RNase R, RNase II sowie die PNPase), welche die RNA bis auf zwei bis fünf Nukleotide prozessiv, dh. ohne eine weitere Unterbrechung, spalten. Während die RNase R eine intrinsische Helikaseaktivität besitzt und Haarnadelstrukturen dadurch teilweise auflösen kann, benötigt die PNPase dafür die Hilfe einer Helikase, RhIB in *E. coli* [43, 44]. Im Gegensatz dazu, ist die RNase II im Fortschreiten des Abbaus strukturierter RNA blockiert, kann aber effizient poly(A) tails am 3' Ende der RNA, *downstream* des Terminators, abbauen. Somit ist die RNase II in der Lage, RNA, welche noch ihre ursprüngliche Länge aufweist, vor Abbau zu schützen [45]. Die 3' - 5' Oligoribonuklease Orn baut schließlich die verbliebenen zwei bis fünf Nukleotide ab [46].

In *Bacillus subtilis*, dem Modellorganismus der Gram positiven Bakterien, ist die Endonuklease Y für die initialen Schnitte der mRNA hauptverantwortlich [47]. Die RNase E ist nicht im Genom codiert. Ein Abbau der mRNA ist sowohl in 3' - 5' Richtung (durch PNPase, RNase R) als auch in 5' - 3' Richtung (durch RNase J1) möglich [48]. Die, in *B. subtilis* codierte, RNase J1 war die erste bekannte bakterielle 5' - 3' Exoribonuklease [49], ihr Paralog, die RNase J2, ist im Gegensatz zu ihr jedoch nicht essentiell und nur gering aktiv [49, 50]. Zusätzlich zu ihrer exoribonukleolytischen Aktivität besitzen beide RNasen endonukleolytische Aktivität, sodass der initiale endonukleolytische Schnitt der mRNA auch durch die RNase J1, erfolgen kann. Die Sequenzspezifität ähnelt dabei der RNase E von *E. coli* [51]. Daneben ist ein Abbau der mRNA auch durch initiale exoribonukleolytische Aktivität in 5' - 3' Richtung, vorzugsweise von 5'-monophosphatierten Substraten her, möglich [49, 52]. Die Spaltung des Triphosphates erfolgt dabei durch die Pyrophosphatase RppH [52]. Die RNasen J1 und J2

formen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen Komplex, RNase J, wodurch sich sowohl Schnittstellen als auch Effizienz der Schnitte ändern können [50]. Resultierende Oligonukleotide des mRNA-Abbaus werden von nicht essentiellen Oligoribonukleasen vorgenommen. Die spezifische Oligoribonuklease Orn aus *E. coli* ist nicht im Genom von *B. subtilis* codiert [53].

Des Weiteren sind RNasen wichtig, um reife RNA-Spezies hervorzubringen. RNase T beispielsweise sorgt einerseits für das Trimming am 3' Ende der 5S rRNA [54] und andererseits für das Entfernen von zusätzlichen Nukleotiden nach der 3' CCA Sequenz der tRNA [55]. Ähnlich verantwortlich ist die RNase PH für die Prozessierung der tRNA: auch hier führt ein *rph* knock out zu vier bis sechs zusätzlichen Nukleotiden nach der 3' CCA-Sequenz von tRNAs [56]. Drei RNase PH Dimere sind zum Homohexamer angeordnet, wobei jede Untereinheit ein katalytisch aktives Zentrum, mit einer phosphorolytischen 3'-5' Exoribonukleaseaktivität, besitzt [57]. RNase PH Domänen sind bei anderen phosphorolytisch aktiven 3'-5' Exoribonukleasen wiederzufinden, speziell hervorzuheben dabei bei der PNPase sowie dem archaealen Exosom (siehe Kapitel 1.2.3.1). Auch wenn RNase T und RNase PH in Bezug auf die Reifung der tRNA die beiden wichtigsten Enzyme für die Verkürzung des reifen 3' Termini sind, sind weitere RNasen beteiligt: RNase D und RNase BN [55]. Des Weiteren scheinen RNase T und RNase PH die effektivsten 3'-5' Exoribonukleasen im Bezug zur 3' Verkürzung für kleine stabile RNAs in *E. coli* zu sein [58].

1.2.1.2 Das Degradosom der Bakterien

Das Degradosom in *E. coli* ist ein Multienzymkomplex bestehend aus der RNase E, der Polynukelotid Phosphorylase (PNPase), einer DEAD box RNA Helikase (RhIB) sowie der Enolase, einem glykolytischen Enzym [44, 59]. Es ist an der Degradation von mRNA beteiligt, RNase E speziell aber auch an der Reifung von rRNA sowie tRNA [60-62]. Die RNase E ist eine Endonuklease, welche im Degradosom aber auch eine Funktion als *Scaffold* Protein übernimmt. Über die lange, nicht-katalytische, C-terminale Domäne der RNase E werden die anderen Proteine des Komplexes assoziiert. Zusätzlich besitzt die CTD zwei RNA-Bindestellen [63]. Zudem liegen die RNase E und RhIB gebunden an der inneren zytoplasmatischen Membran vor (siehe Abbildung 3). Es konnte gezeigt werden, dass RNase E dabei auch in der Lage ist schnell an der Membran zu diffundieren und Foci zu bilden, wodurch transiente Degradationszentren entstehen [64, 65].

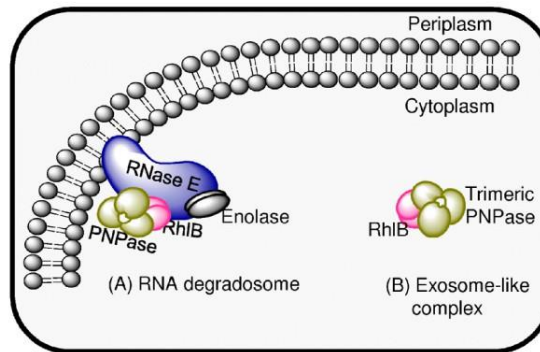


Abbildung 3. Schematische Illustration des **(A)** RNA-Degradosoms von *E. coli*, welches membranassoziiert vorliegt, und **(B)** im Zytoplasma vorliegenden PNPase Komplexes, welcher mit RhIB assoziiert vorliegen kann [66].

Die Bindung von RhIB an den C-Terminus der RNase E stimuliert dabei die ATP-abhängige Helikaseaktivität von RhIB, was zur Degradation strukturierter RNAs durch die PNPase führt, da strukturierte RNAs entwunden und dem aktiven Zentrum der PNPase zugänglich gemacht werden [44, 67-69]. Nur ssRNA kann durch den zentralen Kanal in das aktive Zentrum der PNPase eintreten [68]. RhIB kann zusammen mit der PNPase auch im Zytoplasma als Komplex vorliegen [69]. Die PNPase an sich, welche Teil des Degradosoms ist, ist einerseits eine 3' - 5' Exoribonuklease und somit, ebenso wie die RNase E, in der Lage RNA zu degradieren. Andererseits ist sie in der Lage heteropolymerische RNA-tails an das 3' Ende einer RNA zu synthetisieren [29]. Es wird vermutet, dass die heteropolymerischen tails, ähnlich den Poly(A)-tails (siehe Kapitel 1.2.1), die Degradation von RNA fördern, speziell von RNA mit stark strukturiertem 3' Ende [29, 70, 71]), da die tails am 3' Ende zu degradierender RNAs Ladeplattformen für die PNPase bilden [72]. Die Degradation der RNA erfolgt dabei in einer prozessiven phosphorolytischen Reaktion unter der Freisetzung von NDPs, die Synthese der RNA in der reversen Reaktion unter Freisetzung von P_i . Über Phosphat- und NDP-Level wird dabei die Richtung der Reaktion reguliert [73]. Strukturell ist die PNPase als Homotrimer aufgebaut, wobei jede Polypeptidkette zwei RNase PH-Domänen besitzt. Dabei sind die RNase PH-Domänen so organisiert, dass sie im Homotrimer eine hexamere Grundeinheit bilden welche einen zentralen Kanal umschließt. Der zentrale Kanal enthält das aktive Zentrum der PNPase. Am C-Terminus jeder Polypeptidkette liegt zudem noch je eine S1- (*ribosomal protein S1*) und KH- (*ribonucleoprotein K Homology*) Domäne, über welche die Bindung der RNA erfolgt. Die S1- und KH-Domänen der drei Polypeptidketten sind auf dem Hexamer als trimere Kappe arrangiert, sodass im Gesamten eine Struktur des Enzymkomplexes entsteht, welche dem archaealen Exosom ähnelt (siehe Abbildung 5) [68, 74]. Die Funktion der Enolase im Degradosom-Komplex ist weitestgehend noch ungeklärt, in der Zelle ist sie ein glykolytisches Enzym welches die reversible Reaktion von

2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat [75] katalysiert. Während metabolischen Stress scheint sie jedoch eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Stabilität von *ptsG* mRNA zu spielen, welche für den wichtigsten Glucose-Transporter der Zelle codiert: Deletionen der *Scaffold* Region der RNase E, über welche auch die Enolase mit dem Degradosom interagiert zeigen während metabolischen Stress eine Suppression des Abbaus von *ptsG* mRNA. Selbiger Effekt zeigt sich auch bei Depletion der Enolase [76]. Zudem scheint es in einem Modell möglich, dass die Bindung von RhlB und der Enolase an die RNase E wichtig ist um die sRNA-vermittelte Degradation von mRNA zu koordinieren: Nach Bindung der Enolase und RhlB kommt es zur strukturellen Umordnung der Arginin-reichen RNA-Bindungsdomänen im C-Terminus der RNase E, wodurch die Flexibilität der RNase E in dieser Region eingeschränkt wird und die Domäne einer besseren Bindung von RNA zu Verfügung steht [77].

Des Weiteren können zusätzliche Proteine Teil des Degradosoms sein: DnaK und GroEL, beide wirksam als Chaperone, die Polyphosphat Kinase, welche die reversible Reaktion mit PP des ATP katalysiert sowie die RNase II, welche als wichtigste hydrolytische 3' -5' Exoribonuklease in *E. coli* fungiert [78-80]. Die Zusammensetzung des Degradosoms ist dabei sowohl von physiologischen Bedingungen, wie z.B. Kältestress [81] oder auch vom Organismus abhängig. In *B. subtilis* gibt es keine RNase E, stattdessen übernimmt die RNase Y deren Aufgabe [82].

1.2.2 RNA Prozessierung und Degradation in Eukaryoten

Aufgrund der Komplexität von RNA-Prozessierung und Degradation in Eukaryoten ist im folgendem lediglich ein Überblick über die wichtigsten Aspekte der Prozessierung und Degradation von mRNA gegeben.

In Eukaryoten ist, im Gegensatz zu Prokaryoten, eine Trennung von Transkription und Translation durch die Kompartimentierung der Zelle gegeben. Während die Transkription und Prozessierung der mRNA im Zellkern stattfindet, findet die Translation im Zytoplasma statt. Zu den Prozessierungsschritten der mRNA gehören das Anfügen eines langen Poly(A) *tails* am 3' Ende der mRNA, durch Poly(A)-Polymerasen. Diese *tails* können bis zu 70 - 90 Nukleotide (*S. cerevisiae*) oder 100 - 250 Nukleotide (Säugetiere) lang sein und werden durch Poly(A) bindende Proteine (PABPs) gebunden. Damit wird die mRNA vor einem 3' – 5' Abbau durch Exoribonukleasen geschützt. Am 5' Ende wird die mRNA durch einen 7-Methyl-Guanosin-Cap modifiziert, welche der Translationsinitiation dient und ebenso dem Abbau vor 5' -3' Exoribonukleasen schützt. Zusätzlich zählt zu den wichtigsten Prozessierungsprozessen das Spleißen, durch das Introns aus der prä-mRNA

entfernt werden. Der Prozess findet im Spleißosom statt [25]. Defekte oder nicht länger benötigte mRNA wird dagegen abgebaut (Abbildung 4).

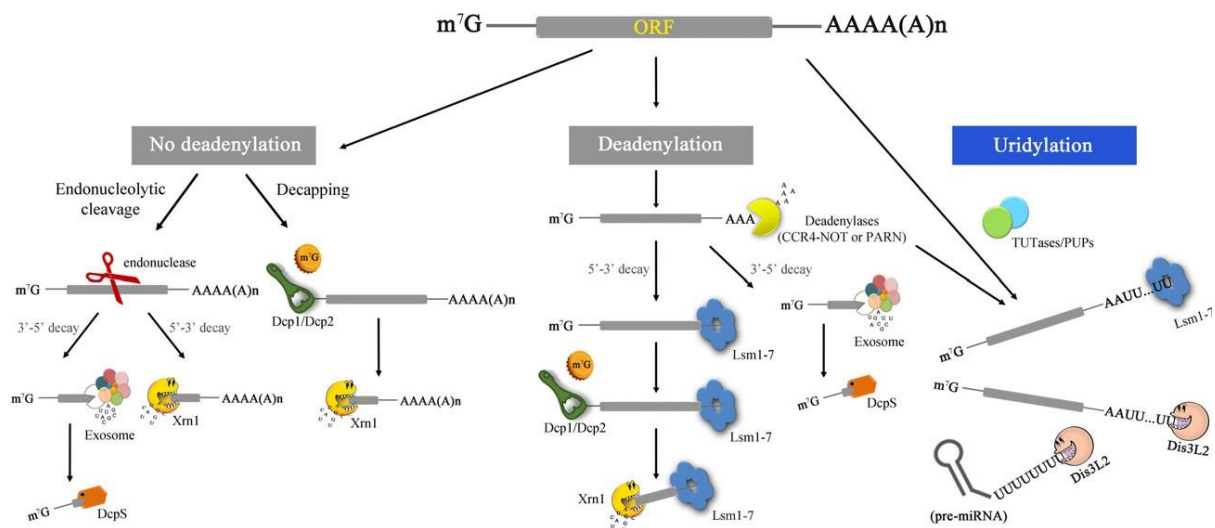


Abbildung 4. Schematischer Überblick über die verschiedenen Abbaumöglichkeiten von mRNA. Gezeigt werden die drei Möglichkeiten des Abbaus, welche abhängig (mitte) oder unabhängig von Deadenylierung sind. Zu letzteren zählen Uridylierung (rechts) oder der Abbau über Decapping oder initiale endonucleolytische Schritte (links) [83].

Der meist erste und limitierende Schritt bei der Degradation der meisten mRNAs ist die Verkürzung der poly(A) tails, bezeichnet als Deadenylierung [84, 85]. Gleichzeitig werden auch gebundene Proteine entfernt, wobei die mRNA für Exoribonukleasen zugänglich wird. Zu den prominentesten zyttoplasmatischen Deadenylasen zählen der Ccr4-Not-Komplex und der Pan2-Pan3-Komplex [86]. Des Weiteren scheint PARN (Poly(A)-Ribonuklease) in Vertebraten eine wichtige Rolle für die Deadenylierung zu spielen [87]. Danach ist einerseits ein Abbau der mRNA in 3' - 5' Richtung durch das Exosom möglich [88, 89] zum anderen kann, durch die Verkürzung des poly(A) tails, folgend der 5' Cap der mRNA durch den Enzymkomplex Dcp1p/Dcp2p entfernt werden [90]. Eine Rekrutierung des Decappingkomplexes kann durch den Lsm1-7-Pat1-Komplex wahrgenommen werden, welcher gleichzeitig auch den Abbau der mRNA durch das Exosom inhibiert [91]. Durch das Decapping wird das 5' Ende der mRNA für den Abbau durch die 5' -3' Exoribonuklease Xrn1p frei [92]. Neben Dcp1p/Dcp2p existiert ein weiteres Decapping Enzym, DcpS, welches jedoch nur den Cap von kurzen Oligonukleotiden (bis zu 10 Nukleotide lang) entfernen kann. Diese kurzen Oligonukleotide entstehen meist durch den Abbau des Exosoms in 3' - 5' Richtung [93, 94]. Neben Deadenylierung spielt auch die Oligouridylierung eine wichtige Rolle für den Abbau von mRNAs: Von Poly(U) Transferasen und Uridyltransferasen (TUT) werden kurze Oligouridinreste an das 3' Ende einer mRNA angehängt [95].

Diese Uridinreste werden durch den Lsm1-7-Pat1-Komplex erkannt, woraufhin der Decappingkomplex rekrutiert wird und es schließlich zum Abbau durch die 5' - 3' Exoribonuklease Xrn1 kommt [96]. Alternativ dazu kann auch Dis3L, als Untereinheit des Exosoms, durch Uridylreste aktiviert werden und der Abbau der mRNA von 3' - 5' Richtung erfolgen [97].

Zusätzlich kann der Abbau von mRNA auch durch sequenzspezifische Endorionukleasen initiiert oder die Target mRNA durch miRNA/siRNA vermittelt werden. Der Abbau durch Endoribonukleasen kann dabei unabhängig des poly(A) *tails* sein. Im Anschluss erfolgt ein Abbau der resultierenden mRNA Fragmente durch Exoribonukleasen [98].

1.2.2.1 Das eukaryotische Exosom

Das eukaryotische Exosom wurde erstmals 1997 in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben [88] und bis heute ist *S. cerevisiae* der meist genutzte Modellorganismus für das Exosom in Eukaryoten.

Der Aufbau des eukaryotischen Exosoms ist komplexer im Vergleich zum archaealen Exosom, welches im Kapitel 1.2.3.1 beschrieben wird. Neun verschiedene Untereinheiten bilden das Grundgerüst des eukaryotischen Exosoms, auch bezeichnet als Exo9, bestehend aus einer hexameren ringförmigen Kernstruktur mit einer aufgelagerten trimeren Kappe. Der hexamere Ring wird dabei von sechs verschiedenen RNase PH-like proteins (RPDs) gebildet, welche als Heterodimere vorliegen: Rrp41-Rrp45, Rrp46-Rrp43, und Mtr3-Rrp42. Der hexamere Ring umschließt dabei einen zentralen Kanal, welcher nur von einzelsträngiger RNA passiert werden kann. Die heterotrimere Kappe besteht aus drei S1/KH-haltigen Proteinen, Rrp40, Rrp4 und Csl4, wobei die S1-Domänen zum zentralen Kanal hin lokalisiert liegen [99]. Der Hexamer selbst ist katalytisch inaktiv, die Aktivität wird durch die RNasen Rrp44 und Rrp6 vermittelt, welche mit ihm interagieren. Rrp44, auch bezeichnet als Dis3, besitzt sowohl eine endonukleolytische RNase Aktivität als auch eine 3' - 5' hydrolytisch prozessive RNase Aktivität [100, 101]. Rrp6 dagegen verfügt nur über eine distributive hydrolytische 3' - 5' RNase Aktivität. Einzelsträngige RNA wird über den Kern des Exosoms zu den zwei aktiven RNase-Seiten geleitet, wobei das Exosom dabei gleichzeitig die Aktivität von Rrp6 und Rrp44 moduliert [102, 103]. Rrp44 besitzt Kontakte zum Boden des Hexamers durch die Untereinheiten Rrp41-Rrp45 sowie Rrp43 [104]. Rrp6 dagegen bindet an Csl4, Rrp43 und Mtr3 im oberen Bereich des Hexamers [105]. Zusätzlich können Protein-Cofaktoren mit dem Exosom assoziiert sein, um dessen Aktivität zu modulieren, wie z.B. (i) Rrp47p, (ii) Ski7p bzw. der Ski2p/Ski3p/Ski8p Komplex und (iii) der TRAMP-Komplex. Rrp47p ist ein nukleares Protein der Hefe, welches direkt mit Rrp6 interagiert und in der Lage ist, strukturierte Nukleinsäuren zu binden. Dadurch fördert es Abbau oder Prozessierung von

strukturiertes RNA durch Rrp6, wie z.B. 3' verlängerten Vorläufermolekülen der 5,8S rRNA oder snoRNA Vorläufern [106]. Ski7p ist ein GTP-bindendes Protein, welches als Signalvermittler zwischen dem Exosom und dem Ski2p/Ski3p/Ski8p Komplex wirkt. Ski2p ist ein Mitglied der DEAD box RNA Helikasefamilie. Es ist mittels ATP in der Lage RNA-RNA Sekundärstrukturen oder Protein-RNA Sekundärstrukturen aufzulösen. Der Ski-Komplex vermittelt dabei den 3' - 5' mRNA Abbau durch das Exosom [89, 107, 108]. Der TRAMP-Komplex (Trf/Air/Mtr4 *polyadenylation*) fügt, im Zuge des Prozesses der Qualitätskontrolle, kurze Poly(A) *tails* an das 3' Ende von abzubauender RNA an. Dadurch werden diese für Degradation durch das Exosom markiert [109].

Es existieren verschiedene Zusammensetzungen des Exosoms: Im Zytoplasma ist Exo9 mit Rrp44 (Exo10⁴⁴) und im Nukleus ist Exo9 mit Rrp6 und Rrp44 (Exo11^{44/6}) assoziiert. Es wird zudem vermutet, dass im menschlichen Nukleolus eine weitere Form des Exosoms, Exo9 assoziiert mit Rrp6 (Exo10⁹), existiert [110].

1.2.3 RNA Prozessierung und Degradation in Archaea

Bis heute ist relativ wenig über RNA-Prozessierung und Degradation in Archaea bekannt, jedoch ergab die Bestimmung von mRNA-Halbwertszeiten, dass diese zwischen Archaea und Bakterien ähnliche Werte aufweist. In Bakterien liegt die Halbwertszeit von Transkripten zwischen Sekunden [111] bis Minuten [112], wohingegen diese in Eukaryoten von Minuten (bei der Hefe [113]) bis Stunden (in Säugerzellen [114]) variieren kann. In Archaea liegen die durchschnittlichen Halbwertszeiten von Transkripten bei 5,3 Minuten in *S. solfataricus* und 5,1 Minuten in *S. acidocaldarius*. 50% der Transkripte haben Halbwertszeiten zwischen 4 und 8 Minuten, 8% der Gene besitzen Halbwertszeiten über 20 Minuten. In *Halobacterium salinarum* liegt die durchschnittliche Halbwertszeit der Transkripte bei 10 Minuten, wobei 79% aller Transkripte Halbwertszeiten zwischen 8 und 12 Minuten aufwiesen [115]. Es ist möglich, dass kurze Halbwertszeiten von Transkripten, sowohl in Bakterien als auch in Archaea, darauf hinweisen, dass bei veränderten Umweltbedingungen eine schnelle Anpassung des Transkriptomlevels erforderlich ist. Die kürzeren Halbwertszeiten in Archaea, welche denen von Bakterien ähneln, könnten ebenso im Zusammenhang mit der fehlenden Prozessierung der mRNA, verglichen mit den Eukaryoten, zurück zu führen sein. Zudem ist kein Transport der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma nötig. Die Translation kann zeitnah nach Transkription erfolgen [116]. Die mRNA von Archaea ist, wie die der Bakterien, oftmals polycistronisch, nicht gecappt und weist am 5' Ende ein Triphosphat auf. Ebenso ist ein stabilisierender Poly(A)-*tail* am 3' Ende nicht vorhanden [117]. Introns sind in der

mRNA in der Regel nicht vorhanden, erste Beispiele konnten jedoch gezeigt werden, wie z.B. innerhalb der 23S rRNA [118] oder dem archaealen *Cbf5*-Gen [119].

In Exosom-codierenden Archaea, können am 3' Ende der RNA heteropolymerische, A-reiche *tails* nachgewiesen werden, welche auf die Aktivität des Exosoms zurückzuführen sind. Von diesen *tails* wird vermutet, dass sie als Ladeplattform für 3' - 5' Exoribonukleasen und somit der Destabilisierung der RNA dienen [120, 121]. *In vitro* zeigt sich ein Effekt für den schnelleren Abbau von RNA wenn ein 3' heteropolymerischer *tail* vorhanden ist, *in vivo* konnte dies noch nicht bestätigt werden [122-124]. Die destabilisierende Rolle von homopolymerischen A-*tails* am 3' Ende von RNA in Bakterien und Eukaryoten konnte jedoch *in vivo* gezeigt werden [71, 72].

Die Degradation der RNA in Archaea ist vergleichsweise wenig untersucht. Der Abbau in 5' - 3' Richtung der mRNA findet dabei durch Mitglieder der β -CASP Familie statt: das Ortholog der RNase J aus *S. solfataricus* (aRNase J) und aCPSF2 binden dabei präferiert an RNA mit Monophosphat anstelle von Triphosphat am 5' Ende [125, 126]. Die Bindung der 5' - 3' Exoribonukleasen kann jedoch durch Bindung des Translationsinitiationsfaktors a/eIF2(γ) an das 5' Triphosphatende der mRNA, inhibiert werden [127]. Durch die schützende Wirkung des 5' Endes der mRNA durch a/eIF2(γ) besitzt *S. solfataricus* somit eine *cap-like structure* ähnlich der Eukaryoten [126]. Ein Enzym, welches das Triphosphat in Monophosphat umwandelt, ist bis jetzt jedoch noch unbekannt [126]. Der Abbau der RNA in 3' - 5' Richtung findet in der Regel durch das Exosom statt [128], welches in Kapitel 1.2.3.1 näher betrachtet wird. In Archaea, welche jedoch nicht die Gene des Exosoms codieren und keine 3' *tails* der RNA aufweisen, wird der Abbau der RNA hauptsächlich über die RNase R in 3' - 5' Richtung vorgenommen: In *H. volcanii* ist das Homolog zur *E. coli* RNase R im Genom codiert und stellt eine hydrolytische essentielle Exoribonuklease dar [121]. Endonukleolytische Aktivitäten werden durch Mitglieder der RNase P und RNase Z Familie gewährleistet: Die RNase P ist für die Reifung des 5' Endes von tRNA Vorläufern bekannt, während aRNase Z das 3' OH-Ende der tRNAs generiert. Weitere Endonukleasen sind aNob1 (schneidet RNA an der *D-Site*), EndA (schneidet im "*Splicing Prozess*" an den *Bulge-Helix-Bulge* Motiven der RNA), aCPSF1 und aPelota (wahrscheinlich involviert in den Prozess des RNA-Abbaus von *stalled ribosomes*), welche ebenso in Eukaryoten vorkommen. Die Cas6 (CRISPR-Cas) Familie dagegen wird mit den Bakterien geteilt [126].

1.2.3.1 Das archaeale Exosom

Den ersten Hinweis der Existenz des Exosoms in Archaea lieferte der Nachweis homologer Gene zu Rrp4, Rrp41, Rrp42 und Csl4 in archaealen Genomen [129]. Während die Gene für aRrp4, aRrp41,

und aRrp42 in einem Superoperon organisiert vorliegen, liegt Csl4 separat im Genom vor. Die Isolation des Exosoms über Co-Immunopräzipitation aus *Sulfolobus solfataricus* ergab schließlich den ersten experimentellen Nachweis. Zusammen mit Rrp4, Rrp41, Rrp42 und Csl4 wurden einige andere Proteine mit co-immunopräzipitiert: (i) DnaG, welches als bakterielle Primase annotiert ist, (ii) Cpn, ein Chaperonin, (iii) Cdc48, ein Homolog des *cell division-cycle* 48 und (iv) ein 16 kDa Protein unbekannter Funktion [130, 131]. Sowohl Cpn als auch Cdc48 haben beide Eigenschaften von Chaperoninen, konnten bisher aber nicht als Interaktionspartner des Exosoms verifiziert werden. DnaG hingegen konnte als Interaktionspartner des archaealen Exosoms bestätigt werden und kann generell nachgewiesen werden, wenn das Exosom von *Sulfolobus solfataricus* aufgereinigt wird [130].

Die Struktur des archaealen Exosoms

Im Gegensatz zum essentiellen eukaryotischen Exosom sind nicht in jeder Archaea-Spezies (nicht in *Methanococci*, *Halobacteria*, einige *Methanomicrobia*) Untereinheiten für das Exosom in Genom codiert [124, 129].

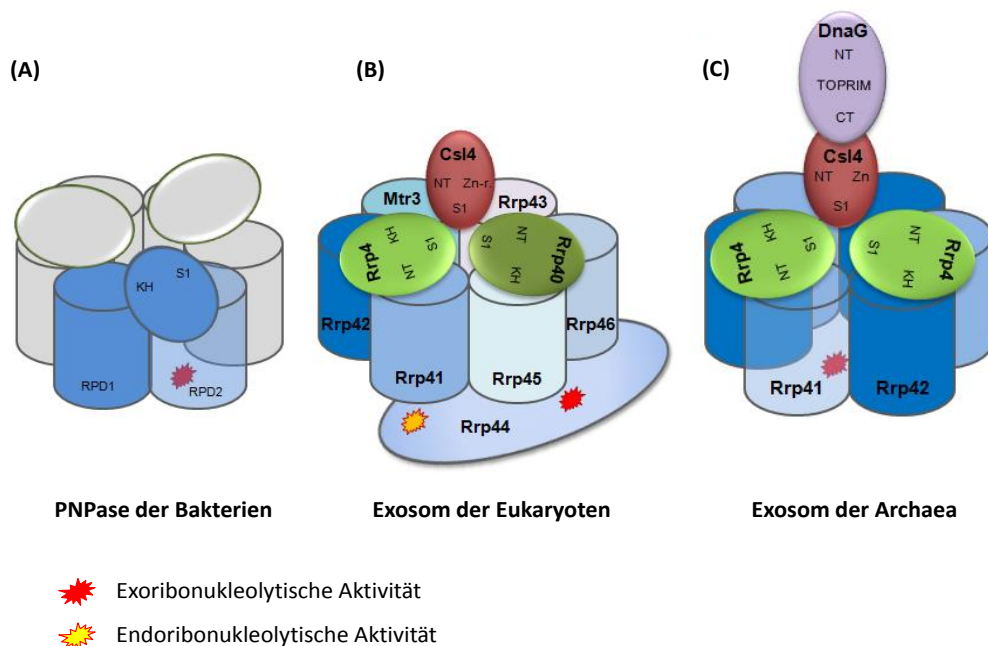


Abbildung 5. Schematische Illustration der RNA-degradierenden Proteinkomplexe der drei Domänen des Lebens. (A) Bakterielle PNPase. In Blau dargestellt ist ein Monomer des trimeren Proteinkomplexes, wobei jedes der Monomere zwei RPD-Domänen, sowie eine KH- und S1-Domäne besitzt. (B) Eukaryotisches Exosom. Die hexamere Grundeinheit besteht aus sechs verschiedenen Einzelproteinen, auf welche eine trimere Kappe aus den Proteinen Rrp4, Rrp40 und Csl4 aufgelagert ist. Zusätzlich ist eine zehnte Untereinheit, Rrp44, Bestandteil des eukaryotischen Exosoms. (C) Archaeales Exosom. Die hexamere Grundeinheit wird aus drei Rrp41-Rrp42 Dimeren gebildet, auf welche eine trimere Kappe, aus verschiedenen stöchiometrischen

Zusammensetzungen von Rrp4 und Csl4, aufgelagert ist. Zusätzlich kann DnaG über Csl4 mit dem Exosom interagieren. RPD, RNase PH-Domäne; KH, KH-Domäne; Zn, Zn-ribbon Domäne; S1, S1-Domäne; NT, N-terminale Domäne; CT, C-terminale Domäne; TOPRIM, TOPRIM-Domäne; 🌟 Exoribonukleolytische Aktivität des Exosoms; 🌟 Endoribonukleolytische Aktivität des Exosoms.

Das archaeale Exosom ist ein aus neun Untereinheiten bestehender Proteinkomplex, welcher eine hexamere ringförmige Grundstruktur beinhaltet. Auf dem Hexamer ist auf eine trimere Kappe aufgelagert. Drei Rrp41-Rrp42 Heterodimere bilden den hexameren Ring, in welchem Rrp41 die katalytische Aktivität besitzt, obwohl sowohl Rrp41 als auch Rrp42 RPD (*RNase PH-like domain*) besitzen. Die Kappe besitzt RNA-Bindungsaktivität und ist aus den Untereinheiten Rrp4 und Csl4 (siehe Abschnitt "Die Kappenproteine Rrp4 und Csl4") in stöchiometrisch verschiedenen Zusammensetzungen, aufgebaut [132, 133]. DnaG interagiert über die Bindung mit Csl4 mit dem Exosom [134]. Die Interaktion der Kappenproteine mit dem hexameren Ring wird über die NTD von Rrp4 und Csl4 vermittelt. Der hexamere Ring umschließt einen zentralen Kanal, welcher einen Engpunkt von 8 – 10 Å im Eingangsbereich formt und sich zu einer katalytisch aktiven Kammer am Boden des Hexamers weitet. Der Engpunkt stellt sicher, dass nur einzelsträngige RNA in den hexameren Ring eintreten kann. Es werden mindestens 10 nt einzelsträngige RNA am 3' Ende des Substrates benötigt, um die vollständige Länge beginnend der Engstelle bis zur aktiven Seite des Kanal zu umspannen. Dadurch wird eine prozessive Degradation der RNA gewährleistet, welche phosphorolytisch in 3' - 5' Richtung abgebaut wird. Zusätzlich wird Mg^{2+} für den Abbau benötigt: Rrp41 koordiniert die P_i -Ionen welche den nukleophilen Angriff des negativ geladenen Phosphates am 3' Ende der RNA verursachen. Die negative Ladung muss durch zwei konservierte Arginin-Reste von Rrp41 (R⁹⁹ und R¹³⁹) neutralisiert werden. Zusätzlich wird Mg^{2+} für die Stabilisierung des intermediären Status des phosphorolytischen Reaktionsmechanismus benötigt, indem die Energie herabgesetzt wird [135, 136]. Da nur Rrp41 die katalytisch aktive Seite besitzt, sind drei aktive Zentren im Lumen des hexameren Ringes zu finden. Das 3' Ende der eintretenden RNA ist dabei hoch flexibel und in der Lage zwischen den drei Zentren zu wechseln, welche zusammen am Degradationsmechanismus der RNA teilnehmen [137]. Auch wenn Rrp42 katalytisch inaktiv ist, wird die Untereinheit benötigt, um die Interaktion der RNA mit dem hexameren Ring zu gewährleisten: Die ersten vier Nukleotide (N1 bis N4) werden sowohl von Rrp41 und Rrp42 gebunden, was dazu führt, dass Rrp41 nicht allein aktiv sein kann. Die finalen Degradationsprodukte besitzen eine Größe von 4 - 3 und 2 - 1 Nukleotiden.

Das Exosom ist in der Lage RNA sowohl exoribonukleolytisch abzubauen als auch ohne Matrize, unter dem Verbrauch von NDPs zu synthetisieren ([120]; Abbildung 6). Die resultierenden heteropolymerischen RNA *tails* am 3' Ende der RNA destabilisieren und dienen als Ladeplattformen von Exoribonukleasen.

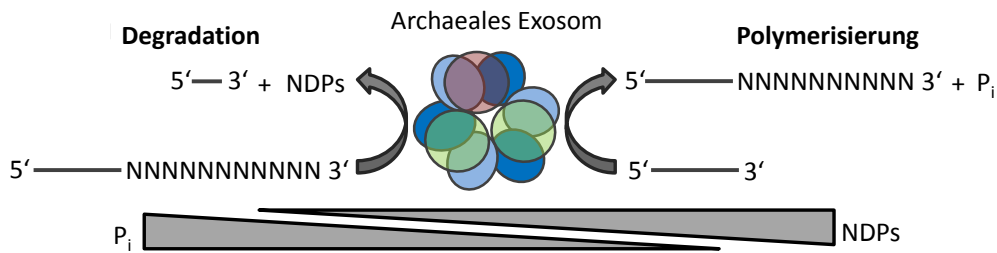


Abbildung 6. Schematische Illustration der zwei Funktionen des archaealen Exosoms. Auf der linken Seite ist die phosphorolytische 3' – 5' Exoribonuklease Aktivität dargestellt, wobei unter dem Verbrauch von P_i NDPs freigesetzt werden. Rechts ist die Polynukleotidylierung am 3' Ende der RNA unter dem Verbrauch von NDPs unter der Freisetzung von P_i ersichtlich. *In vitro* beeinflusst ein hoher Phosphatlevel die Degradationsaktivität positiv, während ein hoher NDP-Spiegel die Polynukleotidylierung fördert. NNNNNNNN, posttranskriptioneller heteropolymerisch angefügter RNA-tail.

In vitro ist es auch möglich reine Rrp4- oder Csl4-Exosome zu rekonstituieren wohingegen *in vivo* nur gemischte Exosome mit unterschiedlich relativen Mengen von Rrp4, Csl4 und DnaG von *Sulfolobus solfataricus* isoliert werden können [130]. Durch die Rekonstitution von Exosomen mit homotrimeren Kappen konnten in der Vergangenheit Eigenschaften bezüglich der Substratpräferenzen von Rrp4 und Csl4 identifiziert werden (siehe den Abschnitt „Die Kappenproteine Rrp4 und Csl4“).

Das Exosom von *S. solfataricus* kann *in vivo* über Sucrose oder Glycerol-Gradienten mit verschiedener Dichte aufgereinigt werden: Die Mehrheit des Exosoms kann in der Pellet Fraktion gefunden werden oder co-sedimentiert mit der Membran [132, 138]. Nur ein geringer Anteil des Exosoms kann in der löslichen Fraktion detektiert werden. Zusätzlich wird der Hauptanteil von Csl4 und DnaG in der Fraktion des unlöslichen Exosoms gefunden und co-sedimentiert mit der ribosomalen Fraktion des Gradienten.

DnaG als Interaktionspartner des Exosoms von *S. solfataricus*

DnaG ist, aufgrund der zentralen Topoisomerase/primase (TOPRIM) Domäne, als bakterielle Primase annotiert [21, 139] und eine spezifische, obligate Untereinheit des archaealen Exosoms [132]. DnaG interagiert über seine CTD mit Csl4 des Exosoms und ist in der Lage die Substratspezifität des Exosoms zu beeinflussen [134]. Die CTD von DnaG ist dabei in Exosom codierenden Archaea stärker konserviert, wohingegen NTD und TOPRIM Domäne in allen Archaea konserviert sind. Die TOPRIM Domäne ist generell als RNA-Bindungsdomäne bekannt, die NTD stellt eine neue RNA-

Bindungsdomäne mit Poly(A)-Präferenz dar, in Kooperation der Bindung der RNA mit der TOPRIM-Domäne [124]. Somit übermitteln sowohl DnaG als auch Rrp4 dem Exosom Poly(A)-Präferenz [132, 134]. Von DnaG ist zudem anzunehmen, dass es im Abbau von strukturierter RNA durch die posttranskriptionelle Synthese von A-reichen *tails* an das 3' Ende von RNA beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass rRNA *in vitro* von exosomalen Varianten mit gebundenen DnaG besser polyadenyliert wird als ohne DnaG. Polyadenylierte rRNAs wurden zudem schneller durch das Exosom degradiert als rRNA ohne posttranskriptionelle *tails* [124]. Während die Struktur des archaealen Exosoms ohne DnaG sehr gut untersucht und beschrieben ist [140-142], ist unbekannt wie sich die strukturelle Interaktion von DnaG mit dem Exosom darstellt und ob DnaG als Monomer oder Dimer mit Csl4 interagiert. Überraschenderweise besitzen auch Archaea, welche kein Exosom besitzen, DnaG, was auf eine generelle Funktion im RNA-Metabolismus oder als putative Primase hindeutet [143, 144]. Auch über die Struktur von DnaG selbst ist wenig bekannt. So ist sowohl möglich, dass es sich um ein Monomer [143] oder Dimer handelt [145].

Die Kappenproteine Rrp4 und Csl4

Die Kappenproteine Rrp4 und Csl4 erhöhen, durch ihre RNA-Bindungsaktivität, die Effizienz der Degradation durch das Exosom [136]. Gleichzeitig sind sie in der Lage dem Exosom verschiedene Substratspezifitäten zu vermitteln. Rrp4 präferiert, im Gegensatz zu Csl4, A-reiche Substrate (Poly(A)-Präferenz), was mittels Kompetitionsassays nachgewiesen werden konnte [123]. Bezüglich ihrer Domänen sind Rrp4 und Csl4 sehr ähnlich organisiert: Die NTD dient jeweils der Interaktion mit dem Exosom, wohingegen die RNA-bindenden Domänen flexibler angeordnet sind [142, 146]. C-terminal besitzt Rrp4 eine KH-Domäne (*protein K homology*), Csl4 eine Zn-Ribbon Domäne [129]. Die zentrale S1-Domäne (*ribosomal protein S1 homology*) dagegen ist zwischen Rrp4 und Csl4 konserviert. Die strukturelle Anordnung bei beiden Proteinen auf dem Hexamer ist ebenfalls sehr ähnlich organisiert, die S1-Domäne ist jeweils zum zentralen Kanal des Hexamers hin orientiert, wohingegen die Zn-ribbon Domain von Csl4 bzw. die KH-Domäne von Rrp4 peripher des Hexamers lokalisiert liegen ([142], siehe Abbildung 7). Die S1-Domäne reguliert dabei auch den Eintritt von einzelsträngiger RNA in den Hexamer, KH- und Zn-ribbon Domäne dienen wahrscheinlich eher der spezifischen Bindung von RNA-Substraten (rRNA) oder Co-Faktoren des Exosoms [142].

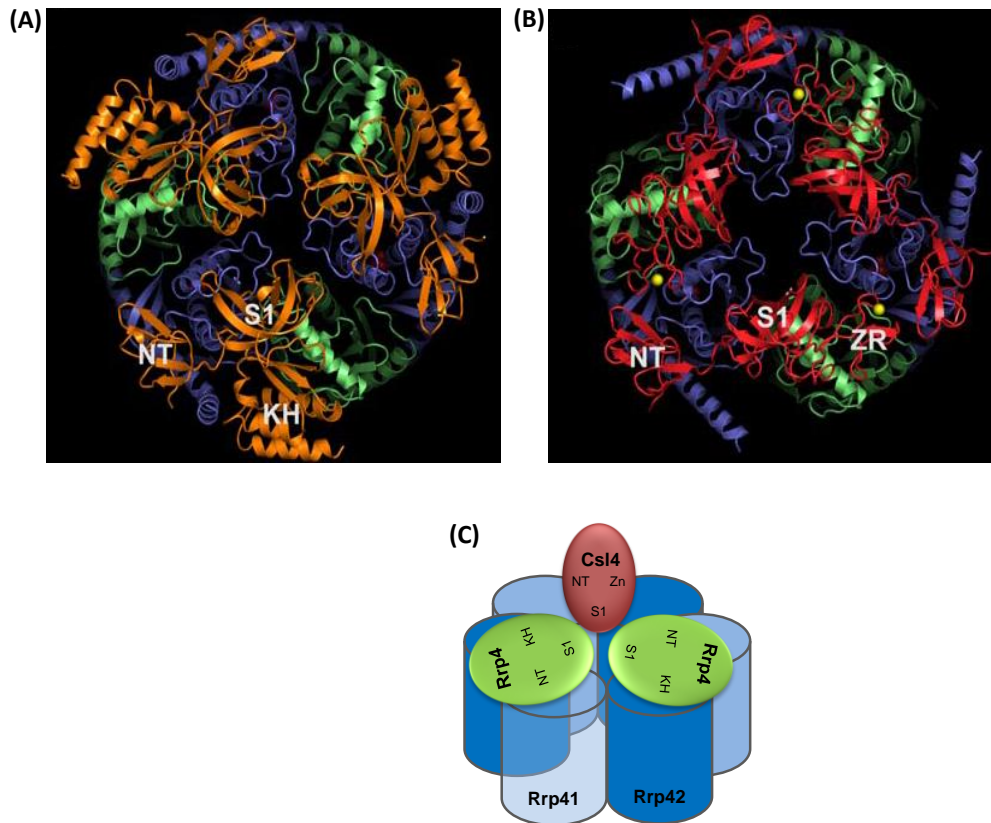


Abbildung 7. Kristallstruktur von **(A)** Rrp4 und **(B)** Csl4. Rrp41 ist in Blau, Rrp42 in Grün, Rrp4 in Orange und Csl4 in Rot dargestellt (aus [142]). **(C)** Schematische Darstellung der Domänenanordnung von den Kappenproteinen Rrp4 und Csl4 auf dem Exosom. NT, N-terminale Domäne; S1, S1-Domäne; KH, KH-Domäne; Zn, Zn-ribbon Domäne.

Ausgehend von den Ähnlichkeiten zwischen Rrp4 und Csl4 wurde vermutet, dass die Poly(A)-Präferenz durch die KH-Domäne von Rrp4 vermittelt wird. Jedoch wies ein Δ KH-Rrp4-Exosom weiterhin Poly(A)-Präferenz auf, wie in Kompetitionsassays gezeigt werden konnte [132]. Von der S1-Domäne der PNPase aus Chloroplasten dagegen ist bekannt, dass sie Poly(A)-Präferenz aufweist [147].

Generell ist von natürlichen RNA-Substraten des Exosoms in *S. solfataricus* ist sehr wenig bekannt. In der Vergangenheit konnte zwar gezeigt werden, dass vor allem rRNAs Substrate des Exosoms sind [124], ansonsten sind jedoch kaum natürliche RNA-Substrate untersucht. Für *in vitro* Experimente, welche der Aufklärung von exosomalen Eigenschaften dienen, wurden vor allem artifizielle Substrate wie poly(A)-RNA und *Multiple Cloning Sites* wurden genutzt [123, 136].

Nop5 als potentieller Interaktionspartner des Exosoms von *S. solfataricus*

Über *in vivo* Co-Immunopräzipitationen des Exosoms von *S. solfataricus*, konnten in der Vergangenheit zusätzliche potentielle Interaktionspartner isoliert werden. Beispielsweise wurden der Elongationsfaktor EF1 α sowie ein kleines 16 kDa großes Protein, unter der Verwendung von Rrp41- und DnaG-spezifischen Antikörpern, co-immunopräzipitiert [130]. Auch Nop5 wurde, aus Zellen der späten stationären Wachstumsphase von *S. solfataricus*, unter Verwendung von Rrp41-Antikörpern, als potentieller Interaktionspartner des Exosoms co-immunopräzipitiert [148].

Nop5p, auch als Nop5 bezeichnet, ist als Teil des archaealen box C/D snoRNPs bekannt. Der Proteinkomplex katalysiert die 2'-*O*-Methylierung von rRNA, welche für die rRNA Faltung bzw. Reifung und somit für die Funktionalität der Ribosomen essentiell ist [149]. Die archaealen box C/D sRNPs setzen sich auch den Proteinen L7Ae, Fibrillarin, Nop5 sowie einer Box C/D sRNA zusammen [150, 151]. Die *guide* Region der sRNA im Komplex ist dabei wichtig, um die richtige Positionierung für die Methylierung der rRNA zu gewährleisten. Dies geschieht über Basenpaarung der sRNA mit der Zielsequenz der rRNA [150, 152, 153]. Fibrillarin besitzt die enzymatische Methylierungsaktivität des Komplexes [150], wohingegen Nop5 als *Scaffold* Protein im Komplex wirkt und als solches die Proteine und sRNA positioniert [154, 155]. Nop5 ist aus drei Domänen aufgebaut: einer CTD, der mittleren Coiled-Coil Domäne und der NTD. Die CTD formt zusammen mit L7Ae eine RNA-Bindungseinheit, welche mit der Box C/D der sRNA interagiert. Die Coiled-coil Domäne dient einerseits der Selbstdimerisierung und bildet gleichzeitig eine flache Plattform, welche die anderen Komponenten des Komplexes unterstützt. Die NTD ist für die Interaktion mit Fibrillarin verantwortlich [154, 156]. Mittels NMR Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass Dimere sRNP Komplexe assemblieren, welche vier Kopien jedes der Proteine (L7Ae, Fibrillarin sowie Nop5) sowie zwei C/D Box sRNAs enthalten [157].

Um Nop5 als Interaktionspartner des Exosoms zu verifizieren, wurde versucht mittels Co-Immunopräzipitation, unter Verwendung von Nop5-Antikörpern, exosomale Untereinheiten zu co-immunopräzipitieren und durch Massenspektrometrie nachzuweisen. Es konnten jedoch nur Untereinheiten des Methylierungskomplexes und keine exosomalen Untereinheiten detektiert werden. Ursache dessen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der größte Anteil von Nop5 im Methylierungskomplex gebunden vorliegt und nur ein kleiner Teil von Nop5 mit dem Exosom interagiert. Entsprechend ist anzunehmen, dass die Konzentration von exosomalen Untereinheiten für die Massenspektrometrie im Versuch zu gering war [145].

Eine erste Bestätigung der Interaktion zwischen Nop5 mit dem Exosom konnte durch eine *in vitro* Co-Immunopräzipitation erbracht werden. In dieser wurde Nop5 erstmals spezifisch mit dem Rrp4-Exosoms co-immunopräzipitiert (Daten von L. Hou, Abbildung 8).

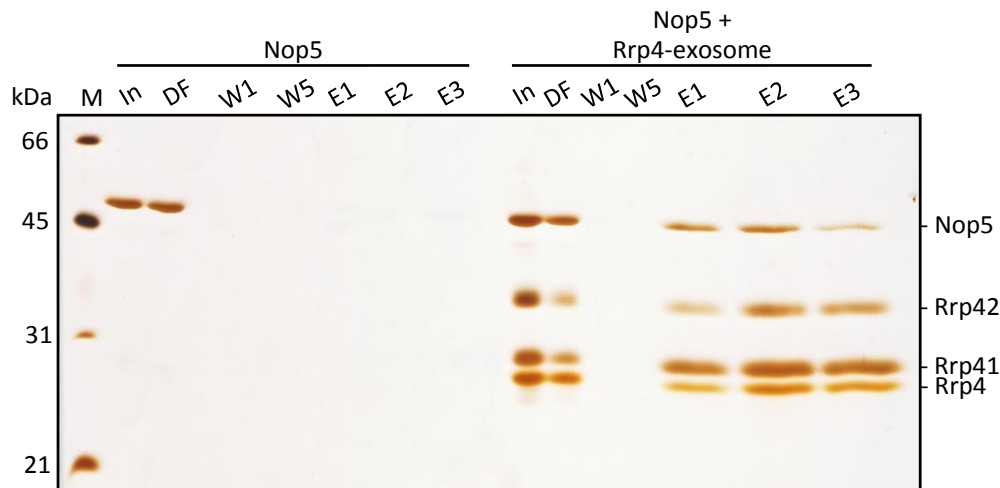


Abbildung 8. Interaktion von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom. Dargestellt ist ein 12%-iges SDS-PAA-Gel nach Silberfärbung, welches die Interaktion zwischen Nop5 und dem Rrp4-Exosom zeigt (rechts). Für die *in vitro* Co-Immunopräzipitation wurden Rrp41-Antikörpern verwendet. Es gibt keine unspezifische Interaktion zwischen Nop5 mit den Rrp41-Antikörpern selbst (links). In, Input; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, *low range* Proteinmarker. Das Experiment wurde durchgeführt von L. Hou.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Rrp4 und Csl4 sind bezüglich ihres strukturellen Aufbaus sehr ähnlich. Die S1-Domänen ist zwischen den beiden Proteinen konserviert, zudem ist die Anordnung von Rrp4 und Csl4 auf dem Hexamer sehr ähnlich organisiert [142]. Da jedoch nur Rrp4 eine Präferenz für Poly(A)-RNA aufweist, stellt sich die Frage, auf welche Aminosäuren diese Poly(A)-Präferenz zurückzuführen ist [123]. Mittels Aminosäuresubstitutionen und dem Austausch der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4 sollte dieser Frage nachgegangen werden.

Nop5 konnte als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden ([158], L. Hou) - eines der Hauptziele dieser Arbeit bestand darin, diese Interaktion, zwischen Nop5 und dem Exosom, zu bestätigen. Dafür wurden *His₆-tag-Pull down*- und Surface plasmon resonance (SPR/Biacore) Experimente durchgeführt. Zudem sollte herausgefunden werden, über welche Domäne Nop5 mit Rrp4 des Exosoms interagiert. Mittels *Bacterial Two Hybrid System Assays* und *in vitro* Co-Immunopräzipitation unter Verwendung von sowie MBP-getaggten Nop5-Derivaten sollte die

interagierende Domäne identifiziert werden. Auch die Funktion von Nop5 im Zusammenhang mit dem Exosom ist bislang noch nicht ergründet und sollte durch Degradations- und Polyadenylierungsassays mit rekonstituierten Proteinkomplexen geklärt werden.

Ein bekannter Interaktionspartner des Exosoms hingegen ist DnaG, welches über Csl4 mit dem Exosom interagiert [134]. Da jedoch unbekannt ist, wie sich die strukturelle Interaktion zwischen DnaG mit dem Csl4-Exosom darstellt, wurde versucht das DnaG-Csl4-Exosom *in vivo* in *E. coli* zu rekonstituieren und mittels SPEM-Mikroskopie zu untersuchen.

Zuletzt sollte in dieser Arbeit den Substratspezifitäten des Exosoms mittels iCLIP nachgegangen werden. Da von natürlichen Substraten in *S. solfataricus* ist sehr wenig bekannt ist, sollte der iCLIP RNA identifizieren, welche *in vivo* an das Exosom gebunden ist und ob bestimmte RNA-Spezies am Exosom angereichert vorliegen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien/Geräte

Tabelle 1. Verwendete Materialien und Geräte dieser Arbeit.

Materialien	Hersteller
37° Schüttler, <i>Model G25</i>	New Brunswick Scientific
70°C Schüttler, K8 4000	IKA®
ÄKTApurifier	GE Healthcare
Ultrazentrifugationsröhrchen, <i>Ultracentrifugal</i>	Amicon
Amylose-Resin	NEB
Dialyse Schlauch Viskon	Roth
Eismaschine	Scotsman
Elektroblotter, <i>Perfect-Blue Semi-dry-Blotter</i>	VWR PeqLab
Feinwaage	Sartorius
Fermenter, Typ C 10 – 3	B. Braun Biotech International
G25, G50 Columns	GE Healthcare
Geltrockner, <i>Slab Gel dryer</i>	Scne-Plas
Heizblock, <i>Accu Block, Digital Dry Bath</i>	Labnet
Heparin-Agarose	Sigma
Ilumimager, <i>Intas</i>	Peqlab
Imaging Screen	Bio-Rad
Magnetrührer/Heizplatte, <i>Heidolph MR Hei-Tec</i>	MAGV
Membran Filter, <i>Regenerated cellulose, Whatman™</i> , 0.45 µm	GE-Healthcare
NanoDrop 1000	Peqlab
Ni-NTA-beads	QIAGEN
Nylonmembran, <i>Roti®-Nylon plus</i> , 0.45 µm	Roth
PCR-Maschine, <i>T100 Thermal cycler</i>	Bio-Rad
pH-Meter, <i>Five Easy</i>	Toledo
Phosphorimager (<i>Molecular Imager FX</i>)	Bio-Rad
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich
PVDF-Membran Immobilon P	Millipore
QIAGEN Columns 5 ml	QIAGEN
Scintillationszähler, <i>LS 6500</i>	Beckmann Coulter
Screen Eraser K	Bio-Rad
Sonifizierer, <i>Sonoplus GM70</i>	Bandelin
Spektralphotometer, <i>Specord 50</i>	Analytik Jena
Thermoschrank	Aqua Lytic
Tischzentrifuge/Kühlzentrifuge 1,5 ml / 2 ml, <i>Pico 17</i>	Thermo
Ultraschallbad, <i>Sonorex</i>	Bandelin
Ultrazentrifuge <i>Discovery 90</i>	Sorvall
UV-Tisch, UVT-20 M/W	Herolab
Vakuumtrockner	Scaltec
Vakuumzentrifuge, <i>Concentrator plus</i>	Eppendorf
Waage	GFL
Wasserbad	GFL

Zentrifuge 50 ml, 500 ml, <i>RC 6+</i>	Sorvall
Zentrifuge, Swing-Out Rotor, <i>Rotina 420R</i>	Hettich

Tabelle 2. Genutzte Säulen für ÄKTAexplorer.

Säule	Hersteller
HiTrap™ Heparin HP 5 ml	GE Healthcare
Superdex HiLoad 16/600 200 pg <i>column</i>	GE Healthcare

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3. Verwendete Chemikalien dieser Arbeit.

Chemikalien	Hersteller
96% Ethanol	Chemikalien Scheller
Acrylamid Bisacrylamid 30% (37,5 :1)	Roth
Acrylamid Bisacrylamid 40% (29:1)	Roth
Acrylamid Bisacrylamid 40% (37,5 :1)	AppliChem
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Anhydrotetracycline	IBA
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth
Coomassie	Roth
ddH ₂ O	Roth
Deionisiertes Formamid	AppliChem
Desthiobiotin	IBA
Diethylcarbonat (DEPC)	Roth
Dimethylphthalat (DMP)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphite	Roth
Dipropylenglycoldimethylether (DMM)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA	Roth
Essigsäure 100%	Honeywell
Ethanolamin	Roth
Formaldehyd	AppliChem
Glucose	AppliChem
Glycerol	Roth
Glycin	AppliChem
Glycogen	Thermo Scientific
Harnstoff	Roth

HEPES	Roth
Imidazol	AppliChem
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Magnesiumchlorid-Tetrahydrat	Roth
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Honeywell
Milchpulver	Roth
Natriumphosphat	Roth
Natrium-Acetat	Roth
Natriumborat	Roth
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natrium-Citrat-Dihydrat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)	Sigma-Aldrich
Nonidet P40	Sigma-Aldrich
PEG 800	Thermo Scientific
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth
Phenol-Wasser	AppliChem
Phosphorsäure	Honeywell
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich
rNTPs	Thermo Scientific
Rubidiumchlorid	Fluka
Saccharose	AppliChem
Salzsäure	Honeywell
Silbernitrat	AppliChem
Sodium-Dodecyl-Sulfat	Roth
Surfactant P20	GE Healthcare
TEMED	Roth
Tris	Roth
Triton-X-100	Serva
TRIzol	Ambion life technologies
Tween 20	Roth
X-Gal	Roth
Xylencyanol	Sigma-Aldrich
β -Mecptoethanol	Roth

2.1.3 Antibiotika

Tabelle 4. Genutzte Antibiotika dieser Arbeit, gelistet mit eingesetzten Konzentrationen.

Antibiotikum	Hersteller	Stammkonzentration	Endkonzentration <i>E.coli</i>
Ampicillin	Roth	100 mg/ml	200 µg/100 ml
Gentamycin	Roth	10 mg/ml	10 µg/100 ml
Kanamycin	Roth	10 mg/ml	25 µg/100 ml

Antibiotika wurden in entsprechender Menge eingewogen, in dem in Tabelle 4 gelisteten Konzentrationen, in ddH₂O gelöst und im Anschluss steril filtriert (0,22 µm Filteraufsatz).

2.1.4 Bakterien- und Archaea-Stämme

Tabelle 5. Genutzte Bakterien- und Archaeenstämmen dieser Arbeit, mit Genotypbeschreibung.

Stamm	Verwendung / Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> Arctic Express (DE3)	Überexpression von rekombinanten Proteinen <i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>cpn10 cpn60 Gent^r</i>]	Agilent Technologies
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Überexpression von rekombinanten Proteinen <i>E. coli</i> B, <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> λ, DE3 = λ sBamHI Δ <i>EcoRI</i> -B <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	NEB
<i>Escherichia coli</i> JM109	Klonierungsarbeiten und Plasmidreplikation <i>E. coli</i> K, <i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F' <i>traD36, proAB, laqI^qΔM15</i>]	Promega [159]
<i>Escherichia coli</i> BTH101	Bacterial two hybrid Assay F ⁻ , <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1</i> (<i>Str^r</i>), <i>hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	EUROMEDEX, EUB001
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	Wildtyp P2	Deutsche Stammsammlung

2.1.5 Plasmide**Tabelle 6.** Genutzte Plasmide dieser Arbeit, mit Klonierungsbeschreibung.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET-MCN:: <i>SsoRrp41</i>	Insert 0,74 kb; Konstrukt 5,94 kb; <i>rrp41</i> über <i>NdeI/XhoI</i> in pET-MCN kloniert; Ap ^r	[141]
pET-MCN:: <i>SsoRrp42</i>	Insert 0,9 kb; Konstrukt 6,1 kb; <i>rrp42</i> über <i>NdeI/XhoI</i> in pET-MCN kloniert; Ap ^r	[141]
pET-MCN:: <i>SsoRrp4</i>	Insert 0,84 kb; Konstrukt 6,04 kb; <i>rrp4</i> über <i>NdeI/XhoI</i> in pET-MCN kloniert; Ap ^r	[141]
pET-MCN:: <i>SsoCsl4</i>	Insert 0,56 kb; Konstrukt 5,76 kb; <i>csl4</i> über <i>NdeI/XhoI</i> in pET-MCN kloniert; Ap ^r	[141]
pET-MCN	Ap ^r ; P _{T7} ; C-terminaler His- <i>tag</i> ; 5,2 kb	[141]
pET-15b	Ap ^r ; P _{T7} ; C-terminaler His- <i>tag</i> ; 5,2 kb	Novagen
pET-30a:: <i>SsoDnaG</i>	Insert 1,2 kb; Konstrukt 6,6 kb; <i>dnaG</i> über <i>NdeI/XhoI</i> in pET-30a kloniert; Kan ^r	[143]
pET-15b:: <i>SsoNop5</i>	Insert 1,3 kb; Konstrukt 7 kb; <i>nop5</i> über <i>NdeI/XhoI</i> in pET-15b kloniert; Ap ^r	[148]
pET-30a:: <i>SsoNop5</i>	Insert 1,3 kb; Konstrukt 6,7 kb; <i>nop5</i> über Gibson Assembly in pET-30a kloniert; ohne <i>tag</i> ; Kan ^r	Diese Arbeit
pETMCN:: <i>SsoCsl4S1Rrp4</i>	Rrp4-Protein mit der S1-Domäne von Csl4; kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET15b, Ap ^r	Diese Arbeit
pET15b:: <i>SsoRrp4S1Csl4</i>	Csl4-Protein mit der S1-Domäne von Rrp4; kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pETMCN, Ap ^r	Diese Arbeit
pASK-IBA3plus	Ap ^r ; P _{tet} ; C-terminaler Strep- <i>tag</i> ; 3,2 kb	IBA
pASK-IBA3plus:: <i>SsoRrp41-Rrp42-Csl4</i>	Insert 2,5 kb; construct 5,7 kb; without Strep- <i>tag</i> ; <i>rrp41</i> , <i>rrp42</i> , <i>csl4</i> were cloned with Gibbson assembly in pASK-IBA3plus; Ap ^r	Diese Arbeit
pKTN25	Km ^r ; P _{lac} ; 3,4 kb	EURODEMEX, EUP-25N
pKT25	Km ^r ; P _{lac} ; 3,4 kb	EURODEMEX, EUP-25N
pUT18C	Ap ^r ; P _{lac} ; 3 kb	EURODEMEX, EUP-25N

pUT18	Ap ^r ; P _{lac} ; 3 kb	EURODEMEX, EUP-25N
pKT25-zip	Kontroll-Plasmid für <i>Bacterial two hybrid System Assay</i> ; Km ^r ; P _{lac}	EURODEMEX, EUP-25N
pUT18C-zip	Kontroll-Plasmid für <i>Bacterial two hybrid System Assay</i> ; Ap ^r ; P _{lac}	EURODEMEX, EUP-25N
pKTN25:: <i>SsoRrp4</i>	Insert 0,84 kb; Konstrukt 4,24 kb; <i>rrp4</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKTN25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pKT25:: <i>SsoRrp4</i>	Insert 0,84 kb; Konstrukt 4,24 kb; <i>rrp4</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKT25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pUT18C:: <i>SsoRrp4</i>	Insert 0,84 kb; Konstrukt 3,84 kb; <i>rrp4</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18C kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pUT18:: <i>SsoRrp4</i>	Insert 0,84 kb; Konstrukt 3,84 kb; <i>rrp4</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18 kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pKTN25:: <i>SsoNop5</i>	Insert 1,2 kb; Konstrukt 4,6 kb; <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKTN25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pKT25:: <i>SsoNop5</i>	Insert 1,2 kb; Konstrukt 4,6 kb; <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKT25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pUT18C:: <i>SsoNop5</i>	Insert 1,2 kb; Konstrukt 4,2 kb; <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18C kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pUT18:: <i>SsoNop5</i>	Insert 1,2 kb; Konstrukt 4,2 kb; <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18 kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pKTN25:: <i>SsoNTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,8 kb; NTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKTN25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pKT25:: <i>SsoNTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,8 kb; NTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKT25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pUT18C:: <i>SsoNTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,4 kb; NTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18C kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pUT18:: <i>SsoNTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,4 kb; NTD vom <i>nop5</i>	Diese Arbeit

	über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18 kloniert; Ap ^r	
pKTN25:: <i>SsoCCNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,8 kb; CC vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKTN25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pKT25:: <i>SsoCCNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,8 kb; CC vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKT25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pUT18C:: <i>SsoCCNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,4 kb; CC vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18C kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pUT18:: <i>SsoCCNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,4 kb; CC vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18 kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pKTN25:: <i>SsoCTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,8 kb; CTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKTN25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pKT25:: <i>SsoCTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,8 kb; CTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pKT25 kloniert; Km ^r	Diese Arbeit
pUT18C:: <i>SsoCTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,4 kb; CTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18C kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pUT18:: <i>SsoCTDNop5</i>	Insert 0,4 kb; Konstrukt 3,4 kb; CTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pUT18 kloniert; Ap ^r	Diese Arbeit
pET24c	Km ^r ; P _{T7} ; C-terminaler His- <i>tag</i> ; 5,3 kb	EMD Biosciences
pET24c:: <i>SsoCTDNop5</i>	Insert 1,6 kb; Konstrukt 6,9 kb; CTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pET24c kloniert; MBP- <i>tag</i> ; TEV-Schnittstelle zwischen CTD und MBP- <i>tag</i> ; ohne His- <i>tag</i> ; Km ^r	Diese Arbeit
pET24c:: <i>SsoCCNop5</i>	Insert 1,6 kb; Konstrukt 6,9 kb; CC vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pET24c kloniert; MBP- <i>tag</i> ; TEV-Schnittstelle zwischen CC und MBP- <i>tag</i> ; ohne His- <i>tag</i> ; Km ^r	Diese Arbeit
pET24c:: <i>SsoNTDNop5</i>	Insert 1,6 kb; Konstrukt 6,9 kb; NTD vom <i>nop5</i> über <i>BamHI</i> (Gibson Assembly) in pET24c kloniert; MBP- <i>tag</i> ; TEV-Schnittstelle zwischen NTD und MBP- <i>tag</i> ; ohne His- <i>tag</i> ; Km ^r	Diese Arbeit
pJET	Ap ^r ; blunt end; P _{T7} ; 3 kb	QIAGEN

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Primer für Klonierungen bezüglich Einzelaminosäuren-Substitutionen für Rrp4^{W88A} und Rrp4^{D91S} sind in der Bachelorarbeit von Julian Grützner beschrieben [160].

Tabelle 7.1. Verwendete Oligonukleotide des Projektes der Substitution der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
NTD-Csl4 NdeI fwd	CCTACATATGGTGAGAACTCAAGGCGAATTAAC	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Csl4-NTD-Sequenz in pETMCN mit Schnittstellen für <i>NdeI</i>	Diese Arbeit
NTD-Csl4 rev	CTTAGGATAATAAACGAGCCTTCCAAGGGTATAATTTCTTAAATCCTAG	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Csl4-NTD-Sequenz mit Überhängen für die S1-Domäne von Rrp4	Diese Arbeit
S1-für Csl4 von Rrp4 fwd	GTAACGTACTAGGATTTAAGAAAATTATACCTTGGAAGGCTCGTTTATTATC	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Rrp4-S1-Domäne mit Überhängen für die NTD Domäne von Csl4	Diese Arbeit
S1-für Csl4 von Rrp4 rev	CATCTTGAGCATCTAGCGTAAATAACACCCCCTAGATCCTTGCCTTTAACGG	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Rrp4-S1-Domäne mit Überhängen für die CTD Domäne von Csl4	Diese Arbeit
Zn-Csl4 fwd	CTTATCCGTTAAAGGCAAGGATCTAGGGGGTGTATTACGCTAGATGCTC	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Csl4-Zn-Sequenz mit Überhängen für die S1 Domäne von Rrp4	Diese Arbeit
Zn-Csl4-XhoI rev	GCTACTCGAGCTAATTTCCACCTTTCTTCACC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Csl4-Zn-Sequenz in pETMCN mit Schnittstellen für <i>XhoI</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

NTD-Rrp4-NdeI fwd	CCTACATATGATGAACATGAGTCAGTCCCAG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Rrp4-NTD-Sequenz in pET15b mit Schnittstellen für <i>NdeI</i>	Diese Arbeit
NTD-Rrp4 rev	CATATTTAGCCTTCTTCAAATGTTGAAAAATTACCTCAAATTGAGTATC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Rrp4-NTD-Sequenz mit Überhängen für die S1-Domäne von Csl44	Diese Arbeit
S1-für Rrp4 von Csl4 fwd	GTAAAAGATACTCAATTTGAGGTAATTTTCAACATTTGAAGAAGGCTAAA	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Csl4-S1-Domäne mit Überhängen für die NTD Domäne von Rrp4	Diese Arbeit
S1-für Rrp4 von Csl4 rev	ATATCGATGACTATACCATTACTTACACGAAGATCTTTCATTTTAA TGG	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Csl4-S1-Domäne mit Überhängen für die KH-Domäne von Rrp4	Diese Arbeit
KH-Rrp4 fwd	GGCTTTGACCATTAAAATGAAAGATCTTCGTGTAAGTAATGGTATAGTC	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Rrp4-KH-Sequenz mit Überhängen für die S1 Domäne von Csl4	Diese Arbeit
KH-Rrp4 XhoI rev	GCTACTCGAGTCAAGAATTAGTTTTGGTCTC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Rrp4-KH-Sequenz in pET15b mit Schnittstellen für <i>XhoI</i>	Diese Arbeit

Tabelle 7.2. Verwendete Oligonukleotide für das Projekt des *Bacterial two-hybrid system* Assays (BACTH), unter Nutzung des Gibson Assemblys. FL, Proteine voller Länge (Rrp4, Nop5); NTD, N-terminale Domäne Nop5; CC, Coil-Coiled Domäne Nop5; CTD, C-terminale Domäne Nop5.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
B2H Nop5 NTD pKT25 fwd	CAGGGTCGACTCTAGAGAAAATATACCTAATTGAGCATG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der NTD, FL von Nop5 in pKT25	Diese Arbeit
B2H Nop5 NTD pKT25 rev	TTAGTTACTTAGGTACCCGGGAACCGCTTGAATAGCTAAAAGG	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der NTD von Nop5 in pKT25	Diese Arbeit

Material und Methoden

B2H Nop5 CC+CTD pKT25 fwd	CAGG TCGACCTAGAGGACCTTTTAGCTATTCAAGCGG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CC von Nop5 in pKT25	Diese Arbeit
B2H Nop5 NTD+CC pKT25 rev	TTAGT TACTTAGGTACCCGGGGTGGAGCAACTTCTTTCATTACAC C	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CC von Nop5 in pKT25	Diese Arbeit
B2H Nop5 CTD pKT25 fwd	CAGGGTCGACTCTAGAGAATGTAACAGCCTTAGTGGGTCC	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CTD von Nop5 in pKT25	Diese Arbeit
B2H Nop5 pKT25 rev	T TAGT TACTTAGGTACCCGGGGTCACTTTCTTTTACCTCTTCTC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CTD, FL von Nop5 in pKT25	Diese Arbeit
B2H Rrp4 pKT25 fwd	CAGGGTCGACTCTAGAGAACATGAGTCAGTCCCAGAAAATTG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz von Rrp4 in pKT25	Diese Arbeit
B2H Rrp4 pKT25 rev	TTAGT TACTTAGGTACCCGGGGAGAATTAGTTTTGGTCTCTCCAC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz von Rrp4 in pKT25	Diese Arbeit
B2H Nop5 NTD fwd	CTGCAGGTCGACTCTAGAGAAAATATACTAATTGAGCATG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der NTD, FL von Nop5 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit
B2H Nop5 NTD rev	GAGCTCGGTACCCGGGGAACCGCTTGAATAGCTAAAAGG	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der NTD von Nop5 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit
B2H Nop5 CC+CTD fwd	CTGCAGGTCGACTCTAGAGGACCTTTTAGCTATTCAAGCGG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CC von Nop5 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit
B2H Nop5 NTD+CC rev	GAGCTCGGTACCCGGGG TGGAGCAACTTCTTTCATTACACC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CC von Nop5 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit
B2H Nop5 CTD fwd	CTGCAGGTCGACTCTAGAGAATGTAACAGCCTTAGTGGGTCC	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CTD von Nop5 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit
B2H Nop5 rev	GAGCTCGGTACCCGGGGTCACTTTCTTTTACCTCTTCTC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz der CTD, FL von Nop5 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit
B2H Rrp4 fwd	CTGCAGGTCGACTCTAGAGAACATGAGTCAGTCCCAGAAAATTG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz von Rrp4 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit

Material und Methoden

B2H Rrp4 rev	GAGCTCGGTACCCGGGGAGAATTAGTTTTGGTCTCTCCAC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Nukleotidsequenz von Rrp4 in pKTN25, pUT18, pUT18C	Diese Arbeit
--------------	--	--	--------------

Tabelle 7.3. Oligonukleotide für das Projekt zur Untersuchung der Interaktion von MBP-fusionierten Einzeldomänen von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
NdeI_pET24c_MBT fwd	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAATGAAAATAGAAGAAGGTAAACTGG	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz des MBP- <i>tags</i> in pET24c über Gibson Assembly; pET24c geschnitten mit NdeI	Diese Arbeit
MBT-TEV rev	GGAAGTAGAGGTTCTCGCTGCCCCGAGGTTGTTGTTATTGTTAT TG	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz des MBP- <i>tags</i> ; Primer mit Überhängen für eine TEV-Schnittstelle um den MBP-tag optional schneiden zu können	Diese Arbeit
TEV_NTD fwd	CAGCGAGAACCTCTACTTCCAATCGAAAATATACCTAATTGAGCATGTT	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz der NTD von Nop5; Primer mit Überhängen für eine für eine TEV-Schnittstelle	Diese Arbeit
NdeI_NTD_pET24c rev	GCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCAAACCGCTTGAATAGCTAAAAGGTC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz der NTD von Nop5 in pET24c über Gibson Assembly; pET24c geschnitten mit NdeI	Diese Arbeit
TEV_CC fwd	CAGCGAGAACCTCTACTTCCAATCGGACCTTTTAGCTATTCAAGCGGTT	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz der CC Domäne von Nop5; Primer mit Überhängen für eine für eine TEV-Schnittstelle	Diese Arbeit
NdeI_CC_pET24c rev	GCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATGGAGCAACTTCTTTCATTACACCT	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz der NTD von Nop5 in pET24c über Gibson Assembly; pET24c geschnitten mit NdeI	Diese Arbeit

Material und Methoden

TEV_CTD fwd	CAGCGAGAACCTCTACTTCCAATCGAATGTAACAGCCTTAGTGGG TCC	Vorwärts-Primer zur Klonierung d der Sequenz der CTD von Nop5; Primer mit Überhängen für eine für eine TEV-Schnittstelle	Diese Arbeit
NdeI_CTD_pET24c rev	GCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCACTTTCTTTTACCTCTTCTC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz der NTD von Nop5 in pET24c über Gibson Assembly; pET24c geschnitten mit NdeI	Diese Arbeit
MBP rev	GCTGCCCCGAGGTTGTTGTTATTGTTATTGT	Rückwärts-Primer zur Sequenzierung - zur Überprüfung korrekter Klone	Florian Rossmann

Tabelle 7.4. Oligonukleotide für die Klonierung der Nukleotidsequenz von Nop5 ohne *tag* in pET30a.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
Nop5 – NdeI_fwd	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA AGGAGGG GCAAATATGAAA ATATACCTAATTGAGC	Vorwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz von Nop5 in pET30a; eine eigene Ribosomenbindestelle wurde eingefügt (in dicken Buchstaben dargestellt); Fusion mittels Gibson Assembly	Diese Arbeit
Nop5-XhoI_rev	GGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTTATTATCACTTTCTTTT ACCTCTTCTCTTTC	Rückwärts-Primer zur Klonierung der Sequenz von Nop5 in pET30a; das Stopcodon von Nop5 wurde eingefügt um den His ₆ - <i>tag</i> zu entfernen; Fusion mittels Gibson Assembly	Diese Arbeit

Material und Methoden

Tabelle 7.5. Oligonukleotide für die Klonierung der Sequenz für den Proteinkomplex CIs4-Rrp41-Rrp42 in iba-pASK-3⁺.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
41/42 rev	CTCCTTCTgtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttGCTATAC ACCCTCTCTTTAAAC	Rückwärts-Primer zur Fusionierung von <i>rrp41</i> und <i>rrp42</i> ; klein geschrieben ist die Sequenz der linker Region zwischen den beiden Genen; Fusion mittels Gibson Assembly	Diese Arbeit
41/42 fwd	gctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgac AGAAGGAG ATATACCATGTC TTCTACTCCATCAAACC	Vorwärts-Primer zur Fusionierung von <i>rrp41</i> und <i>rrp42</i> ; klein geschrieben ist die Sequenz der linker Region zwischen den beiden Genen; eine eigene Ribosomenbindestelle wurde eingefügt (in dicken Buchstaben dargestellt); Fusion mittels Gibson Assembly	Diese Arbeit
42/Csl4 rev	CTCCTCTTTggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagTTAG ATTCTAGATGCTTTTTAAG	Rückwärts-Primer zur Fusionierung von <i>rrp42</i> und <i>csl4</i> ; klein geschrieben ist die Sequenz der linker Region zwischen den beiden Genen; Fusion mittels Gibson Assembly	Diese Arbeit
42/Csl4 fwd	cgaccctgccgttaccggatacctgtcc AAAGAGGAGAA ATTACCTATGA GAACTCAAGGCGAATTAAC	Vorwärts-Primer zur Fusionierung von <i>rrp42</i> und <i>csl4</i> ; klein geschrieben ist die Sequenz der linker Region zwischen den beiden Genen; eine eigene Ribosomenbindestelle wurde eingefügt (in dicken Buchstaben dargestellt); Fusion mittels Gibson Assembly	Diese Arbeit
Csl4-XhoI rev	TGGTCCCCCTGCAGGTCGACCTTACTAATTTCACCTTTCTTCA CCATATAAG	Rückwärts-Primer zur Klonierung von <i>csl4</i> in iba-pASK-3 ⁺ über Gibson Assembly; iba-pASK-3 ⁺ geschnitten mit XhoI	Diese Arbeit

41-XbaI fwd	AATGAATAGTTCGACAAAAAT AGGAGGG CAAATATGCTTCAAGT GGAGAGACCAAAAC	Vorwärts- Primer zur Klonierung von <i>rrp41</i> in iba-pASK-3 ⁺ über Gibson Assembly; eine eigene Ribosomenbindestelle wurde eingefügt (in dicken Buchstaben dargestellt); iba-pASK-3 ⁺ geschnitten mit XbaI	Diese Arbeit
-------------	---	---	--------------

2.1.6.2 Oligonukleotide für *in vitro* Transkripte

Primer für Klonierungen der *in vitro* Transkription für 16S rRNA sind in der Publikation von Linlin Hou beschrieben [124].

Tabelle 8. Oligonukleotide zur Herstellung der Substrate mittels *in vitro* Transkription für Assays.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
<i>nuoH</i> _T7 fwd	gtaatacgactcactatagggCCCTGGTCTAATATTCACCTCTAA	Vorwärts-Primer zur <i>in vitro</i> Transkription des 121 bp langen NADH Transkriptes; T7-Primersequenz in klein	Diese Arbeit
<i>nuoH</i> rev	TATACCTCCTAATCGTTTAGATGC	Rückwärts-Primer zur <i>in vitro</i> Transkription der NADH Transkripte	Diese Arbeit
16S rRNA-fwd	gtaatacgactcactatagggTGAATACGTCCCTGCTCC	Vorwärts-Primer für die <i>in vitro</i> Transkription des 16S rRNA-Transkriptes; T7-Primersequenz in klein	[124]
16S rRNA-rev	GGAGGTGATCCAGCCGCAG	Rückwärts-Primer für die <i>in vitro</i> Transkription des 16S rRNA-Transkriptes	[124]
185179_T7 fwd	gtaatacgactcactatagggATATAAATTTAAATAGCGCC	Vorwärts-Primer zur <i>in vitro</i> Transkription von 185 179; T7-Primersequenz in klein	Diese Arbeit

Material und Methoden

185179 rev	GGCCTGGAGAGCCAGTGGGGGTTTC	Rückwärts-Primer zur <i>in vitro</i> Transkription von 185 179	Diese Arbeit
1 066 436_T7 fwd	gtaatacactcactatagggGCATATGCCGCTATGGCAAAT	Vorwärts-Primer zur <i>in vitro</i> Transkription von 1 066 436; T7-Primersequenz in klein	Diese Arbeit
1 066 436 rev	GGTGCCCTATTTGCGCATGC	Rückwärts-Primer zur <i>in vitro</i> Transkription von 1 066 436	Diese Arbeit

2.1.6.3 Oligonukleotide für RT-PCR

Tabelle 9. Oligonukleotide für den Nachweis zirkulärer RNA mittels RT-PCR.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
RT_circRS05855_juc fwd	GTAAAAAGCCCAGTTGAAGTTAAC	Vorwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis zirkulärer RNA der Transposase SSO_RS05855	Diese Arbeit
RT_circRS05855_juc rev	GCCCTAAGGGTTTGTTCGTCAG	Rückwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis zirkulärer RNA der Transposase SSO_RS05855	Diese Arbeit
RT_circRS05855_lin fwd	AATGCCACCTTAGGGTTTCG	Vorwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis linearer RNA der Transposase SSO_RS05855	Diese Arbeit
RT_circRS05855_lin rev	GTCTGCCACCTTAAGGTGTTG	Rückwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis linearer RNA der Transposase SSO_RS05855	Diese Arbeit

Material und Methoden

RT_circRS06560_juc fwd	AAAGGCCCAGTTGAAGTTAGCG	Vorwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis zirkulärer RNA der Transposase SSO_RS06560	Diese Arbeit
RT_circRS06560_juc rev	AACGCCCTAAGGGTTTGTTCG	Rückwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis zirkulärer RNA der Transposase SSO_RS06560	Diese Arbeit
RT_circRS06560_lin fwd	TGCCACCTTAGGGTTTCGCTTC	Vorwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis linearer RNA der Transposase SSO_RS06560	Diese Arbeit
RT_circRS06560_lin rev	ATGTCTGCCACCTTAAGGTG	Rückwärts-Primer für RT-PCR zum Nachweis linearer RNA der Transposase SSO_RS06560	Diese Arbeit

2.1.6.4 Sonden für Northern-Blot

Tabelle 10. Sonden für den Nachweis von RNA mittels Northern Blot.

Bezeichnung der Sonde	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung	Referenz
tRNA 185179 for	GAAACCCCACTGGCTCTCCAGGCC	Hybridisierungssonde zum Nachweis der im iCLIP detektierten antisense tRNA 185 179	Diese Arbeit
tRNA 185179 rev	GGCCTGGAGAGCCAGTGGGGGTTTC	Sonde zum Nachweis der tRNA 185 179	Diese Arbeit

2.1.7 Radioaktive Nukleotide

Tabelle 11. Nukleotide genutzt zum radioaktiven markieren von RNA.

Nukleotid	Konzentration	Hersteller
[α - ³² P]-UTP	3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik
[γ - ³² P]-ATP	3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik

2.1.8 Kits

Tabelle 12. Genutzte Kits dieser Arbeit.

Kit	Hersteller
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent
Gelex-Kit	Analytik Jena
Lumi Light Western Blotting	Roche
MiSeq® Reagent Kit v3	Illumina®
pJET cloning Kit	Thermo scientific
Protein, Plasmid and Nucleo Purification	Macherei und Nagel
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
the Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit	EURODEMEX

2.1.9 Enzyme

Tabelle 13. Genutzte Enzyme dieser Arbeit.

Enzym	Hersteller
Antarktische Phosphatase (5 U/ μ l)	New England Biolabs (NEB)
Phusion-Polymerase mit Puffern/dNTPs	Thermo Scientific
Proteinase K, PCR grade	Roche
Restriktionsenzyme (+ Puffer)	Fermentas
RNase A	QIAGEN
RNase R	Biozym®
RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)	Promega
T4-DNA-Ligase	NEB, Thermo Fisher
T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)	NEB
T4-RNA-Ligase	Thermo Fisher
T7-RNA-Polymerase	NEB
Taq-DNA Ligase	NEB
Taq-DNA-Polymerase	NEB
TURBO DNase	Invitrogen

2.1.10 Größenstandards

Tabelle 14. Genutzte Größenstandards dieser Arbeit.

Größenstandard	Hersteller
<i>GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus</i>	Thermo Scientific
<i>GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus</i>	Thermo Scientific
<i>Low Range Protein Marker</i>	Biorad
<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i>	NEB

2.1.11 Antikörper

Tabelle 15. Genutzte Antikörper dieser Arbeit.

Antikörper	Hersteller
Anti-SsoRrp41 (Kaninchen, Antiserum)	BioGenes GmbH
Anti-SsoRrp4 (Kaninchen, Antiserum)	BioGenes GmbH
Anti-trx (Kaninchen, Antiserum)	David Biotechnologie
Anti-Rabbit IgG, Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich

2.1.12 Medium

Tabelle 16. Genutzte Medien dieser Arbeit.

Medium	Bestandteil	Bemerkung
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt ad 1 Liter mit ddH ₂ O	muss autoklaviert werden
Standard I – Medium	25 g Standard-I Nährmedium (Roth) ad 1 Liter mit ddH ₂ O	muss autoklaviert werden
LB-Agar Platten	15 g Agar ad 1 Liter mit LB-Medium	muss autoklaviert werden
Standard I-Agar Platten	37 g Standard I-Nähragar (Roth) ad 1 Liter mit ddH ₂ O	muss autoklaviert werden
<i>Sulfolobus solfataricus</i> Medium (<i>S.so</i> Medium)	1 g Hefeextrakt 1 g Casaminosäuren 3.1 g KH ₂ PO ₄ 2.5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0.25 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf einen Wert zwischen 4.2 und 4.4 eingestellt. Vor Nutzung des Mediums wurden 10,0 µl steril filtriertes VOSO ₄ (3 mg/ml) auf ein Liter

100 µl MnCl ₂ x 4 H ₂ O (18 mg/ml)	S.so Medium zugesetzt.
100 µl Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O (45 mg/ml)	
10 µl ZnSO ₄ x 7 H ₂ O (22 mg/ml)	
10 µl CuCl ₂ x 2 H ₂ O (6 mg/ml)	
10 µl NaMoO ₄ x 2 H ₂ O (3 mg/ml)	
10 µl CoCl ₂ x 6 H ₂ O (3 mg/ml)	
ad 1 Liter mit ddH ₂ O	

2.1.13 Software

Tabelle 17. Genutzte Software dieser Arbeit.

Software	Server
QuantityOne	BioRad
T-Coffee Server	[161]
IGB - <i>integrated genome browser</i>	[162]
Nucleotide BLAST	[163]
ExpASy – compute pI/Mw tool	[164]
ClustalW2	[165]

2.1.14 Puffer und Lösungen

Tabelle 18. Auflistung von allgemeinen Puffern.

Lösung	Bestandteil
1x TBS	200 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 7,4
10x TAE	400 mM Tris 200 mM Essigsäure 10 mM EDTA
10x TBE	1 M Tris-HCl 1 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,3
10x TE	100 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA

1 x PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	2 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde 1 ml DEPC in 1 Liter ddH₂O gegeben und über Nacht unter dem Abzug zum abdampfen gestellt. Am nächsten Tag wurde das DEPC-Wasser autoklaviert.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Messung der optischen Dichte

Über die Messung der optischen Dichte (OD) konnten sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Wachstumsphase des Mikroorganismus bestimmt werden. Die OD beschreibt die Abschwächung des Lichtes, wenn es das Medium durchtritt und an Partikeln gestreut wird. Zur Messung wurde 1 ml der Zellkultur steril abgenommen und mittels Plastik-Küvette (Sarstedt) im Photometer vermessen. Als Referenzwert diente jeweils 1 ml des Mediums in welchem der Mikroorganismus angezogen wurde. Sowohl *E. coli* als auch *S. solfataricus* Kulturen wurden bei einer OD von 600 nm gemessen. Ab einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Zellen mittels Medium für eine exakte Messung verdünnt.

2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde entweder als Flüssigkulture oder auf Nährplatten angezogen. Nährplatten wurden als Vorstufe für Flüssigkulturen von *E. coli* angelegt, welche wiederum im Anschluss z.B. für Wachstumskurven oder zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* genutzt wurden. Glycerinkulturen hingegen dienten der Konservierung von *E. coli*.

2.2.2.1 Kultivierung von *E. coli* auf Nährplatten

Um *E. coli* auf Platte anzuziehen, wurden Glycerinkulturen von *E. coli* auf einer Agarplatte (bei Bedarf mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.2 Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedium

Für Flüssigkulturen von *E. coli* wurden Einzelkolonien von Platte in Flüssigmedium angeimpft und bei 180 rpm und 37°C über Nacht herangezogen. Medien wurden dafür bei Bedarf mit entsprechendem Antibiotikum in angegebener Konzentration (siehe Tabelle 4) versetzt. Das Volumen einer Bakterienkultur betrug bis zu 25% des Gesamtvolumens des genutzten Erlenmyerkolbens.

2.2.3 Glycerinkulturen *E. coli*

Für Glycerinkulturen von *E. coli* wurden zunächst 2 ml Übernachtskultur bei 4 000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 1 ml frischem Standard I Medium aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 ml 80%-igem Glycerin (Endkonzentration 25%) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C.

2.2.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* wurden genutzt, um Ligationsansätze oder Plasmide zu transformieren (siehe Kapitel 2.2.6).

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurde der entsprechende Stamm über Nacht auf Platte (bei Bedarf mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) ausgestrichen und für das Anlegen einer Flüssig-Übernachtskultur genutzt.

100 ml LB-Medium (bei Bedarf mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) wurden mit 2 ml Mg²⁺-Lösung sowie 1 ml der *E. coli* Übernachtskultur versetzt und bei 37°C bis OD₆₀₀ 0,5 - 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden bei 4000 rpm über 10 min, 4°C, abzentrifugiert und das Pellet in insgesamt 25 ml eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurde der Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wiederholt und das Zellpellet in 5 ml eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 1 ml kaltem 100%-igem Glycerin versetzt und im Anschluss in 100 µl Aliquotes in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

Tabelle 19. Lösungen für die chemisch kompetente *E. coli*.

Lösung	Bestandteil	Bemerkung
TMF-Puffer	100 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 40 mM MnCl ₂ x4 H ₂ O 50 mM RbCl	Autoklaviert
Mg ²⁺ -Lösung	500 mM MgCl ₂ 500 mM MgSO ₄	Autoklaviert

2.2.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Elektrokompetente *E. coli* wurden genutzt, um Ligationsansätze oder Plasmide zu transformieren (siehe Kapitel 2.2.7).

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurde der entsprechende Stamm über Nacht auf Platte ausgestrichen und für das Anlegen einer Flüssig-Übernachtskultur genutzt.

1 Liter LB-Medium wurde mit 10 ml der *E. coli* Übernachtskultur versetzt und bei 37°C bis OD₆₀₀ 0,5 – 1,0 kultiviert. Nach Erreichen der OD₆₀₀ wurden die Zellen zunächst für 15 – 30 min auf Eis heruntergekühlt bevor sie bei 4 000 g über 15 min, 4 °C, abzentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 1 Liter eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und der Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wiederholt. Das Pellet wurde erneut in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und zentrifugiert. Durch die mehrmaligen Waschschrte mit sterilem Wasser wird gewährleistet, dass Ionen abgewaschen werden und somit eine Elektroporation der Zellen möglich wird. Die Zellen wurden jetzt in 20 ml eiskaltem 10%-igen Glycerol aufgenommen und erneut sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in ein finales Volumen von 2 – 3 ml 10%-igen Glycerol aufgenommen, mit einer Zellkonzentration von ca. 1 – 3 x 10¹⁰ Zellen/ml. Die Zellen wurden zu je 50 – 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6 Transformation mittels Hitzeschock von *E. coli*

Mittels Hitzeschock konnten Ligationsansätze in *E. coli* eingebracht werden. Dafür wurden chemisch kompetente *E. coli* (50 µl Zellen pro Transformationsansatz) auf Eis aufgetaut und für 15 min mit dem Transformationsansatz auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Hitzeschock bei 42°C der Zellen über 25 Sekunden. Währenddessen wird die Zellmembran reversibel in ihrer Integrität gestört,

wodurch die Zellen die DNA aufnehmen können. Die Zellen wurden nochmals für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Zur Resistenzausbildung wurden die Zellen mit 1 ml frischem Standard I Medium versetzt und für 45 min bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen für 2 min bei 1500 g abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl Standard I Medium resuspendiert und auf einer Agarplatte (versetzt mit dem entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

2.2.7 Transformation mittels Elektroporation von *E. coli*

Mittels Elektroporation konnten Ligationsansätze in *E. coli* eingebracht werden. Elektrokompetente *E. coli* (50 µl Zellen pro Transformationsansatz) wurden dafür auf Eis aufgetaut und für 2 min mit dem 1 - 10 µl Transformationsansatz inkubiert. Mittels elektrischem Impuls von 2.5 kV wurden die Zellen transformiert. Durch die angelegte Spannung wird die Zellmembran temporär permeabilisiert wodurch es zur Aufnahme von DNA aus dem Transformationsansatz kommt. Zur Resistenzausbildung wurden die Zellen mit 1 ml frischem Standard I Medium versetzt und für 45 min bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen für 2 min bei 1500 g abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl Standard I Medium resuspendiert und auf einer Agarplatte (versetzt mit dem entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

2.2.8 Flüssigkulturen von *Sulfolobus solfataricus*

Zur Anzucht von *S. solfataricus* wurden Flüssigkulturen angelegt, welche im Anschluss genutzt wurden um z.B. mittels Co-Immunopräzipitation das Exosom zu isolieren.

Für Flüssigkulturen wurde jeweils eine Glycerinkultur von *S. solfataricus* in *S.so*-Medium überimpft und aerob bei 120 rpm und 70 °C auf dem Schüttler herangezogen. Nach ca. einer Woche (OD_{600} 0,7 – 0,8) erfolgte die Überimpfung mit ca. 10% der Kultur in frisches *S. solfataricus*-Medium.

Für die Kultivierung von *S. solfataricus* im Fermenter, wurde der Fermenter zunächst mit acht Litern *S. solfataricus* -Medium befüllt, auf 60°C erwärmt und im Anschluss mit ca. zwei Litern *S. solfataricus* -Flüssigkultur angeimpft. Die Ernte von *S. solfataricus* erfolgte in der stationären Wachstumsphase (OD_{600} 0,7 – 0,8) nach ca. 4 - 5 Tagen. Die allgemeine Kultivierung von *S. solfataricus* im Fermenter erfolgte unter Zufuhr von 4 l O₂/min, 60 rpm Rührgeschwindigkeit sowie 60°C.

2.2.9 Glycerinkulturen *S. solfataricus*

Glycerinkulturen dienen der Konservierung von *S. solfataricus*.

Für Glycerinkulturen von *S. solfataricus* wurden 10 ml Übernachtskultur (OD₆₀₀ 0,5) bei 1500 g und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 0,5 ml frischem *S.so*-Medium aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 ml 100%igem Glycerin (Endkonzentration 50%) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Elektrophorese – Techniken

Bei Elektrophoresen wird ausgenutzt, dass negativ geladene Moleküle im elektrischen Feld von Anode in Richtung der Kathode wandern. Form, Größe sowie Eigenladung beeinflussen dabei die Geschwindigkeit der Moleküle im elektrischen Feld. Durch die Gelmatrix (Agarose oder Polyacrylamid) wandern kleine Moleküle schneller im elektrischen Feld als große Moleküle, welche aufgrund der Quervernetzung der Gelmatrix aufgehalten werden. Bei Elektrophoresen zur Auftrennung von Nukleinsäuren, sorgt das Phosphatrückrad der Nukleinsäuren für deren natürliche negative Ladung. Bei Proteinen wird u.a. SDS als negativer Ladungsvermittler verwendet.

2.3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden ab ca. 100 bp mittels 1,5%-iger TAE-Agarose aufgetrennt. Für die Gele wurde die entsprechende Menge Agarose eingewogen und mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Die Agarose wurde durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle in TAE-Puffer vollständig gelöst bevor sie in Gelschlitten gegossen und in diesen ausgehärtet wurde. Für analytische Gele wurden kleine Kämme mit ca. 10 µl Fassungsvermögen, für präparative Gele große Kämme mit ca. 100 µl Fassungsvermögen verwendet. Die Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt, wodurch sie, durch das enthaltene Glycerin im Ladepuffer, in die Taschen sanken und bei 120 Volt für ca. 30 – 45 min in 1x TAE-Puffer aufgetrennt wurden. Im Anschluss wurden die Gele mittels Ethidiumbromid im Färbebad gefärbt. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren. Durch Anregung mittels UV (UV-Tisch) kommt es zur Fluoreszenzemission und somit zur Detektion der Nukleinsäuren im Gel.

Für 200 ml Färbebad wurden 2 – 3 Tropfen einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) in Wasser gegeben.

2.3.1.2 Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente bis ca. 100 bp bzw. sehr gering konzentrierte DNA-Fragmente wurden mittels TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wurde das Minigelsystem der Firma Hoefer verwendet, die Komponenten der Gele sind in Tabelle 20 aufgelistet. Die Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer (Tabelle 21) versetzt und bei 120 Volt für ca. 60 min in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele wie bereits beschrieben (Kapitel 2.3.1.1) mittels Ethidiumbromid im Färbebad gefärbt und mit UV detektiert.

Tabelle 20. Komponenten für ein Mini-TBE-PAA-Gel.

Komponenten für ein Mini-TBE-PAA-Gel (10%)	Volumen; $\Sigma = 6$ ml
10x TBE	0,6 ml
40% Acrylamide	1,5 ml
ddH ₂ O	ad 6 ml

Die gelisteten Komponenten wurden gemischt und im Anschluss mit APS und TEMED versetzt um den Polymerisierungsvorgang auszulösen:

10% APS	24 μ l
TEMED	6 μ l

Tabelle 21. Komponenten des 10x DNA-Ladepuffers

Lösung	Komponenten
10x DNA-Ladepuffer	0,1 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl

2.3.1.3 Gelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA mittels Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen bzw. PAA-Gelen wird im Detail in Kapitel 2.3.27 und 2.3.28 bezüglich der Degradations-/Polyadenylierungs-Assays bzw. EMSA-

Techniken beschrieben. Im Anschluss können die Gele wie bereits beschrieben (Kapitel 2.3.1.1) mittels Ethidiumbromid im Färbegrad gefärbt und mit UV detektiert werden.

2.3.1.4 SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wird im Detail in Kapitel 2.3.11 beschrieben.

2.3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen über Kit

Um spezifische DNA Fragmente zu isolieren (z.B. geschnittenen Vektor von ungeschnittenem Vektor), wurde zunächst eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden präparative 1,5%ige TAE-Gele verwendet. Die DNA-Probe wurde mit DNA-Ladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und im Anschluss auf das Gel aufgetragen. Zu beachten ist, dass 5 µl der Probe in eine kleine Tasche zwischen Marker und einer großen Tasche aufgetragen wurde, die restliche Probe wurde in die große Tasche geladen. Nach Gellauf wurde das Gel zwischen kleiner und großer Tasche durchgeschnitten und nur der Gelteil mit kleiner Tasche und Marker mittels Ethidiumbromid gefärbt und dem UV-Licht ausgesetzt. Grund dafür war, dass UV-Licht DNA schädigt, indem nahe beieinander liegende Thyminreste quervernetzt werden können, was zur Bildung von Thymindimeren führt. Aus dem kleinen Gelabschnitt wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und das kleine Gel im Anschluss als Schablone für den richtigen Schneideort des großen Gels verwendet.

Mittels Gelextraktion-Kit wurde die DNA im Folgenden aus dem Agarose-Gel extrahiert: 650 µl Gellöser wurde auf maximal 0,3 g Agarose aufgetragen und die Agarose bei 50 – 60°C gelöst. Nach Zusatz von 50 µl Bindungsoptimierer wurde das Agarose-Gemisch auf die Säulchen pipettiert und bei 17 000 g abzentrifugiert. Hierbei kommt es zur Bindung der DNA an das Säulenmaterial, gelöste Agarose im Durchfluss wird verworfen. Im Anschluss wird mittels 700 µl Waschpuffer die gebundene DNA gewaschen und darauf folgend für 1 min trocken zentrifugiert. Das Säulchen wird in ein frisches 1,5 ml Eppendorftube gesetzt und mittels 50 µl ddH₂O über 2 min bei 17 000 g eluiert. Der Durchfluss wurde nochmals auf das Säulchen gegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die RNA- oder DNA haltige Lösung mittels NanoDrop bei einer Wellenlänge von 280 sowie 260 nm vermessen. Nukleinsäuren absorbieren dabei im Wellenlängenbereich von 260 nm, wohingegen der Absorptionsbereich von Proteinen bei 280 nm liegt. Dadurch lässt sich einerseits feststellen wie hoch die Konzentration der Nukleinsäure in der Lösung ist und andererseits wie rein die Nukleinsäure vorliegt. Der Reinheitsgrad ($A = 260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$) sollte dabei für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen. Bei der Messung von DNA wird das Programm DNA-50 gewählt, bei RNA das Programm RNA-40, bezogen auf den Extinktionskoeffizienten, welcher bei doppelsträngiger DNA mit 50 und bei einzelsträngiger RNA mit 40 angegeben ist. Eine Absorption von 1 bedeutet, dass die Probe 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA enthält. Als Referenz dient jeweils der Puffer, in welchem die Nukleinsäuren aufgenommen wurden.

2.3.4 Isolation chromosomaler DNA von *S. solfataricus*

30 ml einer *Sulfolobus solfataricus* Kultur mit einer OD_{600} von 0,3 – 0,4 wurde bei 1 200 g über 20 min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 250 µl TEN Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels Zusatz von 250 µl TENST Puffer. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zwei Phenol-Chloroform Extraktionen vollzogen. Die obere Phase wurde im Anschluss in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Tube transferiert und mit 0,7 Volumen von Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und bei 13 000 rpm über 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte mit dem zweifachen Volumen von 96%-igem Ethanol und 1/10 Volumen von 3 M Natriumacetat pH 4.5 für eine Stunde bei -20°C. Die DNA wurde während einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13 000 rpm pelletiert und im Anschluss mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mittels Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in ddH₂O, versetzt mit 10 µg/ml RNase A, aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Tabelle 22. Komponenten für Isolation chromosomaler DNA von *Sulfolobus solfataricus*.

Puffer	Komponenten
TEN Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8 100 mM NaCl 1 mM EDTA

TENST Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1,6 % Na-Lauroylsarcosyl 0,12 % Triton-X-100
--------------	--

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR)

Die Komponenten für eine PCR mit Phusion® Polymerase sind in folgender Tabelle 23 aufgelistet:

Tabelle 23. Komponenten für PCR-Reaktionen mit Phusion® Polymerase.

Volumen; Σ = 50 µl	Komponenten
10 µl	5x HF-Puffer
1 µl	100 mM dNTP's
1 µl	100 ng/µl Matritze (chromosomale DNA)
1 µl	10 pM vorwärtiger Primer
1 µl	10 pM rückwärtiger Primer
1 µl	Phusion® Polymerase (eigenproduziert)
ad 50 µl	ddH ₂ O

Die Bedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tabelle 24 aufgeführt:

Tabelle 24. Bedingungen für PCR-Reaktionen mit Phusion® Polymerase.

Temperatur	Zyklus	Zeit	Bemerkung
98 °C	1	5 min	initiale Denaturierung
98 °C	} 35 Zyklen	30 s	Denaturierung
52 °C		30 s	Anlagerung der Primer
72 °C		1 min/kb	Elongation
72 °C	1	7 min	Fertigstellen der Replikationsprodukte

2.3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Fusion von Einzelfragmenten (PCR)

Eine PCR kann auch dafür genutzt werden um zwei einzelne DNA-Fragmente miteinander zu fusionieren (Abbildung 9). Dafür werden zunächst beide DNA-Fragmente, mit zueinander

komplementären Überhängen, einzeln amplifiziert. Die Überhänge der beiden DNA-Fragmente dienen im Anschluss dafür, dass sich diese aneinander lagern können. In einer zweiten PCR kann so danach ein einziges PCR-Produkt voller Länge amplifiziert werden. Dabei ist wiederum zu beachten, dass die zweite PCR-Reaktion in zwei Schritte unterteilt ist: Während der ersten 10 Zyklen werden keine Primer verwendet um zu gewährleisten, dass nach Anlagerung der beiden DNA-Fragmente, die Polymerase die Fusionsfragmente zu einem Fragment voller Länge aufgefüllt. Erst nach Auffüllung werden die äußersten Primer genutzt um das Fusionsfragment zu vervielfältigen.

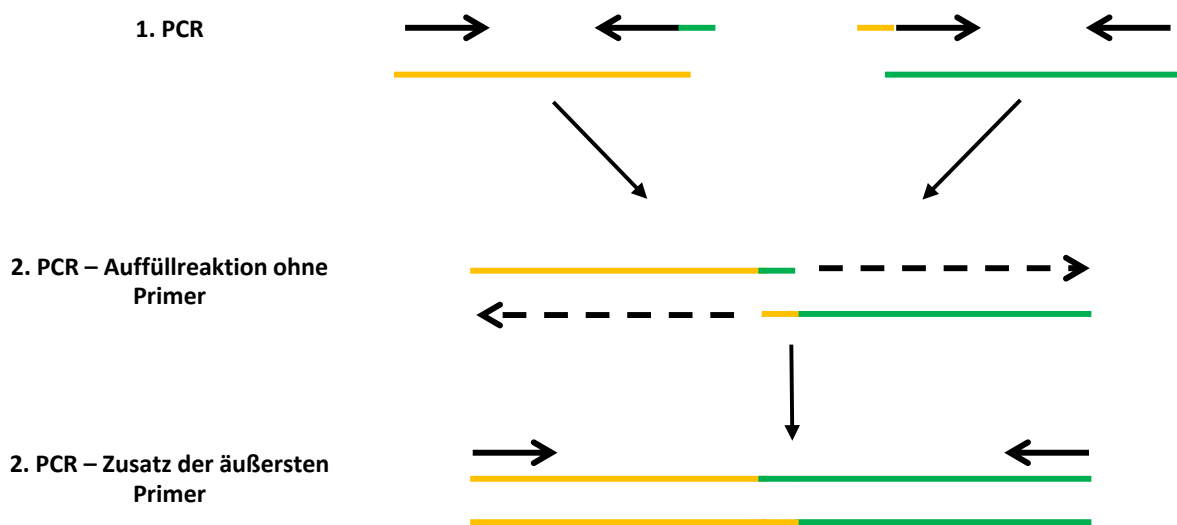


Abbildung 9. Schematische Illustration für PCR-Reaktion zur Fusion von Einzelfragmenten.

Die Primer für die Fusions-PCR werden so designt, dass PCR-Produkte aus der ersten PCR komplementäre 15 - 20 bp lange Überhänge aufweisen (siehe Abbildung 9). Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mittels PCR-Purification-Kit aufgereinigt und in der zweiten folgenden PCR-Reaktion ohne Primer miteinander verbunden: Während des Anlagerungsschrittes (52°C) lagern sich die PCR-Produkte an ihren komplementären Überhängen aneinander und werden zum Produkt voller Länge während der Elongation aufgefüllt. Zur folgenden Amplifikation des Fusionsproduktes werden im Anschluss die zwei äußersten Primer der PCR zugesetzt und das Fusions-PCR-Produkt für weitere Verwendung über das PCR-Purification-Kit aufgereinigt.

Tabelle 25. Bedingungen für Fusions-PCR-Reaktionen mit Überhang-Primern und Phusion® Polymerase.

Temperatur	Zyklus	Zeit	Bemerkung
98 °C	1	5 min	initiale Denaturierung
98 °C	} 13 Zyklen, wobei die Anlagerungstemperatur in jedem Zyklus um ein Grad sinkt	30 s	Denaturierung
68 °C – 53 °C		30 s	Anlagerung der Primer
72 °C		1 min/kb	Elongation
98 °C	} 20 Zyklen	30 s	Denaturierung
52 °C		30 s	Anlagerung der Primer
72 °C		1 min/kb	Elongation
72 °C	1	7 min	Fertigstellen der Replikationsprodukte

2.3.5.2 Kolonie-PCR

Mittels Kolonie-PCR und Taq-Polymerase wurden Kolonien für positive Transformanten von *E. coli* untersucht. Komponenten der PCR-Reaktion mit Taq-Polymerase sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 26. Komponenten für PCR-Reaktionen mit Taq-Polymerase.

Volumen; $\Sigma = 10 \mu\text{l}$	Komponenten
1 μl	10x Taq-Puffer
0,1 μl	100 mM dNTP's
	Template (<i>E. coli</i> Kolonie)
0,1 μl	10 pM vorwärtiger Primer
0,1 μl	10 pM rückwärtiger Primer
0,1 μl	Taq-Polymerase (5 U/ μl)
ad 10 μl	ddH ₂ O

Mit einer Pipettenspitze wurde eine Kolonie von Platte angepickt und in den PCR-Ansatz überführt. Die gleiche Pipettenspitze wurde genutzt um einen Abstrich für eine eventuelle spätere flüssige Übernachtskultur auf Platte aufzulegen.

Tabelle 27. Bedingungen für PCR-Reaktionen mit Taq-Polymerase.

Temperatur	Zyklus	Zeit	Bemerkung
94 °C	1	5 min	Initiale Denaturierung
94 °C	} 35 Zyklen	30 s	Denaturierung
52 °C		30 s	Anlagerung der Primer
72 °C		1 min/kb	Elongation
72 °C	1	7 min	Fertigstellen der Replikationsprodukte

2.3.6 Klonierung mittels Restriktionsverdau und Ligation

2.3.6.1 Restriktionsverdau

Um PCR-Produkte in die gewünschten Vektoren ligieren zu können wurden sowohl Vektoren als auch PCR-Produkte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Dabei war zu beachten, dass die Restriktionsenzyme sowohl den Vektor als auch das PCR-Produkt nur einmalig schneiden.

Tabelle 28. Komponenten für den Restriktionsverdau von Plasmiden / PCR-Produkten.

Volumen; $\Sigma = 50 \mu\text{l}$	Endkonzentration
1 μl	Enzym 1 (10 U/ μl)
1 μl	Enzym 2 (10 U/ μl)
5 μl	10x Reaktionspuffer
x μl	10 μg Plasmid / PCR-Produkt
Ad 50 μl	ddH ₂ O

Entsprechend den Herstellerhinweisen ist 1 Unit Enzym in der Lage 1 μg DNA in einer Stunde bei 37°C in einem 50 μl -Ansatz zu verdauen.

Der Restriktionsansatz wurde über zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 5,0 μl des Ansatzes zur Überprüfung auf ein 1,5% -haltiges Agarosegel aufgetragen. Geschnittene PCR-Produkte, welche nur eine klare Bande aufwiesen, wurden mittels PCR-Purification Kit aufgereinigt, geschnittene Vektoren wurden über Gel separiert und im Anschluss mittels Gelextraktions-Kit aufgereinigt.

2.3.6.2 Ligation

Tabelle 29. Komponenten für die Ligation von Plasmiden mit PCR-Produkten.

Volumen; $\Sigma = 20 \mu\text{l}$	Endkonzentration	
1 μl	T4-DNA-Ligase (1U/ μl)	
x μl	Plasmid, aufgereinigt	
y μl	Insert, aufgereinigt	} insgesamt 100 ng
2 μl	10x Reaktionspuffer	
Ad 20 μl	ddH ₂ O	

Beim Ligationsansatz ist zu beachten, dass das Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 betragen sollte. Um auch die Größen von Vektor und Insert in der Verhältnisrechnung zu berücksichtigen wurde die Konzentration der DNA in pmol errechnet. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen wurde die Ligase im Anschluss bei 65°C für 10 min inaktiviert.

2.3.7 Klonierung mittels Gibson Assembly

Das Gibson *Assembly* wurde in dieser Arbeit verwendet, um bis zu drei Inserts (PCR-Produkte) in einen Vektor über einen Schritt zu ligieren. Die PCR-Einzelfragmente müssen dafür an ihren Fusionsstellen bzw. mit dem Vektor 20 bp komplementäre Überhänge aufweisen. Für den Ligationsansatz mit Gibson *Assembly* wurden ca. 10 – 100 ng jedes einzelnen DNA-Fragmentes sowie dem Vektor in einem Volumen von insgesamt 5,0 μl eingesetzt. Dabei sollte der Vektor ca. 2 – 3 fach so hoch konzentriert wie das Insert vorliegen. Der Ansatz wurde zu 15,0 μl Ligations-Mastermix zugesetzt und für eine Stunde bei 50°C inkubiert. Während dieser Zeit findet die Anlagerung von komplementären Überhängen zwischen Inserts bzw. zwischen Insert und Vektor statt. Eine Auffüllung der Lücken erfolgt durch die Phusion®-Polymerase und eine anschließende Ligation durch die Taq-DNA-Ligase. Im Anschluss erfolgte die Transformation des gesamten Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* Zellen.

Tabelle 30. Komponenten für den Gibson-*Assembly* Master-Mix.

Volumen; $\Sigma = 1200 \mu\text{l}$	Komponenten	Bemerkung
320 μl	5x isothermischer Reaktionspuffer	Der Ligations-Mastermix wurde zu je 15,0 μl aliquotiert und bei -20°C bis zur Benutzung eingefroren.
0,64 μl	T5 Exonuclease (10 U/ μl)	
20 μl	Phusion® DNA Polymerase (2 U/ μl)	
160 μl	Taq-DNA-Ligase (40 U/ μl)	
ad 1200 μl	ddH ₂ O	

Tabelle 31. Komponenten für den 5x isothermischen Reaktionspuffer.

Volumen; $\Sigma = 1 \text{ ml}$	Komponenten	Endkonzentration
0,25 g	PEG 800	25% (w/v)
500 μl	Tris-HCl, pH 7.5	500 mM
25 μl	MgCl ₂	50 mM
50 μl	DTT	50 mM
50 μl	NAD	5 mM
4 x 10 μl	je dNTP	1 mM
ad 1 ml	ddH ₂ O	

2.3.8 pJET - Klonierungen

Mittels pJET-Klonierungsstrategie können Klone mit erfolgreich transformierten Plasmiden bereits auf Platte selektiert werden: Der Vektor ist so designt, dass er ein letales Restriktionsenzymgen enthält, welches bei Ligation eines Inserts in die Multiple-Cloning-Site unterbrochen wird. In Folge dessen können nur Kolonien auf Platte überleben, welche rekombinante Plasmide enthalten [166].

Die Ligation zwischen Vektor und Insert erfolgt über Blunt-Ends.

Für eine erhöhte Transformationseffizienz wurden PCR-Produkte zunächst mittels Blunting-Enzym behandelt, welches Teil des pJET-Kits ist. Das Blunting Enzyme ist eine DNA-Polymerase, welche in der Lage ist ss-DNA-Überhänge aufzufüllen.

Tabelle 32. Blunting-Reaktionsansatz.

Volumen; $\Sigma = 18 \mu\text{l}$	Komponenten
1 μl	PCR-Produkt
1 μl	Blunting-Enzym
10 μl	2x Reaktionspuffer
Ad 18 μl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde kurz gevortext und für 5 min bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz auf Eis gestellt und mit 1,0 µl pJET-Vektor sowie 1,0 µl T4-DNA-Ligase ergänzt. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der Ligationsansatz wurde danach für 5 min auf 70°C erhitzt um die Ligase zu inaktivieren. Auch dies steigert zusätzlich die Transformationseffizienz. Um den Ligationsansatz von Salzen zu befreien, wurde der Ansatz auf Dialyseblättchen pipettiert und für 30 min auf ddH₂O inkubiert. Die Hälfte des Gesamtansatzes wurde im Anschluss in elektrisch kompetente JM109 Zellen mittels Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.7) transformiert.

2.3.9 Plasmid-Minipräparation (alkalische Lyse) von *E. coli*

Die Plasmidisolation aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly, 1979 [167].

Für die Präparation von Plasmid-DNA von *E. coli* wurden 2 ml Übernachtskultur über 2 min bei 13 000 rpm pelletiert und im Anschluss in 300 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zur Lyse der Zellen, sowie zur Denaturierung von DNA und Proteinen, 300 µl Lösung 2 zugesetzt, die Eppendorftubes mehrmals invertiert und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Renaturierung der Plasmid-DNA wurde im Anschluss 300 µl eiskalte Lösung 3 zugesetzt, die Eppendorftubes stark geschüttelt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach darauf folgender 20-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C erfolgte die Trennung von denaturierten Zellbestandteilen und löslicher Plasmid-DNA. Der Überstand wurde in frische Eppendorftubes überführt und die Plasmid-DNA mittels Zugabe von 0,7x Volumen Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation über 10 min bei Raumtemperatur und 13 000 rpm wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und das Präzipitat im Vakuum getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Tabelle 33. Lösungen für die Plasmid-Minipräparation von *E. coli*.

Lösung	Komponente	Bemerkung
Lösung 1	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA pH 8 + 1 µl RNase A/ ml (frisch zugesetzt)	Autoklaviert, 4°C Lagerung
Lösung 2	200 mM NaOH 1 % SDS	frisch hergestellt , Lagerung bei Raumtemperatur
Lösung 3	3 M Kaliumacetat pH 4,8	pH-Wert Angleichung mit 100% Essigsäure, Autoklaviert, 4°C Lagerung

2.3.10 Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Assay

Das *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Assay* wurde in dieser Arbeit angewendet, um die physische Interaktion zwischen Proteindomänen oder Proteinen zu untersuchen.

Das Prinzip des Assays basiert dabei der Funktionalität der Adenylatcyclase, welche bei Aktivität cAMP produziert. Das cAMP bindet im Anschluss an das *Catabolite-Activator Protein* (CAP). Der cAMP-CAP-Komplex erkennt daraufhin den *lac*-Promotor und induziert diesen, wodurch das im Assay eingesetzte X-Gal umgesetzt werden kann.

Die zwei Teilgensequenzen Adenylatcyclase (T18 sowie T25) liegen auf zwei separaten Plasmiden, für eine Funktionalität der Adenylatcyclase jedoch müssen, nach Genexpression, beide Domänen in der Lage sein, miteinander zu interagieren. An die beiden Gensequenzen der Adenylatcyclase werden die Nukleotidsequenzen der zu untersuchenden beiden Proteine bzw. Proteindomänen fusioniert. Kommt es nach Proteinexpression zur Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine, können auch die beiden Domänen der Adenylatcyclase miteinander interagieren. Dies resultiert in einer Aktivität der Adenylatcyclase. cAMP wird produziert und X-Gal kann umgesetzt werden. Da X-Gal Bestandteil des Nähragars ist, kommt es bei Aktivität der Adenylatcyclase zu einer blauen Koloniefarbe der Bakterien, wodurch entsprechend auf eine Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteine geschlossen werden kann.

Für das Assay wurden die entsprechenden Nukleotidsequenzen der Proteindomänen bzw. des Proteins gesamter Länge, mittels PCR amplifiziert und im Anschluss unter Nutzung des Gibson

Assemblies in folgende Plasmide ligiert: pKT25, pKTN25, pUT18 und pUT18C. Proteindomänen wurden jeweils an den "C"-Terminus oder den "N"-Terminus der T18 oder T25-Domäne der Adenylatcyclase fusioniert. Die Vektoren wurden anschließend in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α transformiert und sequenziert. Korrekte Plasmide wurden daraufhin für eine Co-Transformation in 20,0 μ l chemisch kompetente *E. coli* BTH 101 genutzt. Folgendes Muster der Co-Transformation wurde verwendet:

pUT18C-“Protein 1” x pKTN25-“Protein 2”

pUT18C-“Protein 1” x pKT25-“Protein 2”

pUT18-“Protein 1” x pKTN25-“Protein 2”

pUT18-“Protein 1” x pKT25-“Protein 2”

pKTN25-“Protein 1” x pUT18C-“Protein 2”

pKTN25-“Protein 1” x pUT18-“Protein 2”

pKT25-“Protein 1” x pUT18C-“Protein 2”

pKT25-“Protein 1” x pUT18-“Protein 2”

Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle (pKT25-zip, pUT18C-zip), sowie Negativkontrolle (EVK pKT25, EVK pUT18C) in je 20,0 μ l *E. coli* BTH 101-Zellen transformiert. Die transformierten *E. coli* BTH 101 Zellen wurden nach Regenerationszeit (siehe Hitzeschocktransformation) direkt in Km und Ap haltiges Standard-I Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Flüssigkulturen auf Platten getropft, welche Km, Ap, X-Gal (40 μ g/ml) sowie IPTG (0.5 mM Endkonzentration) enthielten und bei 32°C über Nacht inkubiert. Durch eine Blaufärbung der Kolonien konnte auf eine Aktivität der Adenylatcyclase und somit auf eine Interaktion der Proteindomänen rückgeschlossen werden.

2.3.11 SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophorese) von Proteinen

Proteine wurden in dieser Arbeit mittels SDS-PAGE Analyse nach Laemmli (1970) der Größe nach aufgetrennt [168]. SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) dient dabei der Denaturierung der Proteinproben: Nichtkovalente Bindungen werden aufgelöst und die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine wird zerstört. Zudem überlagert die negative Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine, wodurch die Proteine ausschließlich ihrer Größe nach getrennt werden. Zusätzlich wird, durch die unterschiedlichen pH-Werte von Sammelgel (pH 6.8) und Trenngel (pH 8.8), eine scharfe Auftrennung der Proteine gewährleistet, da die Proteine zunächst an der Front zwischen Sammel-

und Trenngel konzentriert werden bevor sie in das Trenngel übertreten: Chloridionen liegen im Sammelgel stark negativ geladen vor, sie bilden die Leitonen. Glycinionen liegen dagegen als Zwitterionen vor und sind aufgrund ihrer geringen Eigenladung deutlich langsamer, sie bilden die Folgeionen. Die aufzutrennenden Proteine werden in Folge dessen zwischen Leit- und Folgeionen gesammelt und kommen gemeinsam an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel an. Durch die pH-Wert Änderung im Trenngel werden die Glycinionen im Anschluss vollständig dissoziiert und ihre negative Ladung steigt. Dadurch überholen die Glycinionen die aufzutrennenden Proteine, welche in Folge dessen aus der Konzentrationszone zwischen Leit- und Folgeionen entlassen und im Trenngel nur noch aufgrund ihrer Eigenladung im Gel der Größe nach aufgetrennt werden.

Für Kontroll-SDS-Gele (z.B. für die erfolgreiche Überexpression und Reinigung von Proteinen, Western-Blot) wurden Mini-Gele (Hofer) genutzt, wohingegen für Analysen (z.B. Co-Immunopräzipitation, Western-Blot) große SDS-Gele (20 x 20 cm Glasplatten) verwendet wurden. Glasplatten, Spacer und Käbme wurden zunächst mit ddH₂O und im Anschluss mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Das 20 x 20 cm Plattensystem wurde nach Aufbau mit Agarose abgedichtet. Die Gele wurden im Stehen auspolymerisiert. Wenn nicht anders beschrieben wurden 12%-ige Trenngele und 4%-ige Sammelgele angefertigt. Um saubere und scharfe Grenzen zwischen Trenn- und Sammelgel zu erreichen, wurde das Trenngel während des Polymerisierungsvorganges mit 96%-igem Ethanol überschichtet. Die Höhe des Trenngels betrug ca. 11 cm (im 20 x 20 cm Glasplattensystem). Proteinproben wurden für die Auftrennung mit 4x SDS-Ladepuffer gemischt (Endkonzentration 1x SDS-Ladepuffer) und für 5 min bei 95°C erhitzt bzw. denaturiert. Nach Auftragung der Proteine wurden diese in Mini-Gelen für eine Stunde bei 160 V und in großen Gelen für 2,5 Stunden bei 250 V in 1x Laemmli Puffer aufgetrennt.

Für Kontrollgele betrug das Probenvolumen zwischen 10,0 µl und 20,0 µl; für analytische Gele betrug das Probenvolumen bei gering konzentrierten Proteinen bis zu 60,0 µl.

Für Gele, welche für das Western-Blot-Verfahren genutzt wurden, wurde *prestained* Marker (8,0 µl Mini-SDS-PAGE) verwendet, ansonsten diente *low range* Marker (8,0 µl Mini-SDS-PAGE; 15,0 µl 20 x 20 cm SDS-PAGE) als Größenstandard.

Tabelle 34. Lösungen für das 4%-ige Sammelgel.

Komponenten	Volumen; $\Sigma = 5$ ml	Volumen; $\Sigma = 16$ ml
Acrylamid:Bisacrylamidlösung 40% (w/v)	0,4 ml	4 ml
4x SDS-Sammelgelpuffer	1,2 ml	1,6 ml
ddH ₂ O	3,35 ml	10,3 ml

Die gelisteten Komponenten wurden gemischt und im Anschluss mit APS und TEMED versetzt um den Polymerisierungsvorgang auszulösen:

10% APS (w/v)	50 μ l	120 μ l
TEMED	5 μ l	12 μ l

Tabelle 35. Lösungen für das 12%-ige Trenngel.

Komponenten	Volumen; $\Sigma = 10$ ml	Volumen; $\Sigma = 25$ ml
Acrylamid:Bisacrylamidlösung 40% (w/v)	3 ml	7,5 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	2,5 ml	6,25 ml
ddH ₂ O	4,4 ml	11 ml

Die gelisteten Komponenten wurden gemischt und im Anschluss mit APS und TEMED versetzt um den Polymerisierungsvorgang auszulösen:

10% APS (w/v)	100 μ l	200 μ l
TEMED	10 μ l	20 μ l

Tabelle 36. Puffer für die SDS-PAGE.

Lösung	Komponenten
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
1x Laemmli-Puffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS pH 8,2
4x SDS-Ladepuffer	15% (v/v) Glycerin 0,03% (w/v) Bromphenolblau 4% (w/v) SDS 20% (v/v) β -Mercaptoethanol 25% (v/v) 4x SDS-Sammelgelpuffer ad 100% ddH ₂ O

2.3.12 Western-Blot

Über Western-Blot-Verfahren können Proteine mittels Antikörperbindung sensitiv nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde dafür das indirekte Verfahren verwendet, bei welchem zunächst ein spezifischer Primäantikörper genutzt wird, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist. Im zweiten Schritt wird ein Peroxidase-gekoppelter Sekundäantikörper eingesetzt, welcher an den Primäantikörper bindet. Die Peroxidase oxidiert im Entwicklungsschritt geeignetes Substrat (Luminol), was in einer chemischen Lichtreaktion (Chemilumineszenz) mündet und detektiert werden kann.

In dieser Arbeit wurde für den Western-Blot das Semidry-Verfahren verwendet. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden dabei auf eine PVDF-Membran mit 1 mA/cm^2 für 90 min transferiert. Der Aufbau des Semidry-Blots erfolgte möglichst Luftblasenfrei beginnend der Kathode: drei Lagen Whatman-Papier gefolgt von PVDF-Membran, Gel und abschließend drei weiteren Lagen Whatman-Papier wurden aufeinandergestapelt. Zu beachten war, dass einerseits die Whatman-Papier mit Transferpuffer getränkt wurden und andererseits die PVDF-Membran mittels 5 min Inkubation in Transferpuffer aktiviert wurde. Der Nachweis des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte dabei mittels Ponceau-Rot. Die Membran wurde mit 0,1 N NaOH-Lösung im Anschluss entfärbt und durch 30 ml Blocking-Lösung für 1 - 2 Stunden (bei Raumtemperatur) gegen unspezifische Antikörperbindung blockiert. Die Membran wurde daraufhin mit drei Waschsritten zu je 10 min mit 1x TBS-Lösung gewaschen und folgend mit dem Primäantikörper (in Antikörper-Lösung) für 1 – 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 1-malig mit 1x TBS-TT und 2-malig mit 1x TBS-Lösung für jeweils 10 min gewaschen. Der Sekundäantikörper (in Antikörper-Lösung) wurde für weitere 1 – 2 Stunden mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift TBS-TT und zwei Waschsritten TBS zu je 10 min. Zur Detektion wurde die Membran mit Lumi-Light Western Blotting Substrat im Verhältnis 1:1 überschichtet und das Signal mittels des Illumiimager visualisiert.

Tabelle 37. Puffer für den Western-Blot.

Lösung	Komponenten
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl pH 7.9 192 mM Glycin Ad. 800 ml ddH ₂ O + 20% Methanol frisch zugesetzt
Ponceau-Rot	0,1% (w/v) Ponceau-Rot 5% (v/v) Essigsäure

Blocking Lösung	5% Milchpulver gelöst in 1 x TBS
1x TBS	0,1% Tween 20 gelöst in 1 x PBS
1x TBS-TT	0,2% Triton-X100 gelöst in 1 x TBS
Antikörper-Lösung	2,5% Milchpulver gelöst in 1 x TBS versetzt mit: Rrp41-Antikörper 1:1000 Rrp42-Antikörper 1:1000 Anit-IgG-Kaninchen 1: 16 600

2.3.13 Färbemethoden von SDS-Gelen

2.3.13.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde verwendet, um Proteine nachzuweisen, welche in nur geringer Konzentration (bis zu 1 ng pro Proteinbande) in den Proben vorhanden waren. Die Methode basiert auf der Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber mittels Formaldehyd. Dazu wurden zunächst die Proteine, nach Auftrennung im SDS-Gel, mittels einstündiger Inkubation in Fixierungslösung im Gel fixiert – durch Essigsäure und Methanol fallen die Proteine im Gel aus und das diffundieren der Proteine wird so verhindert. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 50%-igem Ethanol zu je 20 min. Im Anschluss wurden die Gele für eine Minute in Lösung 1 inkubiert und folgend zu je 20 Sekunden mit ddH₂O gespült. Lösung 2 (Silbernitratlösung) wurde danach für weitere 20 min mit den Gelen inkubiert. Silberionen lagern sich dabei an schwefelhaltige oder basische Aminosäurereste von Proteinen an. Es folgten drei weitere Waschschrte zu je 20 Sekunden mit ddH₂O bevor die Färbung der Gele mittels Lösung 3 erfolgte: Mittels Formaldehyd kommt es zur Reduktion der Silberionen an den Proteinen, was sich in braun-schwarzen Silberbanden im Gel äußert. Die Färbungsreaktion wurde bei der gewünschten Intensität mit 100%-iger Essigsäure abgestoppt und die Gele mit ddH₂O gewaschen.

Tabelle 38. Puffer für die Silberfärbung.

Lösung	Komponenten
Fixierungslösung	50% Methanol 12% Essigsäure Ad. 100% ddH ₂ O + 0,05% Formaldehyd (frisch zugesetzt)

Lösung 1	0,1 g Na ₂ S ₂ O ₃ -5 H ₂ O ad. 500 ml ddH ₂ O
Lösung 2	0,5 g AgNO ₃ + 187,5 µl Formaldehyd (frisch zugesetzt) ad. 250 ml ddH ₂ O
Lösung 3	15 g Na ₂ CO ₃ + 5 ml Lösung 1 + 125 µl Formaldehyd (frisch zugesetzt) ad. 250 ml ddH ₂ O

2.3.13.2 Coomassie-Färbung

Für Kontroll-Gele wurde die Methode der Coomassie-Färbung verwendet. Im Vergleich zu Silber ist diese Färbemethode allerdings weniger sensitiv, ca. 100 ng pro Proteinbande kann im Gel nachgewiesen werden. Die SDS-Gele wurden dazu für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert, wobei die Proteine gleichzeitig durch die enthaltene Essigsäure im Gel fixiert wurden. Der in der Lösung enthaltene Farbstoff lagert sich währenddessen an positiv geladene Aminosäurereste an. Mittels Entfärbelösung wurden die Gele entfärbt bis deutliche Proteinbanden zu sehen waren und der Hintergrund dabei gering war.

Tabelle 39. Puffer für die Coomassiefärbung.

Lösung	Komponenten
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol 10% Essigsäure 0,2% Coomassie R-250 Ad 100% ddH ₂ O
Coomassie-Entfärber	30% Ethanol 20% Essigsäure Ad 100% ddH ₂ O

2.3.14 Kopplung von Antikörpern an A-Sepharose-beads

In dieser Arbeit wurde Rrp41-, Rrp4- und trx-Antikörper gekoppelte Protein-A-Sepharose einerseits verwendet um *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen über die Methode der Co-Immunopräzipitation (siehe Kapitel 2.3.19) nachzuweisen und andererseits um, als Bestandteil des iCLIP (siehe Kapitel 2.3.33), das Exosom aus *Sulfolobus solfataricus* über Immunopräzipitation spezifisch zu isolieren.

Sofern nicht anders vermerkt fanden die folgenden Schritte bei Raumtemperatur und Zentrifugationen bei 3 000 g für je 5 min statt. Zur Kopplung der Antikörper an Protein-A-Sepharose wurde 0,2 g der Protein-A-Sepharose in 1 ml 1x PBS (in einem 2 ml Eppendorftube) für zwei Stunden auf dem *tumbler* inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 1 ml des gewünschten Antikörper-Serums wurde mit der gequollenen Protein-A-Sepharose gemischt und für eine Stunde auf dem *tumbler* inkubiert, wobei der Fc-Teil des IgG-Antikörpers gegen das Protein A bindet. Im Anschluss wurden die Protein-A-Sepharose abzentrifugiert und der Serumüberstand verworfen. Die Protein-A-Sepharose wurde 3-malig mit dem 10-fachen des Protein-A-Sepharose-Volumens an 0,2 M Natriumborat pH 9.0 gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Protein-A-Sepharose chemisch an den Antikörper gebunden: Die Protein-A-Sepharose wurde für 30 min mit dem 10-fachen des Protein-A-Sepharose-Volumens an Natriumborat/DMP-Lösung auf dem *tumbler* inkubiert. Die Antikörper gebundene Protein-A-Sepharose wurde daraufhin abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Reaktion durch Zugabe von 0.2 M Ethanolamin pH 8.0 gestoppt. Dazu wurde die Antikörper gekoppelte Protein-A-Sepharose zunächst mit dem 10-fachen des Protein-A-Sepharose-Volumens an Ethanolamin gewaschen und im Anschluss für zwei Stunden mit dem 10-fachen des Protein-A-Sepharose-Volumens an Ethanolamin auf dem *tumbler* inkubiert. Im Anschluss folgten mehrere Waschschrte bei 4°C: einmalig mit dem 10-fachen des Protein-A-Sepharose-Volumens an 1x PBS, einmalig mit dem 5-fachen des Protein-A-Sepharose-Volumens an 0.1 M Glycin pH 3.0 und 4-malig mit dem 10-fachen des Protein-A-Sepharose-Volumens an 1x PBS. Die so gekoppelten Antikörper konnten bis zu einem Jahr bei 4°C gelagert werden.

Tabelle 40. Puffer für die Kopplung von Antikörpern an A-Sepharose- beads.

Lösung	Komponenten	Bemerkung
Natriumborat/ DMP Lösung	20 mM Endkonzentration DMP in 0.2 M Natriumborat – entspricht 0.052 g DMP in 10 ml Natriumborat	es ist wichtig, dass der pH-Wert über 8.3 liegt; die Lösung wurde frisch vor Benutzung hergestellt
Ethanolamin	1.22 ml Ethanolamin in 100 ml ddH ₂ O	steril filtriert; die Lösung wurde frisch vor Benutzung hergestellt

2.3.15 Dichtegradientenzentrifugation mittels Glycerolgradient

Die Dichtegradientenzentrifugation wurde in dieser Arbeit verwendet, um auf das molekulare Gewicht des in *E. coli* rekonstituierten DnaG-Csl4-Exosoms (siehe Kapitel 3.4.2) Rückschlüsse zu ziehen. Als Puffer des Glycerolgradienten wurde 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 genutzt, in welchem auch das DnaG-Csl4-Exosom aufgenommen wurde.

Der Glycerolgradient von 20 – 60% Glycerol entstand, indem die einzelnen Konzentrationen von Glycerol langsam in Ultrazentrifugationsröhrchen aufeinander pipettiert wurden, beginnend mit der Fraktion höchster Dichte. Es wurde dabei darauf geachtet, dass sich die Phasen nicht vermischten. Auf den Glycerolgradienten wurde im Anschluss 1 ml des rekonstituierten und aufgereinigten DnaG-Csl4-Exosoms pipettiert. Die darauf folgende Zentrifugation fand bei 4°C, für 21 Stunden bei 26 000 rpm statt. Verwendet wurde der *swing out* Rotor SW41.

Nach Zentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen zu je 500 µl von oben nach unten vorsichtig mittels Pipette abgenommen. Die Fraktionen wurden auf ein 12%-iges SDS-PAGE aufgetragen und mittels Silberfärbung (siehe Kapitel 2.3.13.1) analysiert.

2.3.16 Dialyse – Umpuffern von Proteinen

Um Proteine in geeignete Puffer für die Rekonstitution von Proteinkomplexen zu überführen, bzw. um Imidazol aus Eluaten zu entfernen, wurde die Methode der Dialyse verwendet. Durch semipermeable Dialyseschläuche mit einem *cut off* von 14 K wird ein Pufferaustausch möglich. Dazu wurden Dialyseschläuche in ddH₂O (versetzt mit EDTA) aufgekocht und im Anschluss mit ddH₂O gespült. Die Proteinlösung wurde vorsichtig in die Schläuche überführt und in dem 100-fachen des Proteinvolumens in dem gewünschten Puffer, unter langsamem Rühren, inkubiert. Die Dauer der Inkubationszeit ist in den entsprechenden Kapiteln vermerkt.

2.3.17 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

2.3.17.1 NanoDrop

Proteine wurden in dieser Arbeit mit dem NanoDrop, bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, wobei als Blankwert der jeweilige Puffer verwendet wurde, in welchem das Protein aufgenommen

war. Zu beachten ist, dass bei dieser Methode die Gesamtproteinmenge bestimmt wird. Zudem kann die Methode nur bei Proteinen vorgenommen werden, deren Puffer sich selbst nicht im A280 nm Bereich absorbierend äußert. Der Messsockel wurde zunächst mit Wasser gereinigt, bevor der Referenzwert (1 µl Proteinpuffer) genommen wurde. Für die anschließende Messung wurde ca. 1 µl Proteinprobe auf den Messsockel pipettiert und die Probe direkt gemessen. Für genaue Messungen wurde die Probe 3-mal vermessen und mit dem errechneten Mittelwert weitergearbeitet.

2.3.17.2. BSA – Konzentrationsvergleichsgele

Bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen über NanoDrop wird jeweils die Gesamtproteinmenge gemessen, d.h. auch Proteine neben dem eigentlich zu bestimmenden Protein fließen in den Messwert mit ein. Da für EMSAs, Degradations- sowie Polyadenylierungsassays die einzusetzenden Proteinmengen sehr genau vergleichbar sein mussten, wurde auf die Messung über BSA bzw. ein Angleichen des hexameren Ringes mittels SDS-PAGE-Konzentrationsvergleichsgelen ausgewichen, welche mittels Coomassie gefärbt wurden. Für die gesamte Arbeit wurde ein hexamerer Ring verwendet, dessen Konzentration mittels BSA bestimmt und auf 0.3 pmol berechnet wurde. Kappenproteine bzw. potentielle Interaktionspartner des Hexamers wurden im Anschluss an die Konzentration des hexameren Ringes in stöchiometrischer Menge angeglichen (siehe Abbildung 10).

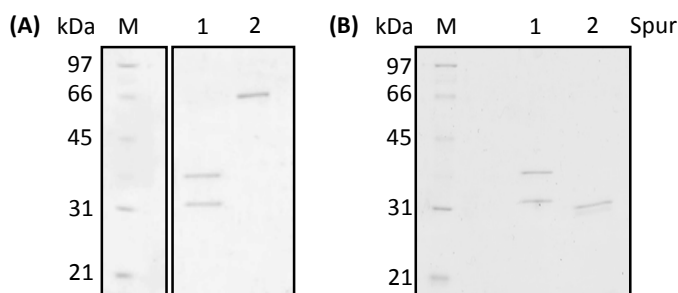


Abbildung 10. Konzentrationsvergleichs-SDS-PAGE-Gele für die Bestimmung der Konzentration des hexameren Ringes **(A)** sowie die Anpassung der stöchiometrischen Konzentration von Rrp4 zum hexameren Ring **(B)**. (A) 3,5 µl hexamerer Ring (Spur 1), 3,5 µl BSA 0,1 mg/ml (Spur 2). (B) 3,5 µl hexamerer Ring (Spur 1), 10,0 µl Rrp4 (Spur 2). Bei (A) und (B) wurden 8,0 µl *low range* Marker zur Größenbestimmung eingesetzt. Die SDS-PAGE-Gele wurden mittels Coomassie gefärbt.

2.3.18 Rekonstitution von Proteinkomplexen

2.3.18.1 Rekonstitution des hexameren Ringes ohne His₆-tag

Für die Rekonstitution des hexameren Ringes wurden die Untereinheiten Rrp41-His₆ und Rrp42-His₆ rekombinant in *E. coli* BL21 überexprimiert und unter nativen Bedingungen aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.21). Da Rrp41-His₆ als Einzelprotein im Vergleich zu Rrp42-His₆ instabiler ist, wurden für die Rekonstitution des Hexamers die beiden Proteine im Verhältnis 2:1 benötigt; Ausgangskulturen bildeten 2 Liter *E. coli* BL21 Rrp41-His₆ sowie 1 Liter *E. coli* BL21 Rrp42-His₆. Nach Elution von Rrp41-His₆ und Rrp42-His₆ von der Ni²⁺-NTA-Agarose wurde von beiden Proteinen mittels separater TEV-Behandlung der His-tag entfernt. Die TEV-Protease erkennt die sieben Aminosäure-lange Schneidsequenz von: Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly und schneidet zwischen Glutamin und Glycin [169]. Entsprechend können so gezielt His₆-tags entfernt werden. Die TEV-Behandlung fand über Nacht bei Raumtemperatur mittels Dialyse statt. Um geschnittene His₆-tags, TEV-Protease, Imidazol sowie noch ungeschnittene Rrp41-His₆ bzw. Rrp42-His₆ von geschnittenen Rrp41 bzw. Rrp42 zu trennen wurden die Dialyseansätze mit 500,0 µl Ni²⁺-NTA-Agarose-Lösung für 30 min auf dem *tumbler* inkubiert. Die folgenden Schritte fanden im Anschluss nur noch mit den Säulendurchflüssen, welche Rrp41 bzw. Rrp42 enthielten, statt. Rrp41 und Rrp42 wurden im Verhältnis 2:1 gemischt und mittels Dialyse bei Raumtemperatur über zwei Stunden zum hexameren Ring rekonstituiert. Um im Anschluss den hexameren Ring von Einzelproteinen zu separieren, wurde die Methodik der Größenausschlusschromatographie verwendet. In Vorbereitung darauf fand eine Konzentrierung der Proteinlösung mittels Amicon® Ultrazentrifugationsröhrchen, mit einem *cut off* von 30, zu 1,7 ml statt. Es folgte eine Inkubation über 10 min bei 75°C, wobei Einzelproteine Rrp41, Rrp42 sowie Proteine von *E. coli* denaturieren. Der hexamere Ring hingegen ist hitzestabil. Um denaturierte Einzelproteine und Schwebeteilchen im Anschluss aus der Proteinlösung zu isolieren, wurde die Lösung für 15 min bei 17 000 g zentrifugiert und der Proteinüberstand für die Größenausschlusschromatographie mit HiLoad® 16/60 Superdex® 200 Säule (siehe Kapitel 2.3.21.2) verwendet. Zur Überprüfung der Fraktionen für erfolgreiche Rekonstitution des hexameren Ringes wurde zwischen 10,0 µl (ab 30 mAU bezogen auf das Peakmaximum des Chromatogramms) – 20,0 µl (bis 30 mAU bezogen auf das Peakmaximum des Chromatogramms) Probe auf ein Mini-SDS-PAGE aufgetragen und mittels Coomassie gefärbt.

Tabelle 41. Puffer für die Rekonstitution des hexameren Ringes ohne His₆-tags.

Lösung	Komponenten
TEV-Dialyse-Puffer	30 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl
Dialyse-Puffer zur Rekonstitution des hexameren Ringes und für die Größenausschlusschromatographie	10 mM Tris-HCl pH 7.6 150 mM NaCl

2.3.18.2 Rekonstitutionen von exosomalen Komplexen

Für die Rekonstitution von exosomalen Komplexen wurden die Untereinheiten des hexameren Ringes sowie die entsprechenden Kappenproteine rekombinant in *E. coli* BL21 überexprimiert und unter nativen Bedingungen aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.21). Die Proteine wurden in stöchiometrischen Verhältnissen zur Rekonstitution des gewünschten Komplexes im P₀-Puffer mittels Dialyse für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zu beachten war, dass im Falle der Rekonstitution der Komplexe für eine anschließende Co-Immunopräzipitation ein Maximalvolumen von 1,5 ml (entspricht dem Eppendorftubevolumen in dem die Co-Immunopräzipitation stattfand) eingehalten werden musste.

Tabelle 42. Komponenten des P₀-Puffers.

Lösung	Komponenten
P ₀ -buffer	500 mM EDTA 10 mM Tris-HCl pH 8.0 40 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5% Glycerol 0,05% Tween 20 0,2 mM DTT

2.3.19 Co-Immunopräzipitation

Mittels Co-Immunopräzipitation lassen sich Protein-Protein-Interaktionen nachweisen. In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um die Interaktion von Proteinen mit dem exosomalen Komplex zu verifizieren. Über Immunopräzipitation von Rrp41 mit Rrp41-spezifischem Antikörper konnten Proteine, welche mit Rrp41 interagieren, co-immunopräzipitiert werden und ihre Interaktion mit dem exosomalen Komponenten gezeigt werden.

Zur Vorbereitung der Proteinlösung: die *in vitro* rekonstituierten Proteinkomplexe über Dialyse (siehe Kapitel 2.3.16, wurden für 10 min bei 75°C erhitzt und im Anschluss bei 17 000 g 10 min zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde in ein frisches Eppendorf tube überführt.

Sofern nicht anders vermerkt fanden die Zentrifugationsschritte bei 2 400 g für 3 min und 4°C statt. Zur Vorbereitung der Co-Immunopräzipitation wurden 100 µl der Antikörper-gekoppelten Protein-A-Sephrose zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Antikörper-gekoppelte Protein-A-Sephrose mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die sie mit 1,5 ml Proteinlösung für ca. 1,5 Stunden bei 4°C auf dem *tumbler* inkubiert. Danach wurde die Antikörper-gekoppelte Protein-A-Sephrose unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 1x TMNG-Puffer. Die gebundenen Proteine wurden 2-malig mittels 40 µl 0,1 M Glycin pH 1.8 von der Antikörper-gekoppelten Protein-A-Sephrose eluiert und die Elutionsfraktionen im gleichen Eppendorf tube gesammelt. Die Antikörper-gekoppelte Protein-A-Sephrose wurde mittels 1x PBS im Anschluss 3-malig gewaschen. Eine wiederholte Verwendung der Antikörper-gekoppelten Protein-A-Sephrose mit gleichen Proteinproben ist möglich.

Folgende Proben wurden während der Co-Immunopräzipitation zur Analyse genommen: 60,0 µl Input vor und nach dem Erhitzen auf 75°C (vor Zugabe auf die Antikörper-gekoppelten Protein-A-Sephrose); 60,0 µl Durchfluss (entspricht dem Überstand nach Inkubation der Proteinlösung und anschließender Zentrifugation); 60,0 µl des ersten und letzten Waschschrtes; insgesamt 80,0 µl Elution.

Die Proben wurden zur Analyse auf ein 12%-iges SDS-Gel, 20 x 20 cm, aufgetragen und anschließend mittels Silberfärbung visualisiert. Dabei ist zu beachten, dass die Elutionsfraktion mit 1/10 ihres Volumens mit Tris-HCl pH 9.5 neutralisiert wurde um zu verhindern, dass durch pH-Unterschiede zwischen Probe und SDS-Gel die Banden im Gel zu breit laufen.

Tabelle 43. Puffer für die Co-Immunopräzipitation.

Lösung	Komponenten
10x TMN	100 mM Tris pH7.5 1.5 M NaCl 50 mM MgCl ₂ 1% Nonidet P40
TMNG	1x TMN 1 mM PMSF 10% Glycerol

2.3.20 Surface Plasmon Resonance (SPR) / Biacore

Für weiterführende Interaktionsstudien zwischen Proteinen wurden *Surface Plasmon Resonance* Experimente / der Biacore durchgeführt. Dabei wird eines der beiden Proteine, als Ligand, auf einem Biacore Series S Sensor Chip CM5 immobilisiert, das andere Protein, der Analyt, wird in steigenden Konzentrationen im Puffer über den Chip geleitet. Parallel wurde eine zweite Flusszelle, ohne Ligand immobilisiert und diente als Kontrolle. Entsprechend Bindungszeit und Dissoziationszeit zwischen den beiden Proteinen wird die Dissoziationskonstante K_D berechnet.

Genutzt wurde der Biacore T200 von GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden. Nop5 diente in dieser Arbeit als Ligand, in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ in einem 10 mM Natrium Phosphat-Puffer, pH 8.0. Mittels Aminogruppen-*attachment* wurde Nop5 auf einem Biacore Series S Sensor Chip CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) immobilisiert. Eine zweite Flusszelle wurde ebenfalls ohne Protein als Kontrolle immobilisiert und während des Experimentes entsprechend der mit Nop5 gekoppelten Flusszelle gleich behandelt. Der Chip wurde entsprechend den Hersteller-Empfehlungen aktiviert und blockiert. Die Bindungsanalysen fanden in HBS-EP⁺-Puffer bei 25°C statt. Verschiedene Konzentrationen von Rrp4 (0,01; 0,1; 1; 7,5; 15; 30 μM), dem Analyten, wurden in HBS-EP⁺-Puffer verdünnt und über Nop5 für jeweils 60 s über den Chip geleitet, gefolgt von 120 s Dissoziationszeit durch HBS-EP⁺ Puffer. Die Flussrate lag dabei bei 30 $\mu\text{l/min}$. Nach jedem Zyklus wurde der Ligand mittels 1 M NaCl für 30 s mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l/min}$ regeneriert. Nach Auswertung wurde die Dissoziationskonstante K_D mittels Biacore T200 Evaluation Software Version 3.0 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) berechnet.

Tabelle 44. Komponenten des HBS-EP⁺ Puffers.

Lösung	Komponenten
10x TMN	10 mM HEPES pH. 7.4 150 mM NaCl 3 mM EDTA 0,05 % Surfactant P20 (v/v)

2.3.21 Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E.coli*

2.3.21.1 Induktion von rekombinanten Proteinen / Proteinkomplexen aus *E. coli*

Um Einzelproteine bzw. Proteinkomplexe in *E. coli* rekombinant zu exprimieren wurde der entsprechende *E. coli* Stamm als Einzelkolonie von der Platte gepickt und als Übernachtskultur in Flüssigmedium angeimpft. Die gewachsene Übernachtskultur wurde in einen Liter Standard I Medium, versetzt mit dem entsprechendem Antibiotikum, überführt und bei 180 rpm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 – 0,8 angezogen. Im Anschluss erfolgte die Induktion der Proteine unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 45. In dieser Arbeit verwendete Stämme mit entsprechenden Induktionsbedingungen.

Protein oder Proteinkomplex	Plasmid (<i>E. coli</i> Stamm)	Lysepuffer
Rrp41-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp41</i> (BL21 DE3)	1 mM Endkonzentration
Rrp42-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp42</i> (BL21 DE3)	IPTG; 3 h Wachstum bei
Rrp4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp4</i> (BL21 DE3)	180 rpm, 37°C nach
Csl4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoCsl4</i> (BL21 DE3)	Induktion / alternativ 16 h
CTD-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoCTDNop5</i> (BL21 DE3)	Wachstum bei 180 rpm,
NTD-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoNTDNop5</i> (BL21 DE3)	16°C nach Induktion
CC-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoCCNop5</i> (BL21 DE3)	
Nop5-His ₆	pET15b:: <i>SsoNop5</i> (BL21 DE3)	
Csl4S1Rrp4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoCsl4S1Rrp4</i> (BL21 DE3)	
Rrp4S1Csl4-His ₆	pET-15b:: <i>SsoRrp4S1Csl4</i> (BL21 DE3)	
Nop5	pET30a:: <i>SsoNop5</i> (BL21)	
DnaG-His ₆	pET30a:: <i>SsoDnaG</i> (BL21 DE3)	0.2 mM Endkonzentration IPTG; 16 h Wachstum bei 180 rpm, 12°C nach Induktion
TEV- Protease	pRK793 TEV-Protease (BL21 DE3)	1 mM Endkonzentration IPTG; 3 h Wachstum bei 180 rpm, 30 °C nach Induktion
Csl4-Exosom	pASK-iba3 ⁺ :: <i>SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4</i> (BL21 DE3)	0,1 µg/ml Endkonzentration AHT; 16
DnaG-Csl4-Exosom	pASK-iba3 ⁺ :: <i>SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4</i> , pET30a:: <i>SsoDnaG</i> (BL21 DE3)	h Wachstum bei 180 rpm, 16°C nach Induktion

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) besitzt das Phagen-Gen der T7-Polymerase, reprimiert durch den *lac*-Repressor. Mittels IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid), sterisch ähnlich der Laktose, wird der *lac*-Promotor induziert: IPTG bindet den *lacI*-Repressor, welcher den Operator vor dem Gen der T7-Polymerase bindet. Durch die Bindung von IPTG an den *lacI*-Repressor ändert dieser seine Konformation, was zur Loslösung des Repressors vom Operator führt. In Folge dessen kommt es zur Transkription und Translation der T7-Polymerase. Die T7-Polymerase ist im Anschluss ihrerseits in der Lage den T7-Promotor zu erkennen, welcher vor dem zu induzierenden Gen auf dem Plasmid liegt und kann die Transkription somit starten. Die Plasmide pET30a, pET15b, pRK793, pET24c sowie pET-MCN tragen den T7-Promotor vor dem zu induzierenden Gen.

Mittels AHT (Anhydrotetracyclin), einem antibiotisch nicht wirksamen Derivat des Tetracyclins, kommt es zur Induktion des *tetA*-Promotors welcher auf dem Plasmid pASK-iba3⁺ vor dem zu induzierenden Gen liegt. AHT bindet den *tet*-Repressor welcher an den Operator vor dem *tetA*-Promotor bindet und sorgt in Folge dessen für dessen Konformationsänderung, was ein Loslösen des Repressors vom Operator zur Folge hat. Daraufhin kommt es zur Induktion des Genes, welches hinter dem *tetA*-Promotor liegt, unabhängig vom verwendeten *E. coli* Stamm.

2.3.21.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen / Proteinkomplexen aus *E. coli*

Zellernte

Nach Induktion zu oben aufgeführten Bedingungen (Tabelle 45) wurden die Zellen mittels 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 4 400 g geerntet. Das Zellpellet wurde in ca. 30 ml Lysepuffer (Tabelle 46) resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Alternativ wurde das Pellet bei -80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt weiter verarbeitet.

Tabelle 46. In dieser Arbeit genutzte Proteine/Plasmide mit entsprechendem Lysepuffer.

Protein oder Proteinkomplex	Plasmid (<i>E. coli</i> Stamm)	Lysepuffer
Rrp41-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp41</i> (BL21 DE3)	50 mM Tris-HCl pH 7.6
Rrp42-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp42</i> (BL21 DE3)	150 mM NaCl
Csl4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoCsl4</i> (BL21 DE3)	
Csl4S1Rrp4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoCsl4S1Rrp4</i> (BL21 DE3)	
Rrp4S1Csl4-His ₆	pET-15b:: <i>SsoRrp4S1Csl4</i> (BL21 DE3)	
Nop5	pET30a:: <i>SsoNop5</i> (BL21)	

DnaG-His ₆	pET30a:: <i>SsoDnaG</i> (Arctic express)	50 mM HEPES pH 8.0 100 mM NaCl 10 mM β-Mercaptoethanol 10% Glycerol Proteaseinhibitor-Cocktail
Csl4-Exosom	pASK-iba3 ⁺ :: <i>SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4</i> (BL21 DE3)	10 mM Tris-HCl pH 7.6 150 mM NaCl
DnaG-Csl4-Exosom	pASK-iba3 ⁺ :: <i>SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4</i> , pET30a:: <i>SsoDnaG</i> (BL21 DE3)	
TEV- Protease	pRK793 TEV-Protease (BL21 DE3)	30 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl
Rrp4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp4</i> (BL21 DE3)	50 mM Tris-HCl pH 8 400 mM NaCl
Nop5-His ₆	pET15b:: <i>SsoNop5</i> (BL21 DE3)	30 mM Tris-HCl pH 8 1 M NaCl
CTD-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoCTDNop5</i> (BL21 DE3)	20 mM HEPES pH. 7.4
NTD-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoNTDNop5</i> (BL21 DE3)	150 mM NaCl
CC-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoCCNop5</i> (BL21 DE3)	0,05 % NP 40

Zellaufschluss

Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen, wobei der große Ultraschallaufsatz verwendet wurde. Vor Benutzung wurde der Aufsatz zunächst mit ddH₂O und anschließend mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Zu beachten ist, dass die Zellsuspension während des gesamten Aufschlusses auf Eis gekühlt wurde. Der Aufschluss der Zellen erfolgte 5-malig zu je einer Minute bei einer Power von 70% und 70 Zyklen pro Minute, dazwischen Pausen von ca. 30 Sekunden. Sowohl nach dem ersten Zyklus, als auch nach dem dritten Zyklus des Aufschlusses wurde das Falcon geschwenkt um die Zellsuspension zu homogenisieren.

Danach wurden der Zellextrakt über 20 min bei 75°C erhitzt (nicht für pETMCN::*SsoRrp41*; pET-MCN::*SsoRrp42*, da Rrp41 und Rrp42 als Einzelproteine nicht hitzestabil sind). Denaturierte Proteine und Zelltrümmer wurden bei 20 200 g, 4°C über 20 min abzentrifugiert. Das geklärte Zelllysat wurde für die weitere Aufreinigung der darin enthaltenen überexprimierten Proteine weiterverwendet. Entsprechende Aufreinigungsmethoden sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 47. In dieser Arbeit genutzte Proteine/Plasmide mit entsprechender Aufreinigungsmethode.

Protein oder Proteinkomplex	Plasmid (<i>E. coli</i> Stamm)	Lysepuffer
Rrp41-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp41</i> (BL21 DE3)	His- <i>tag</i> Aufreinigung
Rrp42-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp42</i> (BL21 DE3)	
Rrp4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoRrp4</i> (BL21 DE3)	
Csl4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoCsl4</i> (BL21 DE3)	
Csl4S1Rrp4-His ₆	pET-MCN:: <i>SsoCsl4S1Rrp4</i> (BL21 DE3)	
Rrp4S1Csl4-His ₆	pET-15b:: <i>SsoRrp4S1Csl4</i> (BL21 DE3)	
Nop5-His ₆	pET15b:: <i>SsoNop5</i> (BL21 DE3)	
DnaG-His ₆	pET30a:: <i>SsoDnaG</i> (BL21 DE3)	
TEV- Protease	pRK793 TEV-Protease (BL21 DE3)	
Csl4-Exosom	pASK-iba3 ⁺ :: <i>SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4</i> (BL21 DE3)	2-Stufen Aufreinigung mittels ÄKTAexplorer: 1.
DnaG-Csl4-Exosom	pASK-iba3 ⁺ :: <i>SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4</i> , pET30a:: <i>SsoDnaG</i> (BL21 DE3)	Heparinsäule und 2. Gelfiltration
Nop5	pET30a:: <i>SsoNop5</i> (BL21)	Heparinsäule (ÄKTAexplorer)
CTD-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoCTDNop5</i> (BL21 DE3)	MBP- <i>tag</i> Aufreinigung
NTD-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoNTDNop5</i> (BL21 DE3)	
CC-Nop5-MBP	pET24c:: <i>SsoCCNop5</i> (BL21 DE3)	

Ni²⁺-NTA/His₆-*tag* Affinitätschromatographie

Die Ni²⁺-NTA/His-*tag* Affinitätschromatographie basiert auf der Bindung zwischen positiv geladenen Ni²⁺ mit negativ geladenen Histininresten. Proteine, welche am C- oder N-Terminus über rekombinante Expression einen His₆-*tag* aufweisen können so selektiv aus einem Proteingemisch (Zelllysat) mit der Ni²⁺-NTA-Agarose interagieren und isoliert werden. Die Elution der Proteine von der Ni²⁺-NTA-Agarose basiert auf der Konkurrenz von Imidazol mit dem His₆-*tag*, wodurch das His-*tag* Protein von der Säule gedrängt wird.

Zur Aufreinigung von His₆-*tag* Proteinen wurde pro Liter Ausgangszellkultur 200 µl Ni²⁺-NTA-Agarose-Lösung verwendet. Diese wurde dem geklärten Zelllysat zugesetzt und zur Bindung der Proteine bei 4°C für 15 min auf dem *tumbler* inkubiert. Die Ni²⁺-NTA-Agarose wurde mit 50 ml Waschpuffer (entspricht dem verwendeten Lysepuffer mit zusätzlich 10 mM Imidazol) gewaschen und Proteine im Anschluss mittels 7-maliger Elution zu je 2 ml mit Elutionspuffer (entspricht dem verwendeten Lysepuffer mit zusätzlich 300 mM Imidazol) von der Ni²⁺-NTA-Matrix gelöst. Die Ni²⁺-NTA-Matrix wurde mittels 0,5 M NaOH-Lösung für 30 min auf dem *tumbler* zur Regeneration inkubiert und im

Anschluss in 20% Ethanol im Kühlschrank gelagert. Die Matrix konnte für gleiche Proteine wieder verwendet werden.

Aufreinigung von MBP-tag Proteinen

500 µl Amylose-beads wurden vorbereitend mit 6 ml Lysepuffer der MBP-150 Puffer gewaschen und im Anschluss zum Zellüberstand gegeben. Die Inkubation der *beads* mit dem Zellüberstand erfolgte über 2 Stunden rotierend bei 4°C. Im Anschluss wurden die *beads* bei 1000 rpm über 5 min bei 4°C abzentrifugiert und der Zellüberstand abgenommen.

Die *beads* wurden in 1 ml frischem MBP-150 Puffer aufgenommen und auf eine 5 ml Säule (Quiagen) gegeben. Im Anschluss wurde die Amylose zunächst mit 1 ml frischem MBP-150 Puffer (W1) und darauf folgend mit 1 ml 5 mM Na₂HPO₄ gewaschen. Die Elution der MBP-tag Proteine erfolgte mittels 1 ml 5 mM Na₂HPO₄, welchem 15 mM Maltose zugesetzt worden war.

Tabelle 48. Komponenten des MBP-150 Puffers.

Lösung	Komponenten
MBP-150	20 mM HEPES pH. 7.4 150 mM NaCl 0,05 % NP 40

2-Schritt- ÄKTA Aufreinigung

Heparinsäule

Um nicht-tag exosomale Proteinkomplexe (pASK-iba3⁺::SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4 (BL21); pASK-iba3⁺::SsoRrp41-SsoRrp42-SsoCsl4, pET30a:: SsoDnaG (BL21)) aus dem Zellysate von *E. coli* zu isolieren, wurde zunächst eine 5 ml Heparinsäule verwendet. Heparinsäulen besitzen die Eigenschaft DNA- oder RNA bindende Proteine, Lipoproteine oder Gerinnungsfaktoren zu binden. Die Säule wurde entsprechend der Herstellerangaben an die ÄKTApurifier 900 angeschlossen (0.3 MPa *High Pressure alarm*). Die Flussrate betrug konstant während des gesamten Aufreinigungsprozesses 1 ml/min. Alle genutzten Puffer wurden vor Anschluss an die ÄKTA gefiltert (0,22 µm Filter) und entgast. Ebenso wurde das geklärte Zellysate durch einen 0,22 µm Filteraufsatz gefiltert, bevor die Probenschleife beladen wurde. Die Säule wurde zunächst mit 5 CV (*column volume*) ddH₂O gewaschen, gefolgt von 5 CV Puffer B und mit weiteren 5 CV Puffer A äquilibriert.

Puffer A: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6

Puffer B: 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6

Nach Injektion der Probe wurde die Säule mit 2 CV Puffer A gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine von der Säule fand über einen steigenden NaCl Gradienten, beginnend bei 150 mM NaCl (Puffer A) bis zu 1 M NaCl (Puffer B) statt über 15 CV. Das Volumen der einzelnen Elutionsfraktionen lag bei jeweils 1 ml. Nach Elution der Proteine wurde die Säule mit 2 CV Puffer B, gefolgt von 2 CV Puffer A gewaschen. Im Anschluss nochmals mit 5 CV ddH₂O und 5 CV 20%-igem Ethanol. Die Säule wurden in 20%-igem Ethanol gelagert. Die Fraktionen wurden mittels Mini-SDS-PAGE analysiert, Fraktionen mit den enthaltenen Proteinkomplexen gepoolt und auf ein Volumen von 1,5 ml aufkonzentriert (Amicon Ultrazentrifugationsröhrchen). Das Konzentrat wurde im Anschluss nochmals für 15 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, um eventuell ausgefallene Proteine oder Schwebeteilchen, vor Auftragung auf die Gelfiltrationssäule, zu entfernen.

Aufreinigung über Größenausschlusschromatographie

Für den zweiten Schritt der Aufreinigung der Proteinkomplexe wurde die HiLoad® 16/60 Superdex® 200 Säule verwendet. Die Säule wurde entsprechend der Herstellerangaben an die ÄKTApurifier 900 (0.35 MPa *High Pressure alarm*) angeschlossen. Die Flussrate betrug konstant während des gesamten Aufreinigungsprozesses 1 ml/min. Alle genutzten Puffer wurden vor Anschluss an die ÄKTA gefiltert (0,22 µm Filter) und entgast. Die Säule wurde zunächst mit 1 CV ddH₂O gewaschen, gefolgt von 1 CV Puffer A und mit weiteren 5 CV Puffer A äquilibriert. Im Anschluss wurde die Probe injiziert. Nach Injektion der Probe fand eine Fraktion der Elutionen nach 40 ml Durchfluss des Puffers A statt (void volume). Die Proteine verschiedener Größe wurden entsprechend ihrer Größe fraktioniert (1 ml Fraktionsvolumen), wobei große Proteine zuerst und kleine Proteine zuletzt fraktioniert werden. Nach der Fraktionierung wurde die Säule mit 1 CV Puffer A, gefolgt von 1 CV ddH₂O gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 CV 20%-igem Ethanol wurde die Säule in 20%-igem Ethanol gelagert. Die Fraktionen wurden mittels Mini-SDS-PAGE auf das Vorhandensein der exosomalen Proteinkomplexe untersucht.

2.3.22 His₆-tag Pull down

Die Aufreinigung mittels His₆-tag kann genutzt werden, um die Interaktion von Proteinen miteinander zu untersuchen. Über eine hohe Affinität von Proteinen zueinander können Proteine

gemeinsam über His₆-tag aufgereinigt bzw. eluiert werden, obwohl nur eins der Proteine im Komplex den His₆-tag besitzt.

Die zu untersuchenden Proteine wurden im Vorfeld wie in Kapitel beschrieben 2.3.21 separat aufgereinigt, wobei eines der Proteine an einen His₆-tag gekoppelt vorlag. Die Proteinlösung wurde im Anschluss für 30 min mit 0,5 ml Ni²⁺-NTA-Agarose bei 4°C auf dem *tumbler* inkubiert. Im Anschluss wurde die Ni²⁺-NTA-Agarose mittels 50 ml Waschpuffer (entspricht dem Puffer des His₆-tag Proteins) gewaschen, um unspezifische Interaktionspartner zu entfernen. Die Elution des His₆-tag Proteins zusammen mit etwaigen Interaktionspartnern fand 3-mal mit je 200 µl Elutionspuffer statt (entspricht dem Puffer des His₆-tag Proteins mit 400 mM Imidazol). Der Elutionspuffer wurde dabei jeweils für 2 min mit der Ni²⁺-NTA-Agarose inkubiert. Im Anschluss wurden die Elutionsfraktionen im SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert.

2.3.23 RNA *in vitro* Transkription

Bei der RNA *in vitro* Transkription wird RNA von einem DNA-Template unter der Nutzung des T7-Promotors durch die T7-RNA-Polymerase in 5' → 3' Richtung synthetisiert. Die synthetisierte RNA wird in dieser Arbeit als Substrat für *in vitro* Assays (Polyadenylierungs- und Degradationsassays sowie EMSA) genutzt.

2.3.23.1 Annealing des T7-Promotors an ein DNA-Oligonukleotid

Für *in vitro* Transkriptionen, welche von einem DNA-Oligonukleotid ausgehen, muss zunächst ein T7-Promotor-Oligonukleotid angelagert werden. Das T7-Promoter-Oligo ist dabei komplementär zum 3'-Bereich des Matrizen-Oligonukleotides.

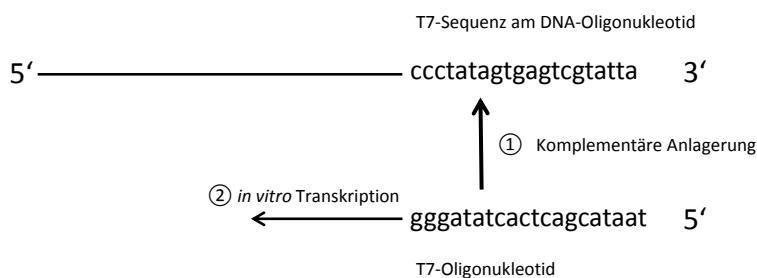


Abbildung 11. Schematische Illustration der 1. stattfindenden Anlagerung des T7-Oligonukleotides an die komplementäre Sequenz des DNA-Oligonukleotides und 2. der *in vitro* Transkription.

Im Vorfeld der *in-vitro* Transkription von einem DNA-Oligonukleotiden aus wurde zunächst der T7-Promotor an das DNA-Oligonukleotid angelagert:

Tabelle 49. Reaktionsansatz für das *Annealing* des T7-Promotors an ein DNA-Oligonukleotid.

Volumen; $\Sigma = 20 \mu\text{l}$	Komponenten
2,5 μl	Oligonukleotid (10 pmol/ μl)
3 μl	T7-Promotor (10 pmol/ μl)
5 μl	Tris-HCl pH 8.0 (100 mM)
Ad 50 μl	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde zunächst für 5 min bei 70°C und im Anschluss für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.23.2 *in vitro* Transkription nicht-radioaktiv markierter RNA

Für die *in vitro* Transkription nicht-radioaktiv markierter RNA wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 50. Reaktionsansatz für *in vitro* Transkription von nicht-radioaktiv markierter RNA (ohne Kit)

Volumen; $\Sigma = 25 \mu\text{l}$	Komponenten
2,5 μl	10x T7 Reaktionspuffer
1,5 μl	T7-Polymerase
2 μl	rNTPS (25 mM ATP, 25 mM CTP, 25 mM GTP, 25 mM UTP)
x μl	<i>Template</i> DNA (100 – 200 ng)
0,8 μl	RNasin® (40 U/ μl)
2 μl	40 mM MgCl ₂
2 μl	100 mM DTT
Ad 25 μl	ddH ₂ O

Als *template*-DNA diente dabei entweder ein PCR-Produkt (inkl. T7-Promotor) oder das DNA-Oligonukleotid an welches zuvor der T7-Promotor angelagert wurde (siehe Kapitel 2.3.23.1). Die Reaktion fand bei 37°C für 6 Stunden statt. Nach 3 Stunden wurde 1 μl frische T7-Polymerase zugesetzt.

Alternativ wurde für nicht-radioaktiv markierte *in vitro* Transkriptionen das Ambion Kit verwendet, entsprechend den Herstellungsanweisungen.

Tabelle 51. Reaktionsansatz für *in vitro* Transkription von nicht-radioaktiv markierter RNA mittels Ambion-Kit.

Volumen; $\Sigma = 20 \mu\text{l}$	Komponenten
2 μl	10x T7 Reaktionspuffer
2 μl	Enzym-Mix
0,5 μl	RNasin® (40 U/ μl)
x μl	<i>Template</i> DNA (100 – 200 ng)
2 μl	UTP
2 μl	ATP
2 μl	CTP
2 μl	GTP
Ad 20 μl	ddH ₂ O

2.3.23.3 *in vitro* Transkription radioaktiv markierter RNA

Für die *in vitro* Transkription radioaktiv markierter RNA wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 52. Reaktionsansatz für *in vitro* Transkription von radioaktiv markierter RNA (ohne Kit).

Volumen; $\Sigma = 25 \mu\text{l}$	Komponenten
2,5 μl	10x T7 Reaktionspuffer
1,5 μl	T7-Polymerase
2 μl	Low U-Mix (25 mM ATP, 25 mM CTP, 25 mM GTP, 5 mM UTP)
x μl	<i>Template</i> DNA (100 – 200 ng)
0,8 μl	RNasin® (40 U/ μl)
2 μl	40 mM MgCl ₂
2 μl	100 mM DTT
2 μl	[α -P ³²]-UTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
Ad 25 μl	ddH ₂ O

Als *template*-DNA diene dabei entweder ein PCR-Produkt (inkl. T7-Promotor) oder das DNA-Oligonukleotid an welches zuvor der T7-Promotor angelagert wurde (siehe Kapitel 2.3.23.1). Die Reaktion fand bei 37°C für 6 Stunden statt. Nach 3 Stunden wurde 1 μl frische T7-Polymerase zugesetzt.

2.3.23.4 *in vitro* Transkription radioaktiv markierter RNA mittels Ambion Kit**Tabelle 53.** Reaktionsansatz für *in vitro* Transkription von radioaktiv markierter RNA mittels Ambion-Kit.

Volumen; $\Sigma = 25 \mu\text{l}$	Komponenten
2 μl	10x T7 Reaktionspuffer
2 μl	Enzym-Mix
0,5 μl	RNasin® (40 U/ μl)
x μl	<i>Template</i> DNA (100 – 200 ng)
0,5 μl	UTP
2 μl	ATP
2 μl	CTP
2 μl	GTP
2 μl	[α -P ³²]-UTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
Ad 20 μl	ddH ₂ O

Als *template*-DNA diene dabei entweder ein PCR-Produkt (inkl. T7-Promotor) oder das DNA-Oligonukleotid an welches zuvor der T7-Promotor angelagert wurde (siehe Kapitel 2.3.23.1). Die Reaktion fand bei 37°C über 4 Stunden statt.

2.3.23.5 Verdau der *template*-DNA nach *in vitro* Transkription

Zum Verdau der *template*-DNA wurde 1,0 μl TURBO-DNase direkt zum Transkriptionsansatz hinzugesetzt und der Reaktionsansatz für 15 min bei 37°C inkubiert.

2.3.23.6 Beseitigung von überschüssigen freien radioaktiven Nukleotiden

Um freie radioaktive Nukleotide ([γ -P³²]-ATP, [α -P³²]-UTP), welche nicht bei dem *endlabeling* (siehe Kapitel 2.3.25) oder während der radioaktiven *in vitro* Transkription inkorporiert wurden, aus Reaktionsansätzen zu entfernen, wurden illustra™ MicroSpin™ G50- oder G25 Columns verwendet. G25 -Säulchen wurden dabei für Transkripte ab 10 bp genutzt, G50-Säulchen für Transkripte ab 30 bp. Das Säulenmaterial wurde dazu mittels kurzen vortexens gemischt und der Boden des Säulchens vorsichtig abgedreht. Der Lagerpuffer des Säulenmaterials wurde anschließend durch 1-minütige Zentrifugation bei 2 600 rpm entfernt. Danach wurde das Säulchen in ein frisches Eppendorftube gestellt. Der Reaktionsansatz wurde auf 50 μl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und

auf das Säulenmaterial pipettiert. Danach wurde die Zentrifugation bei 2 600 rpm für 2 min wiederholt. Durch das Säulenmaterial wurden freie Nukleotide sowie Puffersubstanzen abgefangen. Die so gereinigten *in vitro* Transkripte, welche sich im Durchfluss befinden, können bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden.

2.3.23.7 Analyse der radioaktiv markierten *in vitro* Transkripte

Die *in vitro* transkribierte RNA wurde zunächst von freiem [α -P³²]-UTP unter Verwendung von illustra™ MicroSpin™ G50- oder G25 Columns bereinigt (siehe Kapitel 2.3.23.6). Um zu testen, ob durch die *in vitro* Transkription (nur) Transkripte der gewünschten Länge synthetisiert wurden, wurde 1 μ l des Ansatzes 1/10 verdünnt. Von der Verdünnung wurde 1 μ l mit 9,0 μ l ddH₂O und 7,0 μ l FU-Mix gemischt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Die RNA wurde in einem 10%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und mittels Phosphoimaging analysiert.

2.3.23.8 Analyse der nicht radioaktiv markierten *in vitro* Transkripte

Zur Analyse der nicht radioaktiv markierten *in vitro* Transkripte wurde 1 μ l des *in vitro* Transkriptionsansatzes mit 9,0 μ l ddH₂O und 7,0 μ l FU-Mix gemischt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Die RNA wurde in einem 10%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung für Transkripte der gewünschten Länge analysiert.

2.3.24 Aufreinigung der RNA-Transkripte

In vitro Transkripte, welche als klare Einzelbanden im analytischen Harnstoff-Polyacrylamid-Gel sichtbar waren, konnten direkt über Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kapitel 2.3.24.2) gereinigt und im Anschluss gefällt werden. *In vitro* Transkripte, welche mehrere Banden im analytischen Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufwiesen, wurden über Gelextraktion (siehe Kapitel 2.3.24.1) zunächst separiert und im Anschluss über Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und darauf folgend gefällt.

2.3.24.1 Gelextraktion

Zur Aufreinigung der RNA von *in vitro* Transkripten, welche mehr als eine Bande im analytischen Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufwies, wurde der Transkriptionsansatz zunächst auf ein präparatives Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Dazu wurde der *in vitro* Transkriptionsansatz (25 µl) mit 20 µl FU-Mix versetzt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Nach Auftragung auf das Gel (in eine einzelne große Tasche) wurde die RNA der Größe nach im Gel aufgetrennt. Radioaktiv markierte *in vitro* Transkripte wurden mittels Röntgenfilm unter Rotlicht entwickelt und der Röntgenfilm im Anschluss als Schablone zum Ausschneiden der gewünschten Bande genutzt. Nicht radioaktiv markierte *in vitro* Transkripte wurden mittels Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Das RNA-haltige Gelstück wurde in ein 0,5 ml Eppendorftube überführt, dessen Boden mit einer Nadel zuvor durchbohrt wurde. Das 0,5 ml Eppendorftube wurde in ein zweites, 1,5 ml Eppendorftube gestellt und für ca. 30 s bei 17 000 g zentrifugiert. Über die Zentrifugationskräfte wurde das Gel aus dem 0,5 ml Eppendorftube in das 1,5 ml Eppendorftube gedrückt und dabei zerkleinert. Die Gelstücke wurden im Anschluss mit 420 µl RNA-Elutionspuffer überschichtetet und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem *tumbler* inkubiert, wobei die RNA aus dem Gel in den Elutionspuffer übertritt.

Tabelle 54. Zusammensetzung des RNA-Elutionspuffers.

Lösung	Komponenten
RNA-Elutionspuffer	2,5% Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (w/w) 500 mM Natriumacetat pH 4.5 1 mM EDTA

2.3.24.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Fällung der RNA

Zur Aufreinigung der RNA von Proteinrückständen aus der *in vitro* Transkription wurde zunächst 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) zum *in vitro* Transkriptionsansatz zugesetzt. Der Ansatz wurde mittels Vortexer gemischt und im Anschluss über 10 min bei 17 000 g zentrifugiert. Die dabei entstehende wässrige, RNA-haltige obige Phase wurde in ein frisches Eppendorftube überführt und zur Entfernung von Phenolresten mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) versetzt. Der Ansatz wurde wiederum gevortext und bei 17 000 g über 10 min zentrifugiert. Die obige, wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein frisches Eppendorftube überführt und mittels 2,5 Volumen 96%-igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4.5

über Nacht bei -20°C gefällt. Die RNA wurde über Zentrifugation bei 17 000 g über 20 min bei 4°C präzipitiert und im Anschluss mit 75%-igem Ethanol gewaschen. Das RNA Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 20 µl ddH₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Die c.p.m. (*counts per minute*) radioaktiv markierter RNA wurde mittels Scintillationszähler (je 2,0 µl RNA) und die Konzentration von nicht radioaktiv markierter RNA mittels NanoDrop gemessen.

2.3.25 Markierung von RNA am 5' Ende mittels [γ -P³²]-ATP

Für *in vitro* Assays wurde u.a. als Substrat poly(A) RNA verwendet, welche am 5'-Ende mit P³² markiert wurde. Die Reaktion des *endlabeling* der RNA wurde durch die T4 Polynukleotid Kinase Kinase (PNK) katalysiert, welche das γ -Phosphat von ATP (hier [γ -P³²]-ATP) an den Hydroxyl-Terminus am 5'-Ende der RNA zu transferiert.

Tabelle 55. Komponenten für die 5' Markierung von RNA mittels [γ -P³²]-ATP.

Volumen; Σ = 20 µl	Komponenten
2 µl	10x PNK buffer A
0,5 µl	RNasin® (40 U/µl)
2 µl	RNA (10 pmol/µl)
1 µl	T4 PNK Kinase
3	[γ -P ³²]-ATP (10 µCi/µl)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und mittels 30 µl STE-Puffer gestoppt. Im Anschluss wurde die poly(A) RNA von freiem [γ -P³²]-ATP unter Verwendung von illustra™ MicroSpin™ G25 Columns bereinigt.

Tabelle 56. Zusammensetzung der STE-Stopplösung.

Lösung	Komponenten
STE-Stopplösung	0.1 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM EDTA

2.3.26 Markierung von DNA-Sonden am 5' Ende mittels [γ -P³²]-ATP

Um spezifische RNA mittels Northern Blot nachzuweisen, wurde eine komplementäre DNA-Sonde am 5'-Ende mittels [γ -P³²]-ATP radioaktiv markiert. Die DNA-Sonde wurde bei Eurofins Scientific synthetisiert. Die Reaktion des *endlabeling* der DNA wurde dabei durch die T4 Polynukleotid Kinase (PNK) katalysiert.

Tabelle 57. Komponenten für die 5' Markierung von DNA-Sonden mittels [γ -P³²]-ATP.

Volumen; Σ = 10 μl	Komponenten
1 μ l	10x PNK buffer A
2 μ l	DNA (10 pmol/ μ l)
1 μ l	T4 PNK Kinase
3	[γ -P ³²]-ATP (10 μ Ci/ μ l)
ad 10 μ l	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und mittels 40 μ l STE-Puffer (siehe Tabelle 56) gestoppt. Im Anschluss wurde die DNA-Sonde von freiem [γ -P³²]-ATP unter Verwendung von illustra™ MicroSpin™ G25 Columns bereinigt.

2.3.27 Polyadenylierungs- und Degradationsassays

Polyadenylierungs- und Degradationsassays wurden in dieser Arbeit verwendet, um die Prozessierung (Polyadenylierungsassays) oder die Degradation (Degradationsassays) einer RNA durch das Exosom zu verfolgen bzw. zwischen verschiedenen exosomalen Komplexen zu vergleichen.

Für Degradations- oder Polyadenylierungsassays wurden 1000 c.p.m. radioaktiv markierter RNA pro Reaktion verwendet und die entsprechende Substratkonzentration pro Reaktion mit nicht radioaktiv markierter RNA angeglichen.

Substratansatz für 20 Reaktionen:

Tabelle 58. Substratansatz für Polyadenylierungs- und Degradationsassays.

Substratansatz für 20 Reaktionen	Komponenten
x µl	radioaktiv markierte RNA (insgesamt 20 000 c.p.m., entspricht 1 000 c.p.m. pro Reaktion)
y µl	nicht radioaktiv markierte RNA (Einstellung auf die gewünschte Endkonzentration RNA pro Reaktion)
Ad 40 µl	RNA-freies ddH ₂ O

Die Reaktion fand in einem Volumen von 10 µl mit 60 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 20 mM Hepes pH 7.9, 0.1 mM EDTA sowie 2 mM DTT statt. BSA wurde als zusätzliche Pufferkomponente in Assays zur Untersuchung von Nop5, genutzt, mit einer Konzentration von 0,02 mg/ml. Des Weiteren war dem Reaktionsansatz 10 mM KH₂PO₄ (Degradationsassays) oder 10 mM ADP (Polyadenylierungsassays) zugesetzt.

Tabelle 59. Zusammensetzung des 5x Assay-Puffers.

5x Puffer	Komponenten
300 mM	KCl
40 mM	MgCl ₂
100 mM	Hepes pH 7.9
0.5 mM	EDTA
10 mM	DTT
(0.1 mg/ml)	(BSA)

Die Reaktionen fanden bei 60°C statt. Zeitpunkte für Reaktionen wurden so gewählt, dass die Prozessierung der RNA bzw. der Abbau der RNA über die Zeit als Kinetik ersichtlich war.

Pro Reaktion wurde 0.3 pmol des exosomalen Komplexes eingesetzt, die Kontrollreaktion enthielt ddH₂O anstelle des exosomalen Komplexes. Für den exosomalen Komplex wurde der hexamere Ring (siehe Kapitel 2.3.18.1) verwendet, welcher in Aliquote bei -80°C aufbewahrt wurde und nur einmalig aufgetaut wurde. Dem hexameren Ring wurde vor Verwendung 1 mM DTT (Endkonzentration) zugesetzt.

Zur Rekonstitution des exosomalen Komplexes wurden dem hexameren Ring, in stöchiometrischer Menge, die Kappenproteine zugesetzt und der Proteinansatz 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei vergleichenden Assays, z.B. bei einem Vergleich des RNA-Abbaus zwischen dem Rrp4-Exosom und dem Rrp4-Exosom mit Nop5, wurde in den Proteinansatz, welcher ohne Nop5 rekonstruiert wurde,

der Puffer von Nop5 in entsprechender Menge zugesetzt. Somit wurde gewährleistet, dass zwischen beiden Komplexen gleiche ionische Voraussetzungen herrschten.

Tabelle 60. Protein-Mastermix für Polyadenylierungs- und Degradationsassays.

Proteinansatz 1x	Mastermix Proteinansatz 6x	Komponenten
0.3 pmol	1.8 pmol	Hexamerer Ring
0.3 pmol	1.8 pmol	Kappenprotein bzw. Puffer

Der Mastermix für den exosomalen Komplex enthielt die Proteinmenge für eine zusätzliche Reaktion. Nach Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur, zur Rekonstitution des exosomalen Komplexes, wurde dem Reaktionsmastermix für 5 Reaktionen exosomaler Komplex zugesetzt.

Tabelle 61. Mastermix für Polyadenylierungs- und Degradationsassays.

Reaktionsansatz 1x, Σ = 8 µl	Mastermix Reaktions- ansatz 5x, Σ = 40 µl	Komponenten
2 µl	10 µl	5x Puffer
1 µl	5 µl	100 mM KH ₂ PO ₄ (Degradationsassays) bzw. 100 mM ADP (Polyadenylierungsassays)
x µl (0.3 pmol)	5*x µl (1.5 pmol)	exosomaler Komplex
Ad 8 µl	Ad 40 µl	RNA-freies ddH ₂ O

Der Reaktionsmastermix wurde im Eppendorftube für den Zeitpunkt „Null“ angesetzt, nach Zugabe des exosomalen Komplexes gemischt und zu je 8 µl in die Eppendorftubes für die restlichen Zeitpunkte des Assays aliquotiert.

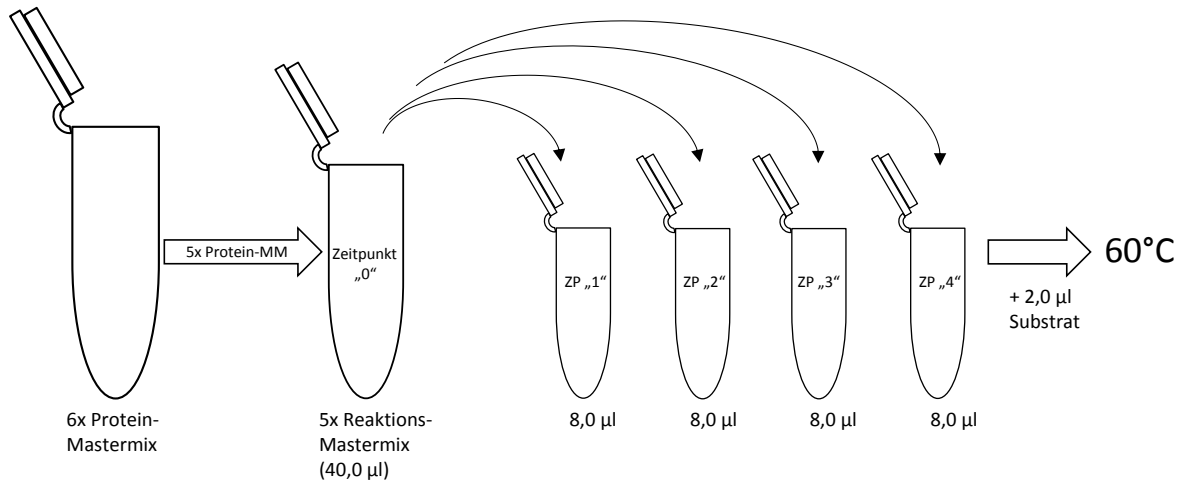


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Pipettierschemas der Reaktionsansätze. Nach Herstellung des Mastermixes für den exosomalen Komplex wurde dieser dem Reaktionsmastermix zugesetzt. Von diesem Reaktionsmastermix ausgehend wurden die einzelnen Reaktionen zu je 8,0 µl aliquotiert. 2,0 µl Substrat wurde erst direkt vor Reaktionsbeginn in jede der Einzelreaktionen hinzugesetzt und die Reaktion auf 60°C gestellt.

Je 2 µl Substrat wurde direkt vor Reaktionsbeginn zugesetzt und die Reaktion bei 60°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 7 µl FU-Mix abgestoppt und die Eppendorftubes direkt auf Eis inkubiert. Die Proben wurden für 10 min bei 65°C denaturiert und auf ein denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel geladen. Die RNA wurde über zwei Stunden bei 500 V in 1x TBE-Puffer bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die Signale wurden mittels Phosphoimaging visualisiert und Quantity One Software (BioRad) quantifiziert.

Tabelle 62. Komponenten von 10%-igen und 16%-igen Harnstoff-PAA-Gelen für RNA.

Komponenten Harnstoff-PAA-Gel	10%	16%
Harnstoff	9,6 g	9,6 g
10x TBE	2 ml	2 ml
40% (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid Lösung	5 ml	8 ml
ddH ₂ O	Ad 20 ml	Ad 20 ml
10% APS (w/v)	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 63. Zusammensetzung des FU-Mixes.

Lösung	Komponenten	Bemerkung
2 x Formamid-Harnstoff-Puffer („FU-Puffer“)	6 M Harnstoff 80 % (v/v) deionisiertes Formamid 10 % (v/v) 10x TBE 0,1 % (w/v) Xylencyanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau	5 Minuten auf 60°C erhitzen, damit sich der Harnstoff löst

2.3.28 Electro mobility shift assay (EMSA)

EMSA-Assays wurden in dieser Arbeit verwendet, um die Bindung von einem Protein an die RNA *in vitro* nachzuweisen. Bei Bindung des Proteins läuft die RNA im Gel verlangsamt im Vergleich zu RNA allein; dies äußert sich in einem *shift* der RNA im Gel nach oben. Die RNA wurde zur Visualisierung radioaktiv markiert.

Für EMSA-Assays wurden 2 500 c.p.m. radioaktiv markierter RNA pro Reaktion verwendet, Substratkonzentrationen radioaktiv markierter RNA lagen bei 8 fmol pro Reaktion. Für spezifische RNA Konzentrationen (bei Kompetitions-EMSAs) wurden bei Bedarf Substratkonzentrationen mit kalter RNA angepasst.

Substratansatz für 20 Reaktionen:

Tabelle 64. Substratansatz für EMSA-Assays.

Substratansatz für 20 Reaktionen	Komponenten
x µl	radioaktiv markierte RNA (insgesamt 50 000 c.p.m., entspricht 2 500 c.p.m. pro Reaktion)
y µl	kalte Kompetitor-RNA
Ad 40 µl	RNA-freies ddH ₂ O

Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 60 mM KCl, 10 mM MgCl, 20 mM HEPES pH 7.9, 0,1 mM EDTA, 2% Glycerin sowie 2 mM DTT statt.

Tabelle 65. Komponenten des 5x Bindungspuffers für EMSA-Assays.

5x Bindungspuffer	Komponenten
300 mM	KCl
50 mM	MgCl ₂
100 mM	Hepes pH 7.9
0.5 mM	EDTA
10%	Glycerin
10 mM	DTT

Den Einzelreaktionen wurde der exosomale Komplex in steigenden Konzentrationen zugesetzt, die Kontrollreaktion enthielt RNA-freies ddH₂O anstelle des Proteinkomplexes.

Tabelle 66. Mastermix für EMSA-Assays.

Reaktionsansatz 1x, $\Sigma = 8 \mu\text{l}$	Komponenten
2 μl	5x Puffer
x μl (0.3 pmol – 20 pmol)	exosomaler Komplex
Ad 8 μl	RNA-freies ddH ₂ O

Je 2 μl Substrat wurde direkt vor Reaktionsbeginn zugesetzt und die Reaktion für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden mit 1 μl EMSA-Ladepuffer versetzt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden auf nicht-denaturierendes 5%-iges Polyacrylamid-TBE-Gel geladen. Als Kontrolle über die Laufzeit wurde 7 μl FU-Mix in die äußerste Tasche als Marker pipettiert. Sowohl Beladung als auch Elektrophorese wurde bei 4°C vorgenommen. Die Auftrennung der Proben erfolgte über drei Stunden bei 250 V in 0,5x TBE-Puffer. Die Signale wurden mittels Phosphoimaging visualisiert und mittels Quantity One Software (BioRad) quantifiziert.

Tabelle 67. Komponenten von 10%igen und 16%igen Harnstoff-PAA-Gelen für RNA.

Komponenten	5% PAA
10x TBE	1 ml
Acrylamid (30% w/v)/ Bisacrylamid (0.8% w/v)	3,33 ml
ddH ₂ O	Ad 20 ml

Die drei gelisteten Komponenten wurden gemischt und im Anschluss mit APS und TEMED versetzt um den Polymerisierungsvorgang auszulösen:

10% APS (w/v)	100 μl
TEMED	10 μl

Tabelle 68. Ladepuffer für EMSA-Assays.

Lösung	Komponenten
EMSA-Ladepuffer	0,05x TBE 50% Glycerin 0,1 % Bromphenolblau

2.3.29 RNA-Isolationsmethoden

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Sulfolobus solfataricus* wurden in dieser Arbeit Zellkulturen verwendet, welche seit ca. einem Tag in der stationären Wachstumsphase waren und sich somit in identischen Wachstumsbedingungen befanden wie Zellmaterial welches für den iCLIP (siehe Kapitel 2.3.33) verwendet wurde.

2.3.29.1 Hot Phenol Extraktion von Gesamt-RNA aus *Sulfolobus solfataricus*

50 ml Zentrifugationsröhrchen wurden ca. zur Hälfte mit Eis gefüllt und vorgekühlt bevor sie zur Ernte der Zellkulturen von *S. solfataricus* genutzt wurden. 20 ml Zellkultur wurde auf das vorgelegte Eis, zum schnelleren Abkühlen der Zellen, gegeben und bei 8 000 rpm über 8 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 125 µl Resuspensionspuffer aufgenommen (auf Eis), in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorftube überführt und mit 125 µl Lysepuffer versetzt. Da SDS Bestandteil des Lysepuffers ist, und bei Kälte ausfällt, erfolgte die Zugabe des Lysepuffers bei Raumtemperatur. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte für 90 s bei 65°C. 400 µl, auf 65°C vorgewärmtes, Phenol-Wasser wurde zugesetzt, die Lösung gevortext bis die Probe homogen war und für 3 min bei 65°C inkubiert. Proteine sammeln sich dabei in der organischen phenolhaltigen Phase an, Nukleinsäuren in der wässrigen Phase. Die Probe wurde für 30 s in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss zur besseren Trennung von Proteinen, DNA und RNA für 10 min bei 17 000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei kam es zur Phasentrennung: die oberste wässrige Phase enthält RNA wohingegen in der Interphase DNA und Proteine zu finden sind. Die untere phenolhaltige Phase enthält Proteine sowie Zelltrümmer. Aufgrund dessen wurde die RNA-haltige Phase in ein frisches RNase freies 1,5 ml Eppendorftube überführt. Die Schritte ab Zugabe des vorgewärmten Phenol-Wassers wurden noch 2-malig wiederholt. Die wässrige obere Phase wurde erneut in ein frisches Eppendorftube überführt und mit 250 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und zur Phasentrennung für

3 min bei 17 000 g zentrifugiert. Durch Zugabe von Chloroform-Isoamylalkohol werden Phenolreste entfernt, welche noch in der Lösung vorhanden sein können und sich im Chloroform-Isoamylalkohol ansammeln. Der obere wässrige Überstand wurde erneut in ein frisches Eppendorftube überführt und zur Fällung der RNA mit 1/10 Volumen Natriumacetat pH 4.5 sowie 2.5 Volumen 96%-igem Ethanol versetzt. Die Lösung wurde durch mehrmaliges invertieren gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA bei 17 000 g und 4°C über 20 min sedimentiert und mit 75%-igem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde im Anschluss an der Luft getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop gemessen (siehe Kapitel 2.3.17.1) und gegebenenfalls auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Tabelle 69. Lösungen zur Isolierung von RNA mittels Hot-Phenol.

Lösung	Komponenten
Resuspensionspuffer	0,3 M Saccharose 10 mM Natriumacetat pH 4.5
Lysepuffer	2% SDS 10 mM Natriumacetat pH 4.5

2.3.29.2 TRizol Extraktion von Gesamt-RNA aus *Sulfolobus solfataricus*

Die Methode der TRizol Extraktion wurde in dieser Arbeit verwendet, um Gesamt-RNA aus *S. solfataricus* zu isolieren, welche im Anschluss mit RNase R für die Detektion zirkulärer RNA behandelt wurde.

50 ml Zentrifugationsröhrchen wurden ca. zur Hälfte mit Eis gefüllt und vorgekühlt bevor sie zur Ernte der Zellkulturen von *S. solfataricus* genutzt wurden. 20 ml Zellkultur wurde auf das vorgelegte Eis, zum schnelleren Abkühlen der Zellen, gegeben und bei 8 000 rpm über 8 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 600 µl TRizol aufgenommen, zur Resuspendierung kurz gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 120 µl Chloroform zugesetzt, das Eppendorftube stark gevortext und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels Zentrifugation bei 17 000 g für 15 min bei 4°C erfolgte die Phasentrennung. Die obere, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig in ein frisches, RNA-freies Eppendorftube überführt und zum gleichen Volumen mit 70%-igen Ethanol versetzt. Die Lösung wurde in ein RNeasy Mini column überführt. Nach Zentrifugation bei 10 000 rpm für eine Minute wurde der Durchfluss verworfen und mittels 700 µl Lösung RW1 gewaschen. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Nach einer Minute Zentrifugation bei 10 000 rpm wurde der Durchfluss abermals verworfen und der Vorgang mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt. Nach Verwerfen des Durchflusses

wurde das Säulchen in ein frisches, RNase-freies 1,5 ml Eppendorftube überführt und ein weiteres Mal bei 10 000 rpm für eine Minute zentrifugiert um restlichen verbliebenen Puffer aus der Säule zu entfernen. Die Säule wurde wieder in ein frisches RNase-freies 1,5 ml Eppendorftube überführt und die RNA mittels 30 μ l DEPC-H₂O eluiert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte im Anschluss am NanoDrop (siehe Kapitel 2.3.17.1).

Vor Behandlung mit RNase R wurde die RNA mittels TURBO-DNase (siehe Kapitel 2.3.29.3) behandelt, um eventuell vorhandene DNA zu entfernen.

2.3.29.3 DNase-Verdau

Für die Reverse Transkription von RNA in cDNA musste sichergestellt werden, dass die RNA-Probe DNA-frei war. Dafür wurde die RNA mittels TURBO-DNase behandelt. Da Phenol die DNase-Reaktion hemmt, wurde im Vorfeld der Hot-Phenol-Extraktion der Chloroform-Isoamylalkohol-Schritt doppelt vorgenommen.

Der DNase-Verdau fand mittels TURBO-DNase-Kit von Ambion statt. Für den Verdau wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 70. Reaktionsansatz für DNase Verdau.

Volumen; Σ = 50 μl	Komponenten
x μ l	RNA (5 μ g)
1 μ l	RNasin [®] (40 U/ μ l)
5 μ l	10x TURBO-DNase Puffer
1 μ l	TURBO-DNase
ad 50 μ l	ddH ₂ O

Der Verdau der DNA fand bei 37°C für 30 min statt. Im Anschluss wurde 1/10 des Volumens an TURBO-DNase Inaktivierungsreagenz zur Reaktion zugesetzt, gut gemischt und die Reaktion für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde der Reaktionsansatz 2 – 3 malig gemischt und im Anschluss bei 10 000 g über 90 s zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches RNase-freies 0,5 ml Eppendorftube überführt.

Kontrolle auf erfolgreichen DNase-Verdau

Um sicherzustellen, dass keine DNA mehr in den RNA-Proben vorhanden war, wurde eine Test-PCR durchgeführt, welche gegen das Gen der 16S rRNA gerichtet war. Jeweils 100 ng RNA wurde in den

Test-PCR-Ansatz gegeben sowie eine Positiv-Kontrolle mit 100 ng genomischer DNA aus *Sulfolobus solfataricus* durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente, anstelle von RNA oder DNA, ddH₂O.

Tabelle 71. PCR-Reaktionsansatz zur Kontrolle des DNase-Verdau.

Volumen; $\Sigma = 10 \mu\text{l}$	Komponenten
2 μl	5x HF-Puffer
0,2 μl	100 mM dNTP's
x μl	100 ng/ μl Matritze (chromosomale DNA, RNA, ddH ₂ O)
0,2 μl	10 pM vorwärtiger Primer
0,2 μl	10 pM rückwärtiger Primer
0,2 μl	Phusion® Polymerase (eigenproduziert)
ad 10 μl	ddH ₂ O

Die PCR-Reaktion wurde auf ein PAA-Gel (siehe Kapitel 2.3.1.2) aufgetragen und zur Visualisierung mittels Ethidiumbromid gefärbt.

2.3.30 Behandlung von TRizol verdauter RNA mit RNase R

RNase R ist eine 3' - 5' Exoribonuklease, welche in der Lage ist lineare RNA zu verdauen, jedoch keine circulären RNAs, RNAs mit Lasso-Strukturen oder doppelsträngige RNA (3' Überhänge kleiner als 7 Nukleotide) angreift [170]. Aufgrund dessen wurde die RNase R in dieser Arbeit genutzt um circuläre RNA von *S. solfataricus* nachzuweisen.

5 μg DNase freie Gesamt-RNA von *S. solfataricus* wurde mit insgesamt 45 Units RNase R behandelt. Dabei erfolgte der Verdau in zwei Schritten. In einem ersten Verdau wurden 15 Units für 5 μg RNA verwendet, in einem sich anschließenden zweiten Verdau wurde die behandelte RNA ein weiteres Mal mit 30 Units RNase R behandelt. Zur Kontrolle wurden weitere 5 μg DNase freie Gesamt-RNA von *S. solfataricus*, ohne Zugabe von RNase R, der gleichen Behandlung unterzogen.

2.3.30.1 Erste RNase R Behandlung**Tabelle 72.** Reaktionsansatz für die RNase-Behandlung.

Volumen; $\Sigma = 20 \mu\text{l}$	RNase R Behandlung	Kontrolle
2 μl	10x RNase R Puffer	10x RNase R Puffer
x μl	DNase freie RNA	DNase freie RNA
0,75 μl	RNase R	-
ad 20 μl	DEPC-ddH ₂ O	DEPC-ddH ₂ O

Der Verdau der RNA fand bei 37°C über 15 min statt. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze mit DEPC-ddH₂O auf 200 μl Gesamtvolumen aufgefüllt und die RNA mittels Zugabe von 200 μl Phenol-Chloroform isoliert. Nach Zentrifugation bei 17 000 g für 5 min bei 4°C wurde die obere RNA-haltige wässrige Phase in ein frisches Eppendorf tube überführt. Die Fällung der RNA erfolgte mit 1 μl Glycogen, 20 μl 3 M Natrium-Acetatlösung (pH 5.2) sowie 600 μl 96%-igen Ethanol bei -20°C über Nacht. Im Anschluss wurde die RNA mittels bei 17 000 g und 4°C für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%-igen Ethanol gewaschen. Die RNA wurde luftgetrocknet und in 20 μl DEPC-ddH₂O aufgenommen.

2.3.30.2 Zweite RNase R Behandlung

Die RNA wurde ein weiteres Mal mit 6 Units RNase R je μl Gesamt-RNA behandelt.

Tabelle 73. Reaktionsansatz für die zweite RNase-Behandlung.

Volumen; $\Sigma = 25 \mu\text{l}$	RNase R Behandlung	Kontrolle
2,5 μl	10x RNase R Puffer	10x RNase R Puffer
20 μl	RNase R behandelte RNA	Kontroll-RNA
1,5 μl	RNase R	-
ad 25 μl	DEPC-ddH ₂ O	DEPC-ddH ₂ O

Der Verdau der RNA fand bei 37°C über 45 min statt. Im Anschluss wurde die verdaute RNA wie nach der ersten Behandlung mit RNase R aufgereinigt und in 20 μl DEPC-ddH₂O aufgenommen, wodurch eine (heruntergerechnete) Konzentration von 250 ng/ μl resultierte. Eine Messung der RNA am NanoDrop war an dieser Stelle nicht möglich, da nach erfolgreicher Behandlung mit RNase R allein zirkuläre RNA zurück bleib, welche aufgrund geringer Konzentration nicht mehr im messbaren

Bereich lag. Eine Kontrolle auf erfolgreichen RNase R Verdau erfolgte mittels Auftrennung von 500 ng RNA (mit und ohne RNase R-Behandlung) im 10%-igen Harnstoff-TBE-Gel.

2.3.31 Nachweis zirkulärer RNA mittels RT-PCR über Agilent Kit

Für den Nachweis zirkulärer RNA wurden Primer so designt, dass nach außen laufende Primer nur ein Produkt liefern, wenn RNA in zirkulärer Form vorliegt und nach innen laufende Primer ein Produkt liefern, wenn RNA in linearer Form vorliegt (siehe Abbildung 13).

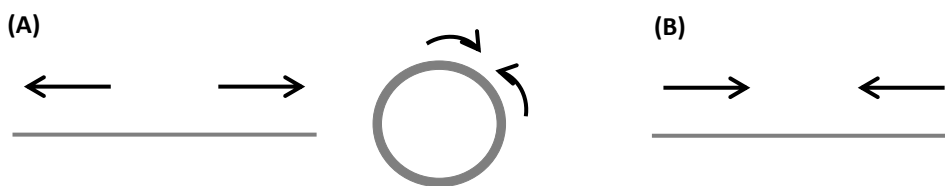


Abbildung 13. Schematische Illustration des Designs für RT-PCR Primer, welche gegen zirkuläre RNA-Produkte (A) oder lineare RNA-Produkte (B) gerichtet sind. Kreise illustrieren zirkuläre RNA, Linien illustrieren lineare RNA. Pfeile illustrieren die Laufrichtung der Primer.

RNase R behandelte RNA (bzw. Kontroll-RNA) wurde auf 50 ng/μl verdünnt.

Für die semiquantitative RT-PCR wurde der Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix von Agilent Technologies verwendet.

Tabelle 74. Reaktionsansatz für die RT-PCR.

Volumen; Σ = 10 μl	Komponenten
5 μl	RT-PCR Mastermix
1 μl	10 pM vorwärtiger Primer
1 μl	10 pM rückwärtiger Primer
0,1 μl	DTT
0,5 μl	Block
100 ng	RNA (RNase R, oder - RNase R) oder DNA oder ddH ₂ O
ad 10 μl	ddH ₂ O

Bedingungen der RT-PCR-Reaktion sind in der folgenden Tabelle 75 aufgeführt:

Tabelle 75. Bedingungen für die RT-PCR.

Temperatur	Zyklus	Zeit	Bemerkung
50 °C	1	10 min	Reverse Transkriptase-Reaktion
95 °C	1	3 min	Initiale Denaturierung
95 °C	} 25 Zyklen	30 s	Denaturierung
52 °C		30 s	Anlagerung der Primer
72 °C		1 min/kb	Elongation
72 °C	1	10 min	Fertigstellen der Replikationsprodukte

Die Auftrennung der RT-PCR erfolgte in 10%-igen TBE-Gel. Die erwarteten Mengen der PCR-Produkte für den erfolgreichen Nachweis zirkulärer RNA mit und ohne Behandlung durch RNase R ist in Abbildung 14 dargestellt.

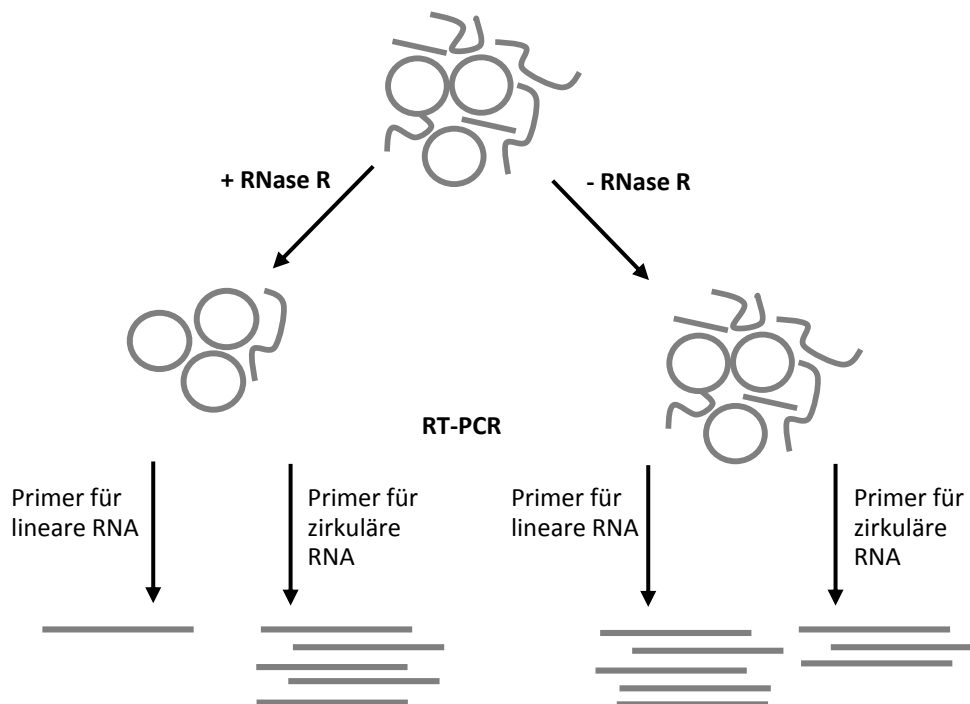


Abbildung 14. Schematische Illustration der Behandlung der Gesamt RNA von *S. solfataricus* mit und ohne RNase R-Behandlung, mit anschließender RT-PCR. Kreise illustrieren zirkuläre RNA, Linien illustrieren lineare RNA. Die Mengen erwarteter PCR-Produkte sind schematisch veranschaulicht.

2.3.32 Northern Blot

Über das Northern Blot-Verfahren kann spezifische RNA mittels komplementärer DNA-Sonde spezifisch nachgewiesen werden. Die DNA-Sonden werden mittels γ -ATP radioaktiv 3' Endmarkiert; der Nachweis schließlich erfolgt nach Exposition der Membran über Phosphoimaging.

Nach der Auftrennung der RNA-Proben im 10%-igen Harnstoff-PAA-Gel (siehe Kapitel 2.3.27), wurde die RNA mittels Semidry Blot auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Übertragungsbedingungen lagen dabei bei 250 mA über 2,5 Stunden in 1x TBE. Der Aufbau des Semidry-Blots erfolgte möglichst luftblasenfrei beginnend der Kathode: drei Lagen Whatman-Papier gefolgt von der Nitrozellulose-Membran, Gel und abschließend drei weiteren Lagen Whatman-Papier wurden aufeinandergestapelt. Zu beachten war, dass einerseits die Whatman-Papier mit Transferpuffer getränkt wurden und andererseits die Nitrozellulose-Membran mittels Inkubation in 1x TBE aktiviert wurde. Nach dem Blotting wurde die Membran in eine Northern-Röhre gelegt und für eine Stunde in Prähybridisierungspuffer für die folgende Inkubation mit der DNA-Sonde äquilibriert. Die Röhren wurden während des gesamten Inkubationsverfahrens im Hybridisierungsöfen bei 42°C rotierend gelagert. Nach Prähybridisierung wurden 1 000 000 c.p.m. radioaktiv markierter DNA-Sonde in den Puffer zugesetzt und Membran über Nacht inkubiert.

Tabelle 76. Genutzte Puffer des Northern Blots.

Lösung	Komponenten
Church Puffer	2,5 g BSA 125 ml 1 M NaP SDS (20% w/v) EDTA 250 mM ad. 250 ml ddH ₂ O
NaP-Puffer	134 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 4 ml H ₃ PO ₄ (85%) Borsäure ad. 1 L ddH ₂ O
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat x 2 H ₂ O ad. 1 L ddH ₂ O
1x SSC Waschpuffer	1x SSC 0,01% SDS ad. 1 L ddH ₂ O

Der Nachweis des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte dabei mittels Ponceau-Rot. Die Membran wurde mit 0,1 N NaOH-Lösung im Anschluss entfärbt und durch 30 ml Blocking-Lösung für 1 - 2 Stunden (bei Raumtemperatur) gegen unspezifische Antikörperbindung blockiert. Die Membran wurde daraufhin mit drei Waschsritten zu je 10 min mit 1x TBS-Lösung gewaschen und folgend mit dem Primärantikörper (in Antikörper-Lösung) für 1 – 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 1-malig mit 1x TBS-TT und 2-malig mit 1x TBS-Lösung für jeweils 10 min gewaschen. Der Sekundärantikörper (in Antikörper-Lösung) wurde für weitere 1 – 2 Stunden mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift TBS-TT und zwei Waschsritten TBS zu je 10 min. Zur Detektion wurde die Membran mit Lumi-Light Western Blotting Substrat im Verhältnis 1:1 überschichtet und das Signal mittels des Illumiimager visualisiert.

2.3.33 iCLIP (individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation)

Die Methode des iCLIP wurde in dieser Arbeit genutzt, um *in vivo* Interaktionen zwischen RNA und dem Exosom aus *S. solfataricus* zu untersuchen. Die Auflösung der Methode erlaubt dabei das Nukleotid der RNA zu bestimmen, welches mit dem RNA-bindenden Protein interagiert. Über die Kombination von Co-Immunopräzipitation mit Next-Generation-Sequenzierung konnten in dieser Arbeit RNAs identifiziert werden, welche *in vivo* durch das Exosom von *S. solfataricus* gebunden werden. Verwendet wurden Antikörper, welche gegen die Untereinheiten Rrp4 und Rrp41 des Exosoms gerichtet waren. Als Kontrolle wurde ein Antikörper gegen Thioredoxin gerichtet verwendet, um unspezifische Bindungen von RNA an die genutzten Antikörper auszuschließen.

2.3.33.1 Crosslink

Um RNA-Proteinkomplexe für das Protokoll des iCLIP zu vernetzen wurde die Methode des UV-Crosslinks gewählt. Der UV-Crosslink verbindet dabei das interagierende Nukleotid der RNA irreversibel mit dem RNA-bindenden Protein.

Vorbereitend auf den Crosslink wurde *Sulfolobus solfataricus* zunächst im Fermenter (siehe Kapitel 2.2.8) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Zur Ernte wurden die Zentrifugenbehälter zu einem Drittel mit Eis gefüllt, um *S. solfataricus* schnell herunter zu kühlen. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 000 g über 15 min bei 4°C. Die Zellpellets wurden mit kaltem 1x PBS gewaschen. Je 0,8 g Zellen

wurden in 40 ml kaltem 1x PBS resuspendiert und in eine große Petrischale gegeben. Die Petrischalen wurden auf Eis gestellt und mittels UV gecrosslinkt: Insgesamt wurde pro 0,8 g Zellen 4-malig zu je 300 mJ bei 254 nm gecrosslinkt. Nach jedem Crosslink wurde die Petrischale leicht geschenkt um die Zellen besser zu verteilen und zu mischen. Die gecrosslinkten Zellen wurden gepoolt und bei 4 000 g über 15 min bei 4°C pelletiert. Die Zellen wurden zu je 0,5 g bei -80°C gelagert.

2.3.33.2 Herstellung des Zellextraktes

Tabelle 77. Zusammensetzung des Lysepuffers.

Lysepuffer	Komponenten
10 mM	Tris pH 7.5
150 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
10%	Glycerol
0,1%	Nonidet P40
1 mM	PMSF

Je 0,5 g Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 4,5 ml Lysis Puffer aufgenommen. Mittels Sonifizierung wurden die Zellen auf Eis aufgeschlossen. Es wurde die große Sonatode bei einer Power von 70% über 5 Zyklen zu je 30 s verwendet. Zelltrümmer wurden im Anschluss bei 5 000 g über 30 min bei 4°C zentrifugiert und das Zelllysate in frische 50 ml Falcontubes überführt.

2.3.33.3 DNA und limitierter RNA Verdau

Jede Probe zu je 4 ml Zelllysate wurde folgender Behandlung unterzogen:

Um RNA zu kürzen und gleichzeitig die enthaltene DNA der Proben zu verdauen wurde je Probe 450 µl 10 x RQ1-Puffer, 10 µl TURBO-DNase, 4 µl RNaseOUT sowie 45 µl RNase I-Verdünnung (1: 100) zugesetzt. Die Proben wurden für 6 min bei 37°C inkubiert, wobei sie bei 180 rpm geschüttelt wurden. Dabei befanden sie sich im 37°C warmen Wasserbad um eine gleichmäßige Temperatur zu gewähren. Im Anschluss wurden die Proben für mindestens 5 min auf Eis gestellt.

RNase I Verdünnung (1: 10): 2 µl RNase I (100 U/µl) in 18 µl RQ1-buffer

RNase I Verdünnung (1: 100): 5 µl RNase I (1: 10 Verdünnung) in 45 µl RQ1-buffer

Tabelle 78. Zusammensetzung des RQ1-Puffers.

10x RQ1-Puffer	Komponenten
400 mM	Tris pH 8
100 mM	MgSO ₄
10 mM	CaCl ₂

2.3.33.4 Co-Immunopräzipitation

Um die RNA, welche an exosomalen Komplexe gebunden wurde, zu isolieren, wurde eine Co-Immunopräzipitation vollzogen. Dazu wurden pro behandelte Probe von 4,5 ml Zelllysat 100 µl Rrp41-, Rrp4- oder trx-Antikörper, gekoppelt an Protein-A-Sepharose, zugesetzt und für 2 Stunden bei 4°C auf dem *tumbler* inkubiert. Die *beads* wurden im Anschluss für 15 min bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die *beads* in RNase freie 1,5 ml Eppendorftubes transferiert. Danach wurden die *beads* 10 Mal mit je 1 ml eiskaltem TMNG Puffer (1 M NaCl) gewaschen. Zentrifugationsbedingungen waren dabei 500 g über 3 min und 4°C. Nach dem 7. Waschschrift wurden die *beads* in frische RNase freie 1,5 ml Eppendorftubes überführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die *beads* zwei weitere Male mit je 1 ml kaltem PNK Puffer gewaschen, um sie für das folgende *On-bead*-PNK-Behandlung zu äquilibrieren.

Tabelle 79. Zusammensetzung des Waschpuffers.

Waschpuffer	Komponenten
10 mM	Tris pH 7.5
1 M	NaCl
5 mM	MgCl ₂
10%	Glycerol
0,1%	Nonidet P40
1 mM	PMSF

2.3.33.5 On-bead PNK-treatment

Nachdem die *beads* zwei Mal mit kaltem PNK-Puffer gewaschen wurden, wurde der Überstand verworfen und 50 µl PNK-Mix jeder Probe zugesetzt. Die Proben wurden für 20 min bei 37°C inkubiert, um gebundene RNA radioaktiv zu markieren. Im Anschluss wurden die Proben zwei weitere Male mit kaltem PNK-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. An dieser Stelle ist eine Unterbrechung des Protokolls möglich, indem die *beads* bei -20°C weggefroren werden.

Tabelle 80. Zusammensetzung des PNK-Puffers.

PNK-Puffer	Komponenten
70 mM	Tris pH 7.5
10 mM	MgCl ₂
0,05%	Nonidet P40

Tabelle 81. Reaktionsansatz des radioaktiven Markierung mittels PNK.

1x PNK-Mix	Komponenten
5 µl	10 x PNK-buffer (Hersteller)
3 µl	P ³² ATP (SCP 801)
1,25 µl	T4 PNK Kinase
0,5 µl	RNase OUT
ad 50 µl	ddH ₂ O

2.3.33.6 NU-PAGE und Nitrozellulose-Übertragung

Die *beads* wurden mit 20 µl 2x SDS reduzierenden Ladepuffer gemischt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Im Anschluss wurden die *beads* für 3 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert, um RNA gebundene Proteinkomplexe von den *beads* zu trennen: Der Überstand, welcher die RNA-gebundenen Proteinkomplexe enthielt, wurde auf NU-PAGE-Gele aufgetragen, die Auftrennung erfolgte über 2 Stunden bei 200 Volt. Darauf folgend wurden die RNA-Proteinkomplexe auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen; 1 Stunde bei 160 Volt. Die Membran wurde auf einen Röntgenfilm exponiert und im späteren Verlauf für einen Western Blot gegen Rrp41 Antikörper genutzt.

2.3.33.7 RNA-Extraktion und Prozessierung bis zur Sequenzierung

Alle folgenden Arbeitsschritte, um die RNA von der Membran für die Sequenzierungsreaktion zu extrahieren und in cDNA revers zu transkribieren, wurden von der AG von Prof. Dr. Albrecht Bindereif übernommen (Dr. Oliver Rossbach, Dr. Christian Preußner).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Poly(A)-Präferenz des Exosoms von *Sulfolobus solfataricus*

Die RNA-bindenden Kappenproteine des Exosoms, Rrp4 sowie Csl4, vermitteln dem Proteinkomplex verschiedene Substratspezifitäten. Insbesondere durch Rrp4 erhält das Exosom dabei eine Präferenz für die Bindung von A-reichen Substraten [123]. Gleichzeitig sind die beiden Proteine Rrp4 und Csl4 bezüglich ihrer Domänen und ihrer dreidimensionalen Struktur sehr ähnlich organisiert [142]. In diesem Teil der Arbeit wurde Rrp4 speziell dahingehend untersucht, in welchen Domänen und Aminosäuren die Präferenz für die Bindung von A-reicher RNA zu finden ist.

3.1.1 Substitution einzelner Aminosäuren der S1-Domäne von Rrp4

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Julian Grützner (Untersuchungen zur Poly(A)-Präferenz des Rrp4-Exosoms von *Sulfolobus solfataricus*, 2015), wurde untersucht, welche Aminosäuren für die Präferenz für die Bindung von A-reicher RNA durch Rrp4 verantwortlich sind [160]. Die Bachelorarbeit wurde von mir betreut und die erhaltenen Ergebnisse dienen mir als Grundlage für nachfolgende Versuche (siehe Kapitel 3.1.2). Dadurch sind in diesem Kapitel die Ergebnisse von Julian Grützner kurz erläutert und dargestellt.

Mittels Alignment (siehe Abbildung 15) wurden beginnend zwei Aminosäuren herausgesucht, welche innerhalb der S1-Domäne von Rrp4 konserviert vorliegen, jedoch nicht an korrespondierender Position in Csl4. Die Identifikation der Aminosäuren wurde im Vorfeld der Bachelorarbeit durch Linlin Hou vorgenommen: Die betreffenden Aminosäuren sind im Bereich der S1-Pore von Rrp4 lokalisiert und für RNA-Substrate gut zugänglich. Dabei handelt es sich um ein Tryptophan in Position 88 (W⁸⁸) von Rrp4 und eine Asparaginsäure in Position 91 (D⁹¹) von Rrp4. Die Position der Aminosäuren bezieht sich dabei auf die Aminosäuresequenz von *Sulfolobus solfataricus* P2; für die Analyse genutzt wurde der T-Coffee Server. Als Grundlage für die Auswahl der Archaea Spezies diente das Alignment von Koonin et al., 2001 [129].

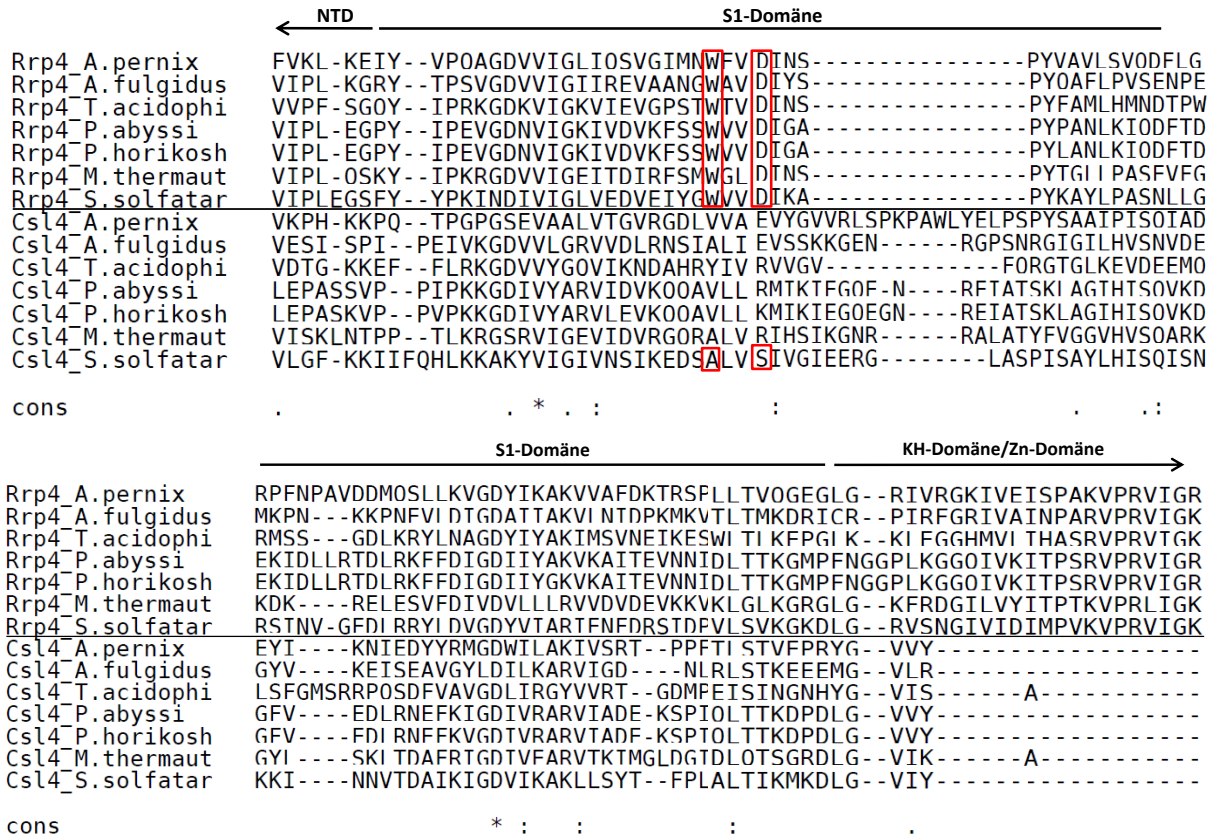


Abbildung 15. Alignment der S1-Domäne von Rrp4 und Csl4 aus ausgewählten Archaea. Mit Pfeilen angedeutet ist der weiterführende Verlauf der S1-Domäne in die nebenliegende NTD sowie KH- bzw. Zn-Domänen. In rot hervorgehoben sind die konservierten Aminosäurereste Tryptophan und Asparaginsäure aus Rrp4. Des Weiteren sind in Csl4 aus *Sulfolobus solfataricus* die entsprechend korrespondierende Aminosäuren in rot hervorgehoben, durch welche eine Substitution in Rrp4 erfolgte. Abkürzungen: A. pernix, *Aeropyrum pernix*; A. fulgidus, *Archaeoglobus fulgidus*; T. acidophi, *Thermoplasma acidophilum*; P. abysssi, *Pyrococcus abyssi*; P. horikosh, *Pyrococcus horikoshii*; M. thermoaut, *Methanobacterium thermoautotrophicum*; S. solfatar, *Sulfolobus solfataricus*. Für das Alignment wurden Archaea Stämme genutzt, welche 2001 von Koonin et al., in dessen Alignment (Figure 1) verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des T-Coffee Server [129]. NTD, N-terminalle Domäne; KH, KH-Domäne; Zn, Zn-Domäne.

Sowohl Tryptophan als auch Asparaginsäure sind nicht speziell als RNA-bindenden Aminosäuren bekannt, liegen jedoch in einem konservierten Aminosäurebereich ($W^{88}VVDI^{92}$) von Rrp4, und könnten somit potentielle Interaktionsstellen für eine RNA darstellen (siehe Kapitel 4.1 Diskussion). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden W^{88} und D^{91} in Rrp4 durch die korrespondierenden Aminosäuren in entsprechender Position von Csl4 (Alanin für Position 88 (A^{88}) und Serin für Position 91 (S^{91})) ausgetauscht. Die so entstandenen Proteine wurden mit Rrp4_{W88A} bzw. Rrp4_{D91S} bezeichnet.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Julian Grützner [160] wurden die beiden Proteine Rrp4_{W88A} und Rrp4_{D91S} zunächst artifiziell in *E. coli* überexprimiert und im Anschluss auf ihre Interaktion mit dem hexameren Ring getestet. Mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass beide

Proteine, Rrp4_{W88A} bzw. Rrp4_{D91S}, in der Lage sind an den hexameren Ring zu binden. Darauf folgend wurden die Proteine bezüglich Ihrer Aktivität getestet. Mittels Degradationsassays konnte gezeigt werden, dass beide Exosom-Varianten (mit Rrp4_{W88A} bzw. Rrp4_{D91S}) eine ähnliche Aktivität wie das Wildtyp-Rrp4-Exosom aufweisen.

In anschließenden Kompetitionsassays wurde auf die Poly(A)-Präferenz der beiden mutierten Rrp4-Varianten hin getestet. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl das Wildtyp-Rrp4-Exosom, als auch die beiden Exosome mit den jeweiligen Rrp4-Varianten, weiterhin eine Poly(A)-Präferenz aufweisen [160].

3.1.2 Substitution der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4

Da ein Verlust der Poly(A)-Präferenz von Rrp4, nach der Substitution des Tryptophans durch Alanin und der Asparaginsäure durch Serin, nicht gegeben war (siehe Kapitel 3.1.1), wurde im Verlauf der weiteren Arbeit zunächst untersucht, ob sich die Poly(A)-Präferenz sicher der S1-Domäne von Rrp4 zuordnen lässt. Dafür wurde im Folgenden die gesamte S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4 substituiert.

3.1.2.1 Festlegung des Substitutionsbereiches der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4

Eine Substitution der S1-Domäne (hinsichtlich der Position der Aminosäuren) zwischen den beiden Proteinen erfolgte dabei grundlegend nach den Angaben der Publikationen von Büttner et al., 2005 [142], in welcher die S1-Domäne von Csl4 von Position 60 bis 144 beschrieben wird, und der Dissertation von Witharana, 2013 [145], in welcher die S1-Domäne von Rrp4 von Position 67 bis 146 beschrieben wird (Abbildung 16). Büttner et al. beschreibt die S1-Domäne von Rrp4 von Position von Aminosäure 72 bis 140 [142]. Die Nutzung zweier Quellen für die Definition der S1-Domäne von Rrp4 und Csl4 lässt sich dahingehend begründen, dass die Untersuchungen der Poly(A)-Präferenz von Witharana et al., publiziert worden und Witharana et al. die KH-Domäne von Rrp4 entsprechend Ihrer Angaben deletierte [132], jedoch Angaben bezüglich der S1-Domäne von Csl4 nur von Büttner et al., 2005 [142], zu erhalten waren.

Die Namen der beiden Hybridproteine wurden folgend benannt: (i) Rrp4, dessen S1-Domäne durch die S1-Domäne von Csl4 ersetzt wurde, wird als Rrp4S1Csl4 und (ii) Csl4, dessen S1-Domäne durch die S1-Domäne von Rrp4 ersetzt wurde, wird als Csl4S1Rrp4 bezeichnet.



Abbildung 16. Darstellung des Substitutionsbereiches der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4. Angabe über die Position der Aminosäuren in Zahlen über der jeweiligen S1-Domäne. NTD, N-terminale Domäne; S1, S1-Domäne; Zn, Zn-Domäne; KH, KH-Domäne.

3.1.2.2 Keine Interaktion von Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 mit dem hexameren Ring

Um eine Interaktion der beiden Hybridproteine mit dem hexameren Ring über *in vitro* Co-Immunopräzipitation zu testen, wurden zunächst beide Proteinvarianten in *E. coli* Arctic express rekombinant überexprimiert (Abbildung 17). Für Expressionsbedingungen siehe Kapitel 2.3.21.

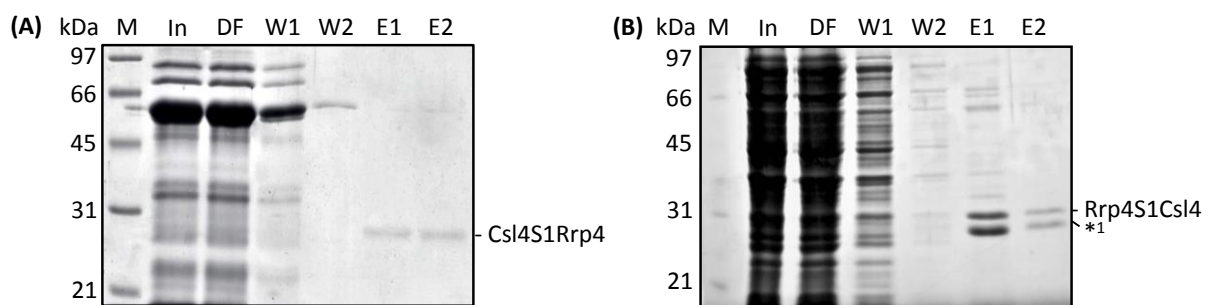


Abbildung 17. Reinigung der His₆-tag Proteine durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. (A) 12% SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung mit Fraktionen der Csl4S1Rrp4-Aufreinigung. **(B)** 12% SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung mit Fraktionen der Rrp4S1Csl4-Aufreinigung. In, Input; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E1, E2, Elutionsfraktion 1 und 2; M, *low range* Proteinmarker. Mit *¹ gekennzeichnet ist das wahrscheinliche Degradationsprodukt von Rrp4S1Csl4.

Die SDS-PAA-Gele in Abbildung 17 zeigen die Ergebnisse der Isolierung von Csl4S1Rrp4 (17 A) und Rrp4S1Csl4 (17 B) unter nativen Bedingungen. Für beide Hybridproteine zeigen die Spuren der ersten Waschfraktion noch viel unspezifisches Protein, wohingegen die Spuren der zweiten Waschfraktion deutlich sauberer sind. Vor allem in dem Bereich des theoretisch erwarteten Molekulargewichtes, von Csl4S1Rrp4 bei 24 kDa und Rrp4S1Csl4 bei 30 kDa, sind die Spuren klar. Beide Proteine sind in den Elutionsfraktionen E1 und E2 zu sehen, wobei bei Rrp4S1Csl4 unter der erwarteten theoretischen Höhe von 30 kDa noch eine weitere Bande bei ca. 26 kDa ersichtlich ist. Sehr wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Degradationsprodukt von Rrp4S1Csl4. Csl4S1Rrp4 läuft etwas höher als in dem zu erwarteten theoretischen Molekulargewicht von 23 kDa, das apparente

Molekulargewicht beträgt ca. 26 kDa. Von Membranproteinen ist bekannt, dass sie durch ein verändertes Bindungsvermögen von Detergenzien, wie SDS, ein anderes Laufverhalten im Gel zeigen als erwartet [171]. Auch bei den hier vorliegenden Hybridproteinen wäre es möglich, dass die Hybridvarianten von Rrp4 und Csl4 ein verändertes Verhalten in der Bindung von SDS aufweisen und somit anders als zu erwarten im Gel migrieren. Zudem konnte in der Diplomarbeit von Walter gezeigt werden, dass auch die Proteine Rrp41 und Rrp42 des hexameren Ringes, höher als erwartet im SDS-Gel laufen [172]. Theoretische Molekulargewichte wurden unter Einbeziehung des His₆-tags berechnet.

Im Anschluss erfolgte jeweils die *in vitro* Co-Immunopräzipitation zwischen Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 mit dem hexameren Ring. Der verwendete Antikörper war gegen die Rrp41 Untereinheit des hexameren Ringes gerichtet. His₆-getaggte Proteine wurden verwendet. Die Hybridproteine wurden jeweils in gleichen Mengenverhältnissen mit dem hexameren Ring inkubiert und für 10 min bei 70°C hitzebehandelt. Es zeigte sich, dass eine Interaktion der beiden Hybridproteine mit dem Hexamer nicht mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation nachweisbar war (Abbildung 18). In den Elutionsfraktionen für Rrp4S1Csl4 (links) und Csl4S1Rrp4 (rechts) lassen sich nur die Untereinheiten Rrp41 und Rrp42 des hexameren Ringes mittels Silberfärbung nachweisen. Sowohl Rrp4S1Csl4 als auch Csl4S1Rrp4 sind nur in den Fraktionen für Input und Durchfluss detektierbar.

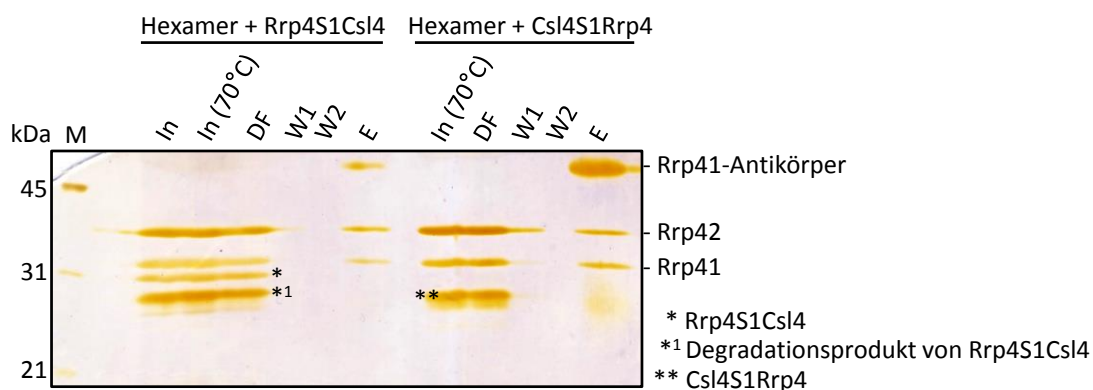
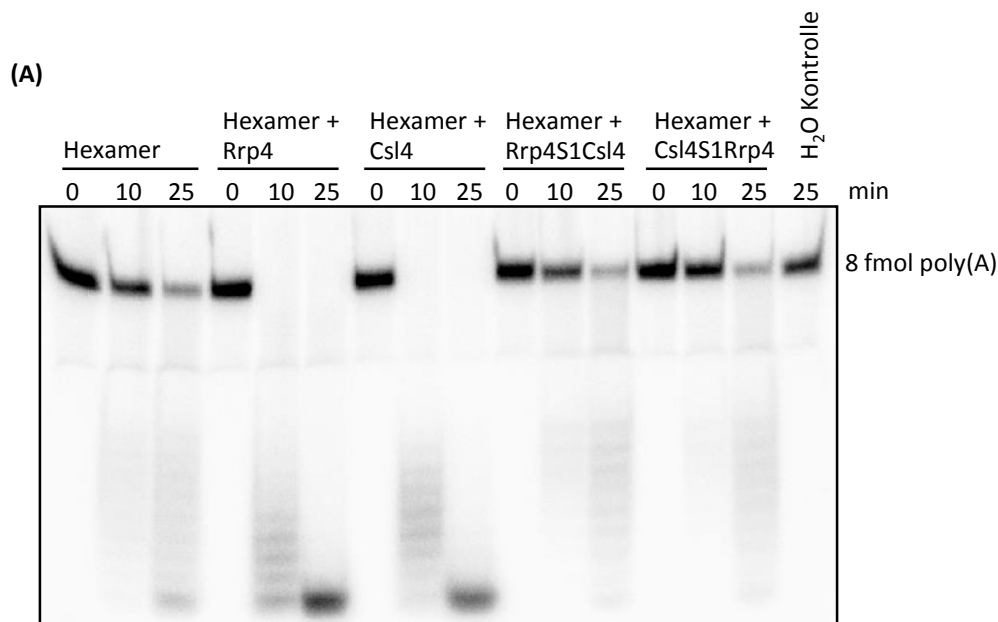


Abbildung 18. Untersuchung der Interaktion zwischen Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 mit dem hexameren Ring. 12% SDS-PAA-Gel nach Silberfärbung. Die Interaktion zwischen Rrp4S1Csl4 mit dem hexameren Ring (links) und die Interaktion zwischen Csl4S1Rrp4 mit dem hexameren Ring (rechts) wurde mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation mit Rrp41-Antikörpern getestet. In, Input; In (70 °C), Input nach Hitzebehandlung bei 70°C; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, *low range* Proteinmarker. Mit *¹ gekennzeichnet ist das wahrscheinliche Degradationsprodukt von Rrp4S1Csl4.

3.1.2.3 Untersuchung der Aktivität des hexameren Ringes in Gegenwart von Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4

Im Fall dessen, dass eine Interaktion der Hybridproteine mit dem Hexamer nicht stark genug ist um mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation verifiziert werden zu können und Interaktionen nur transient sind, wurden beide Proteine zusätzlich auf Aktivität mittels Degradationsassay und auf Poly(A)-Präferenz mittels Kompetitionsassay getestet.

Mittels Aktivitätstests wurde zunächst die Aktivität des hexameren Ringes in Gegenwart von Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 getestet. Als Kontrolle dienten der hexamere Ring allein, sowie der hexamere Ring mit Csl4 und der hexamere Ring mit Rrp4. Nach 10 min zeigt sich eine vollständige Degradation des Ausgangssubstrates von 8 fmol Poly(A)-RNA beim Hexamer mit den Wildtyp-Proteinen Rrp4 bzw. Csl4, wohingegen sowohl bei dem Hexamer, als auch bei dem Hexamer mit beiden Hybridproteinen Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 noch über 70% des Ausgangssubstrates vorhanden ist. Auch nach 25 min Inkubationszeit der Proteinkomplexe bei 60°C ist das Ausgangssubstrat noch nicht vollständig in den Proben des hexameren Ringes, dem hexameren Ring mit Rrp4S1Csl4 und dem hexameren Ring mit Csl4S1Rrp4 degradiert. Es gibt zudem keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem hexameren Ring, dem hexameren Ring mit Rrp4S1Csl4 und dem hexameren Ring mit Csl4S1Rrp4 (Abbildung 19).



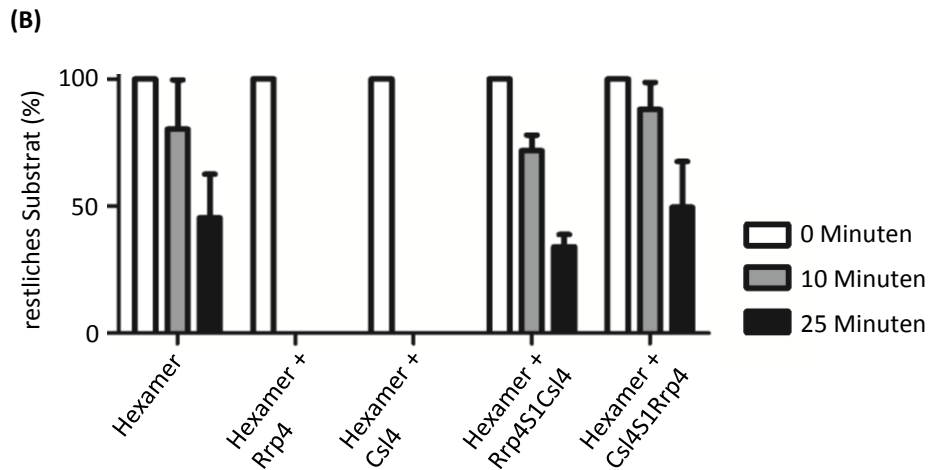


Abbildung 19. Untersuchung der Aktivität des hexameren Ringes durch Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4. (A) Abbildung eines 16%-igen Harnstoff-PAA-Gels mit repräsentativen RNA-Degradationsassay (Phosphoimager Scan). Als Substrat diente 8 fmol radioaktiv markierte Poly(A)-RNA pro Einzelreaktion. Inkubationszeiten (bei 60°C) in min sind bei den entsprechenden Proteinkomplexen angegeben. Pro Reaktion wurde 0,03 pmol Proteinkomplex/ μ l eingesetzt. **(B)** Graphische Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Wiederholungen des RNA-Degradationsassays.

Zusätzlich wurden Wettbewerbsassays durchgeführt. Als Substrat diente 8 fmol radioaktiv markierte Poly(A)-RNA in Konkurrenz zu 100 pmol tRNA. Nach 10 min zeigt sich eine höhere Degradation der Poly(A)-RNA beim Hexamer mit Rrp4 sowie dem Hexamer mit Csl4 im Vergleich zu den restlichen Proben. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Degradation der Poly(A)-RNA zeigt sich nach 25 min nur in der Probe des hexameren Ringes mit Rrp4. Alle anderen Proben (Hexamer, Hexamer mit Csl4, Hexamer mit Csl4S1Rrp4 und Hexamer mit Rrp4S1Csl4) zeigen keine klaren Unterschiede zueinander (Abbildung 20). Eine Poly(A)-Präferenz ist somit nur in der Probe des hexameren Ringes mit Rrp4 zu erkennen.

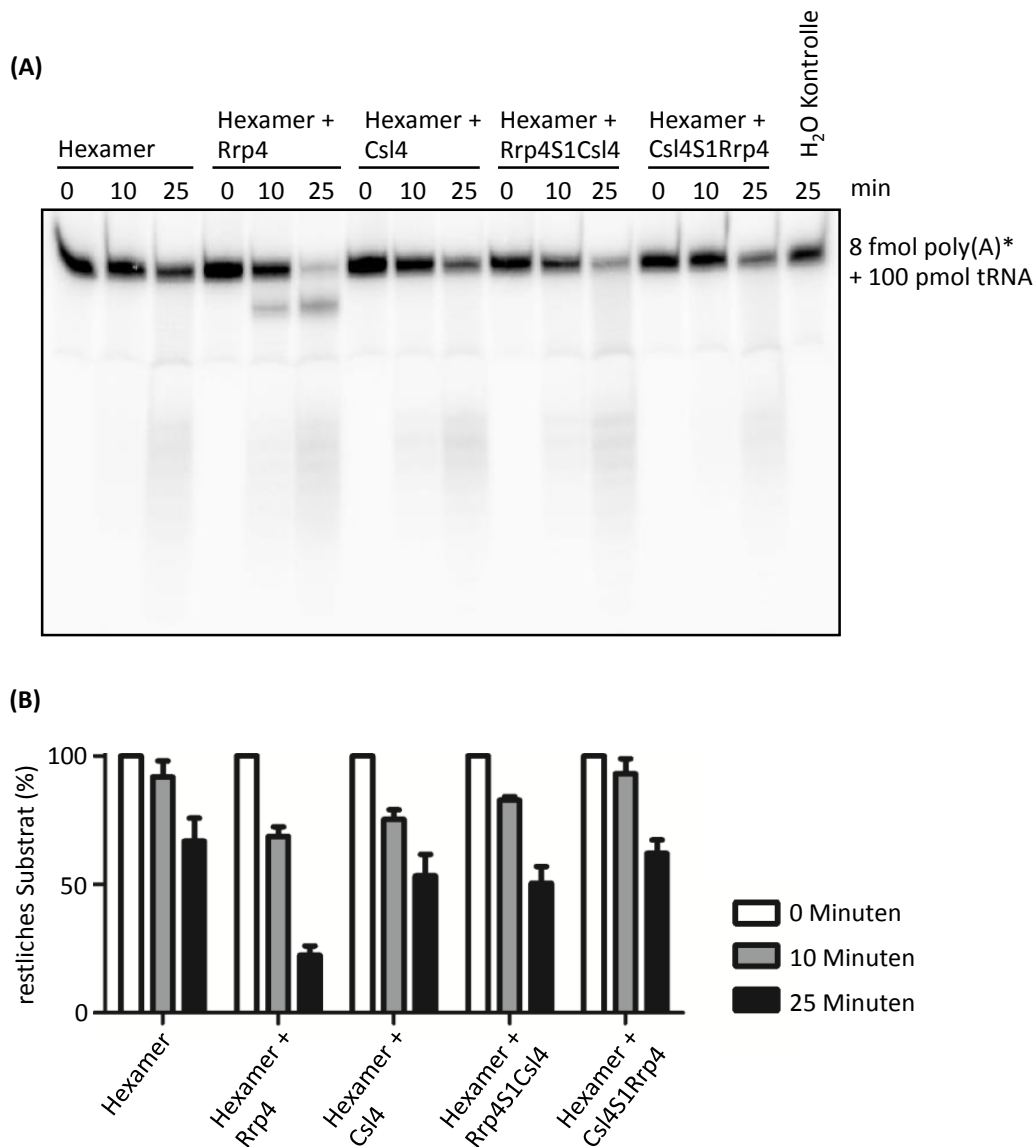


Abbildung 20. Untersuchung der Poly(A)-Präferenz durch Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4. **(A)** Abbildung eines 16%-igen Harnstoff-PAA-Gels mit repräsentativen RNA-Kompetitionsassay (Phosphoimager Scan). Als Substrat diente 8 fmol radioaktiv markierte Poly(A)-RNA und 100 pmol nicht markierter tRNA pro Einzelreaktion. Inkubationszeiten (bei 60°C) in min sind bei den entsprechenden Proteinkomplexen angegeben. Pro Reaktion wurde 0,03 pmol Proteinkomplex/ μ l eingesetzt. **(B)** Graphische Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Wiederholungen des RNA-Kompetitionsassays.

3.2 Nop5 interagiert mit dem archaealen Rrp4-Exosom

Nop5, bekannt als Bestandteil des archaealen box C/D snoRNPs, wurde als potentieller Interaktionspartner des Exosoms beschrieben ([148], L. Hou (siehe Einleitung 1.2.3.1)). In dem hier vorliegenden Kapitel der Dissertation werden Experimente und Ergebnisse bezüglich Nop5 als Interaktionspartner des Rrp4-Exosoms hinsichtlich seiner beteiligten Domänen, sowie seiner Funktion im Kontext zum Rrp4-Exosom, beschrieben.

3.2.1 Die Interaktion von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom ist spezifisch und wird nicht durch His₆-tags des hexameren Ringes vermittelt

Um zu verifizieren, dass eine Interaktion von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom nicht auf den His₆-tags des hexameren Ringes beruht, wurde die, von L. Hou durchgeführte, *in vitro* Co-Immunopräzipitation ([158], Ergebnis von L. Hou; siehe Einleitung 1.2.3.1) mit einem hexameren Ring ohne His₆-tags wiederholt. Da bereits von Hou gezeigt werden konnte, dass keine Interaktion von Nop5 mit dem Csl4-Exosom, dem hexameren Ring sowie den Rrp41-Antikörpern (Kontrollreaktion) nachweisbar ist ([158], Ergebnis von L. Hou), wurde sich im Folgenden auf das Rrp4-Exosom allein fokussiert. In Abbildung 21 ist das Ergebnis der *in vitro* Co-Immunopräzipitation, unter Verwendung von Rrp41-Antikörpern, dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass auch mit einem His₆-tag-losen Hexamer und Rrp4 eine Interaktion von Nop5 nachgewiesen werden kann. Allerdings migrieren, aufgrund des fehlenden His₆-tags von Rrp41, Rrp41 und Rrp4-His₆ auf dergleichen Höhe im SDS-PAA-Gel. Nop5 zeigt sich als dunklere Bande direkt unterhalb der stärkeren Bande der schweren Kette des verwendeten Rrp41-Antikörpers (siehe Abbildung 21).

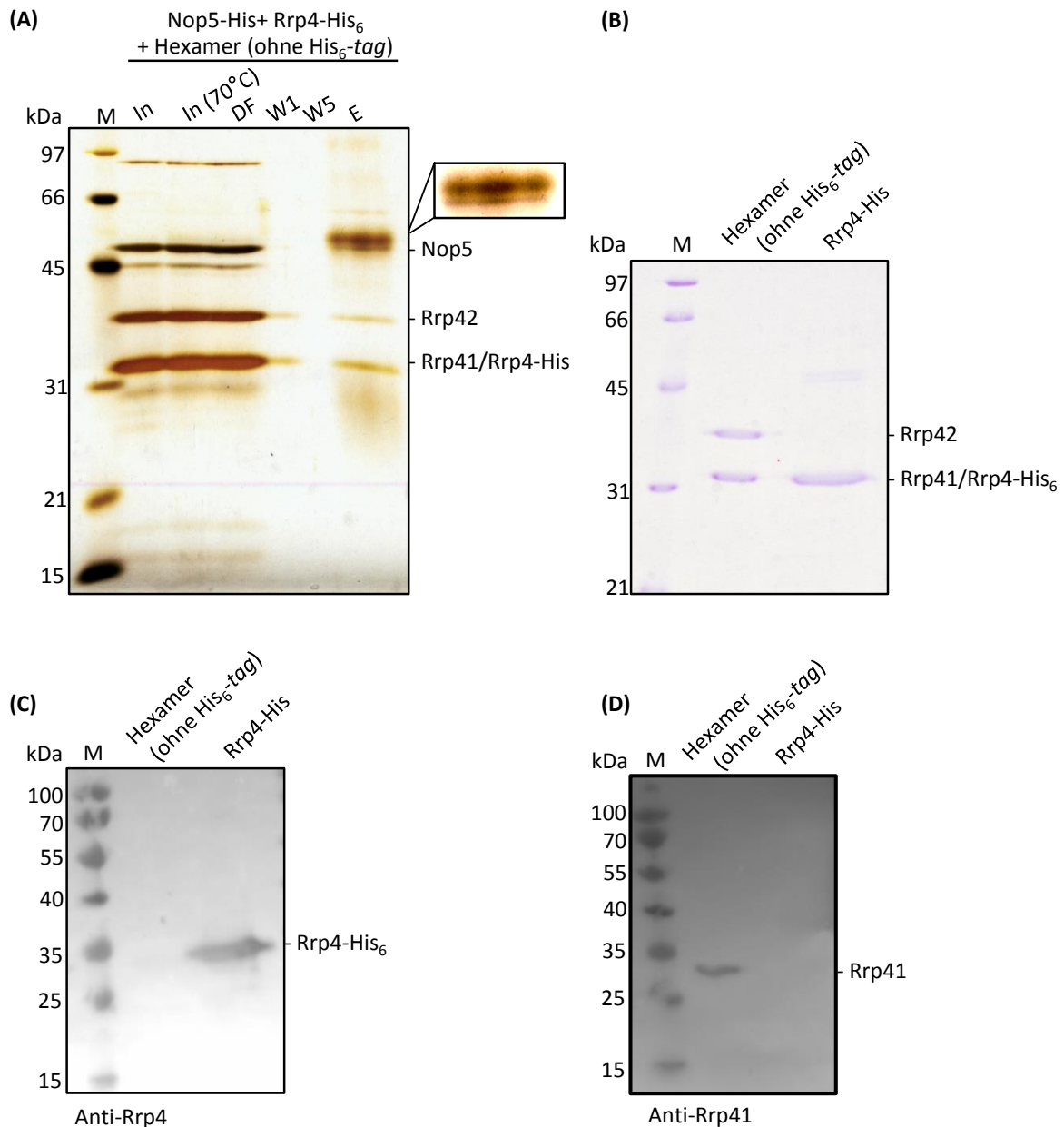


Abbildung 21. Interaktion von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom ohne His₆-tags des hexameren Ringes. **(A)** Das 12%-ige SDS-PAA-Gel nach Silberfärbung zeigt die Interaktion zwischen Nop5 und dem Rrp4-Exosom, ohne His₆-tags des hexameren Ringes. Rrp4-His₆ sowie Rrp41 laufen auf der gleichen Höhe im Gel und migrieren als eine Bande in der Elutionsfraktion. Nop5 ist als dunkle Bande unterhalb der schweren Kette des Antikörpers ersichtlich. Für die *in vitro* Co-Immunopräzipitation wurden Rrp41-Antikörpern verwendet. In, Input; In (70 °C), Input nach Hitzebehandlung bei 70°C; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, *low range* Proteinmarker. **(B)** 12% SDS PAA-Gel nach Coomassiefärbung. Gezeigt ist der hexamere Ring ohne His₆-tags sowie das Rrp4-His *getaggte* Protein welche für die *in vitro* Co-Immunopräzipitation in (A) verwendet wurden. M, *low range* Proteinmarker. **(C)** und **(D)** zeigen Western Blots mit gleichen Mengen des hexameren Rings und Rrp4-His₆ wie sie in (B) eingesetzt wurden. M, *prestained* Proteinmarker. Für (C) wurde gegen Rrp4 gerichteter Antikörper, in (D) gegen Rrp41 gerichteter Antikörper verwendet.

Dass es sich bei der Bande in Höhe von 31 kDa um Rrp41 und Rrp4-His₆ handelt, ist in Abbildung 21 B - D dargestellt. In Abbildung 21 B sind die, für die *in vitro* Co-Immunopräzipitation verwendeten Einzelproteine (der hexamere Ring ohne His₆-tags, sowie Rrp4-His₆) im SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung dargestellt. Die genutzten Proteine bzw. Proteinkomplexe stammten dabei aus den gleichen Aufreinigungsfractionen wie die verwendeten Proteine für die *in vitro* Co-Immunopräzipitation. Gleiche Proteinmengen wurden auch in zwei weiteren SDS-PAA-Gelen verwendet, um mittels Western-Blot zu zeigen, dass Rrp4-His₆ und Rrp41 auf der gleichen Höhe im Gel migrieren. In Abbildung 21 C zeigt den Nachweis von Rrp4-His₆ mittels Rrp4-Antikörper in der äußerst linken Spur, wohingegen Abbildung 21 D den Nachweis von Rrp41 mittels Rrp41-Antikörpern nur in der Spur des hexameren Ringes zu detektieren ist. Beide Proteine, Rrp41 und Rrp4-His₆, zeigen in Abbildung 21 C bis D eine identische Migrationshöhe, wie bereits zuvor in der *in vitro* Co-Immunopräzipitation aus Abbildung 21 A.

3.2.2 Nop5 interagiert sehr wahrscheinlich über seine Coiled-Coil Domäne mit Rrp4

Im Folgenden sollte untersucht werden, über welche Domäne Nop5 mit Rrp4 interagiert. Nop5 besteht aus drei Domänen, einer N-terminalen Domäne (NTD), einer Coiled-Coil Domäne (CC) sowie einer C-terminalen Domäne (CTD). Jede der Einzeldomänen sowie das Protein vollständiger Länge Nop5 (bezeichnet als *Full length* Nop5 = FL) wurde bezüglich einer Interaktion mit Rrp4 über das *Bacterial Two Hybrid System Assay* untersucht. In Abbildung 22 sind die Aminosäuren angegeben, welche Beginn- und Endposition der Einzeldomänen von Nop5 bezeichnen. Sowohl für die CC-Domäne (Aminosäure 135-262) als auch für die CTD (263-412) wurde die Position der Aminosäuren entsprechend der Veröffentlichung von Omer et al., 2006 gewählt [173], die für die NTD dagegen nach der Masterarbeit von [148]. Die Wahl bezüglich der NTD begründet sich anhand des zugrunde liegenden Alignments von Lassek zwischen der CTD von DnaG und NTD von Nop5 [148]. Beide Domänen sind hinsichtlich ihrer Aminosäuren zu 24% ähnlich. Somit war zu vermuten, dass über die CTD, und nicht über die NTD, Domäne von Nop5 eine Interaktion mit Rrp4 stattfindet, korrespondierend zur CTD von DnaG, über welche DnaG mit Csl4 interagiert.

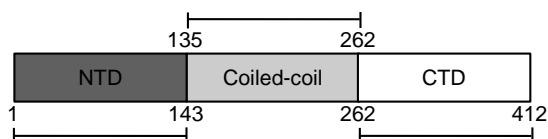


Abbildung 22. Schematische Darstellung der drei Domänen von Nop5. Positionen der Aminosäuren sind über den Domänen angegeben. NTD, N-terminale Domäne; CTD, C-terminale Domäne.

In Abbildung 23 ist das Ergebnis des *Bacterial Two Hybrid System Assays* dargestellt. Ein positives Ergebnis für eine Interaktion von Proteinen bzw. Proteindomänen äußert sich über eine blaue Koloniefärbung, welche eine gleiche Intensität aufweist wie die Positivkontrolle, hervorgerufen durch eine aktive Adenylatcyclase. Für Einzelheiten der Funktionsweise des Assays siehe Material und Methoden 2.3.10. Ein positives Ergebnis und somit eine Interaktion konnte für die CC-Domäne von Nop5 mit Rrp4 gezeigt werden. Zwei der acht getesteten Plasmidkombinationen (pKTN25:*rrp4* mit pUT18:CC*nop5* sowie pUT18:*rrp4* mit pKTN25:CC*nop5*) zeigten hier eine Blaufärbung der Kolonie, welche identischer Intensität der Positivkontrolle war. Für die CTD ergab sich in einer Plasmidkombination (pKTN25:*rrp4* mit pUT18:CTD*nop5*) ebenfalls eine Blaufärbung der Kolonie, jedoch weniger stark gefärbt als die Positivkontrolle. Weder für die NTD von Nop5 noch für das FL Nop5 Protein konnte ein positives Ergebnis für eine Interaktion der Domänen der Adenylatcyclase detektiert werden. Somit ist eine Interaktion über die CC-Domäne, eventuell mit Unterstützung der CTD von Nop5, mit Rrp4 sehr wahrscheinlich.

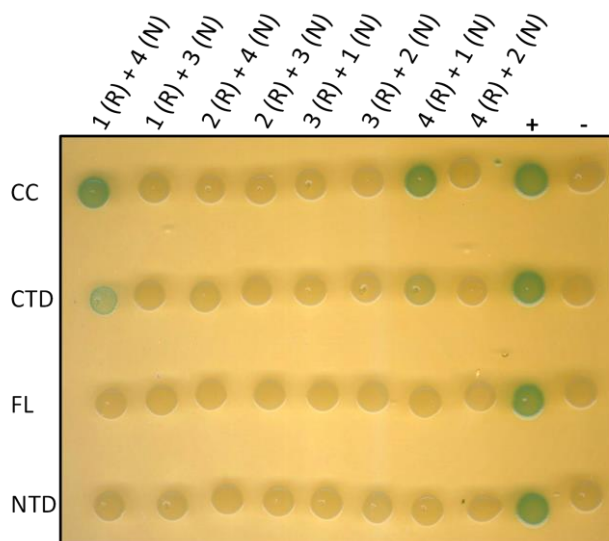


Abbildung 23. Nop5 interagiert sehr wahrscheinlich über seine Coiled-Coil Domäne mit Rrp4. Dargestellt ist das *Bacterial Two Hybrid System Assay* in welchem das vollständige Gen für *rrp4* (R) sowie eine der Varianten des *nop5*-Genes (FL, NTD, CTD, CC) co-transformiert wurden. Eine blaue Koloniefarbe zeigt eine aktive Adenylatcyclase, ausgelöst durch die Interaktion von Rrp4 mit einer Variante von Nop5. Folgende Plasmide wurden für die Klonierung genutzt und sind numerisch in der Beschriftung angegeben: (1) pKTN25, N-terminale Fusion des zu untersuchenden Proteins mit dem T25-Fragment der Adenylatcyclase; (2) pKTN25, C-terminale Fusion des zu untersuchenden Proteins mit dem T25-Fragment der Adenylatcyclase; (3) puT18C, C-terminale Fusion des zu untersuchenden Proteins mit dem T18-Fragment der Adenylatcyclase; (4) pUT18, N-terminale Fusion des zu untersuchenden Proteins mit dem T18-Fragment der Adenylatcyclase. Positiv- und Negativkontrolle sind mit (+) und (-) gekennzeichnet. N, Nop5; R, Rrp4; NTD, N-terminale Domäne; CC, Coiled-Coil Domäne; CTD, C-terminale Domäne; FL, *Full length* Protein.

Da es jedoch ebenso möglich ist, dass falsch negative Ergebnisse erzielt werden, wenn Domänen der Adenylatcyclase in ihrer Interaktion gehindert werden (wenn die zu testenden interagierenden Proteine zu groß sind) oder falsch positive Ergebnisse erzielt werden, wenn die Interaktion über RNA oder andere Proteine des Wirts-Stammes ausgelöst wird, wurden weiterführende Untersuchungen bezüglich der Interaktion von Rrp4 und Nop5 sowie der Einzeldomänen mit dem Rrp4-Exosom durchgeführt.

3.2.3 Untersuchung der Interaktion von Nop5 mit Rrp4 mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation

Um zunächst die direkte Interaktion von Nop5 mit Rrp4 zu verifizieren, wurde eine *in vitro* Co-Immunopräzipitation mittels Rrp4-Antikörpern durchgeführt. In Abbildung 24 ist das Ergebnis der Co-Immunopräzipitation nach Auftrennung im SDS-PAA-Gel und Silberfärbung ersichtlich. Rechts ist das Ergebnis der Interaktion zwischen Rrp4 und Nop5 dargestellt, links die Negativkontrolle, welche die Inkubation von Nop5 mit den Rrp4-Antikörpern zeigt. Es zeigen sich in der Elutionsfraktion der Probe (rechts) zwar Proteinbanden für Rrp4 und Nop5, basierend jedoch auf einer unspezifischen Interaktion von Nop5 mit den Rrp4-Antikörpern selbst. Im linken Teil der Abbildung ist eine dünnere Bande unterhalb der schweren Bande des Rrp4-Antikörpers ersichtlich (hervorgehoben in der Abbildung durch Vergrößerung; durch den Scanvorgang schwer ersichtlich) wobei es sich wahrscheinlich um Nop5 handelt. Somit ist eine sichere und aussagekräftige Untersuchung der direkten Interaktion zwischen Nop5 und Rrp4 mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation nicht möglich.

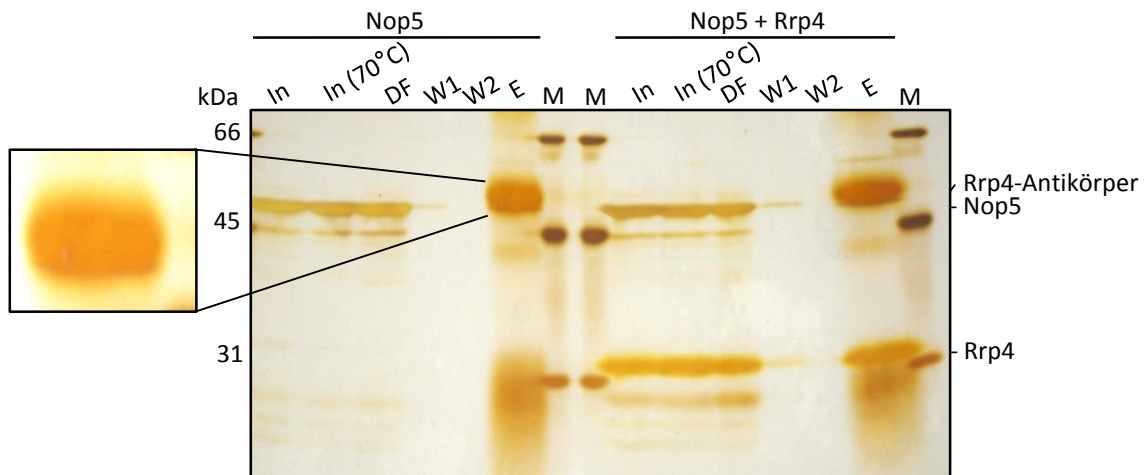


Abbildung 24. *In vitro* Co-Immunopräzipitation von Nop5 und Rrp4 mittels Rrp4-Antikörpern. Das 12%-ige SDS-PAA-Gel nach Silberfärbung zeigt eine Elution von Nop5 mit Rrp4 (rechts). Die Negativ-Kontrolle (Nop5 inkubiert mit den Rrp4-Antikörpern allein) zeigt ebenfalls eine Präzipitation von Nop5 in der Elutionsfraktion, zur Verdeutlichung durch Vergrößerung hervorgehoben (links). In, Input; In (70°C), Input nach Hitzebehandlung bei 70°C; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, *low range* Proteinmarker.

3.2.4 Untersuchung der Interaktion von Nop5 mit Rrp4 über His₆-tag pull down

Als alternativer Weg die Interaktion von Nop5 mit Rrp4 zu testen, wurde ein His₆-tag pull down durchgeführt. Dazu wurde Nop5 ohne His₆-tag rekombinant in *E. coli* überexprimiert und im Anschluss mittels Heparinsäule über ÄKTAexplorer-Chromatographie gereinigt. In Abbildung 25 ist das Ergebnis der Proteinreinigung dargestellt. Nop5 ist als sauberes Einzelprotein im SDS-PAA-Gel in von 102 bis 110 ml zu sehen (Abbildung 25 B). Das Chromatogramm zeigt in den Fraktionen von 94 bis 110 ml einen Doppel-Peak, wobei sich Nop5 in der zweiten Peakspitze im SDS-Gel nachweisen lässt (Abbildung 25 A).

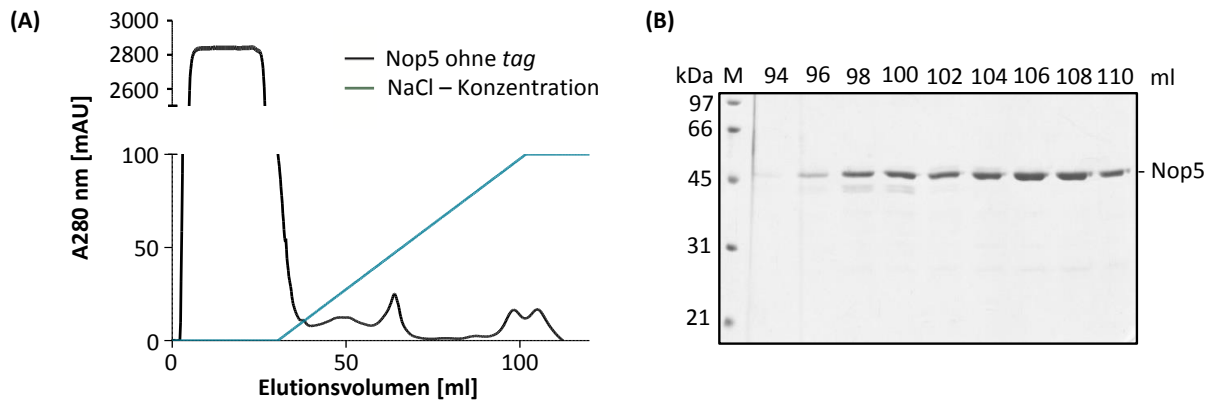


Abbildung 25. Aufreinigung von His₆-tag losem Nop5 mittels Heparinsäule. (A) Elutionsprofil der Proteinreinigung von Nop5 mittels Heparinsäule (ÄKTAexplorer, HiTrap™ Heparin HP 5 ml). Das Absorptionsspektrum (A 280 nm) zeigt die Fraktionen (ml) in welchen Nop5 detektierbar ist. In blau dargestellt ist der NaCl-Gradient steigender Konzentration. (B) 12%-iges SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung. Die Elutionen von (A) sind zu je 20 µl aufgetragen und zeigen Nop5, welches in den Fraktionen 94 - 110 ml zu detektieren ist. M, *low range* Proteinmarker.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation von Nop5 mit Rrp4-His₆, danach wurde der *pull down* mittels Ni²⁺-NTA-Agarose durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde Nop5 ebenfalls über Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt, um potentielle unspezifische Interaktionen von Nop5 mit der Ni²⁺-NTA-Agarose auszuschließen. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis des *pull downs*. Es ist zu sehen, dass nur Rrp4-His₆ in der Elutionsfraktion der Probe (links) aufgetrennt wurde. Eine dünne Bande in Höhe von Nop5 ist begründet durch eine schwache Interaktion von Nop5 mit den Ni²⁺-NTA-Agarose allein, was in der Negativkontrolle (rechts) ersichtlich ist. Somit ist über His₆-tag *pull down* keine Interaktion zwischen Rrp4 und Nop5 nachweisbar.

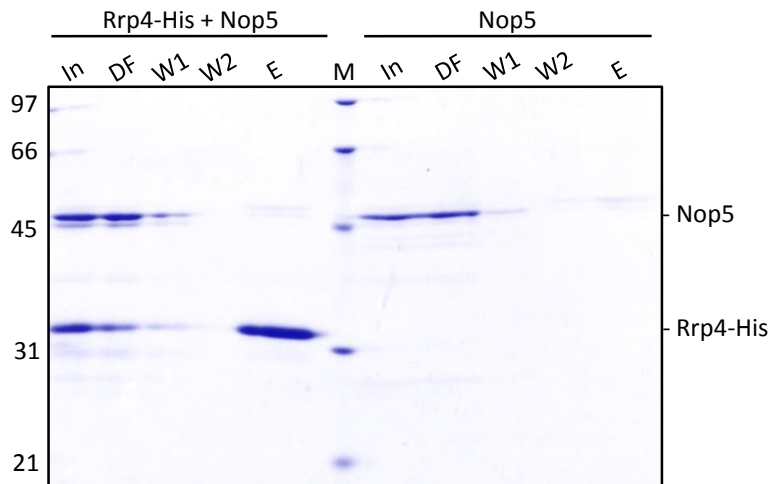


Abbildung 26. Pull down Assay von Nop5 und Rrp4-His₆ mittels Ni²⁺-NTA-Agarose. Das 12% -ige SDS-PAA-Gel, nach Coomassiefärbung, zeigt keine spezifische Elution von Nop5 mit Rrp4-His₆ (links). Die Negativkontrolle (Nop5 inkubiert mit den Ni²⁺-NTA-Agarose allein) zeigt eine schwache Präzipitation von Nop5 in der Elutionsfraktion (rechts). In, Input; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, *low range* Proteinmarker.

3.2.5 Nachweis der Interaktion zwischen Rrp4 und Nop5 mittels Biacore/SPR

Das folgende Experiment fand unter Kooperation mit Dr. Julia Hahn (früher Dzieciolowski) statt, welche die eigentlichen Biacore/SPR (*surface plasmon resonance*) Messungen durchführte. Probenvorbereitungen (Expression der Proteine, Dialyse, Konzentration) wurden von mir vorgenommen.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Interaktion zwischen Nop5 und Rrp4 bietet der Biacore. Nop5 wurde dabei, als Ligand, auf einem Biacore Series S Sensor Chip CM5 immobilisiert. Eine zweite Flusszelle diente als Kontrolle und wurde, ohne Proteine, nur mit den Pufferlösungen, gleichbehandelt. Rrp4 diente im Assay als Analyt und wurde in steigenden Konzentrationen pro Zyklus von 60 s über den Chip geleitet, gefolgt von 120 s Dissoziationszeit durch HBS-EP⁺ Puffer. Mittels Biacore Software wurde die Dissoziationskonstante K_D von Rrp4 und Nop5 berechnet, welche bei $7,2 \cdot 10^{-7}$ M lag (Abbildung 27).

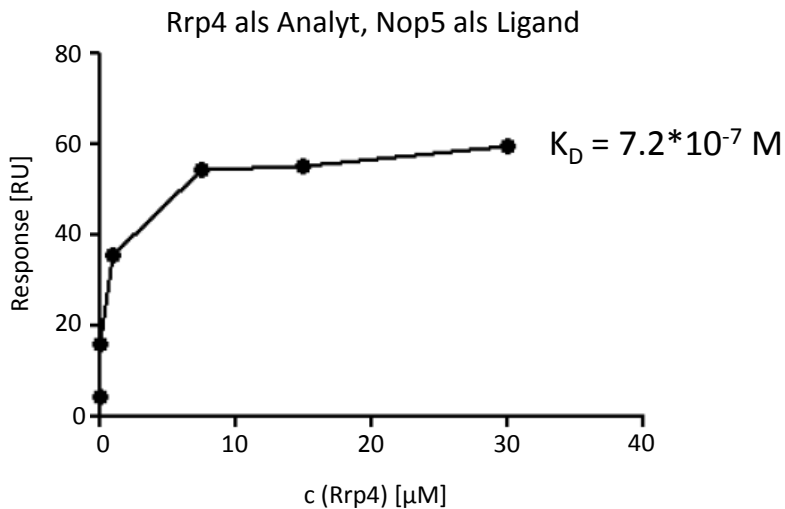


Abbildung 27. Ergebnis des Biacore Assays für die Interaktion zwischen Nop5 und Rrp4. Nop5 wurde als Ligand immobilisiert, Rrp4 wurde als Analyt in steigenden Konzentrationen für die Analyse eingesetzt. Die errechnete Dissoziationskonstante K_D ist in der Abbildung angegeben. Abbildung modifiziert nach der Vorlage von Julia Hahn.

Somit ließ sich mittels Biacore eine gute Bindung zwischen Nop5 und Rrp4 zeigen. Schwache Bindungen liegen im Bereich von $K_D = 10^{-2} \text{ M}$, starke Bindungen im Bereich von $K_D = 10^{-12} \text{ M}$ [174]. Die Dissoziation zwischen den zwei Proteinen war dabei jedoch sehr schnell, sodass die Bindung zwischen Nop5 und Rrp4 direkt mittels Pufferzufuhr über den Biacore Chip, wieder aufgelöst werden konnte.

3.2.6 Untersuchungen der Interaktion von MBP-fusionierten Einzeldomänen von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation

Um die Interaktion der Einzeldomänen von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom zu verifizieren, wurden diese mittels MBP-(*maltose binding protein*)-tag heterolog in *E. coli* überexprimiert und mittels Amylose *beads* gereinigt. Für Expressionsbedingungen siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.21.

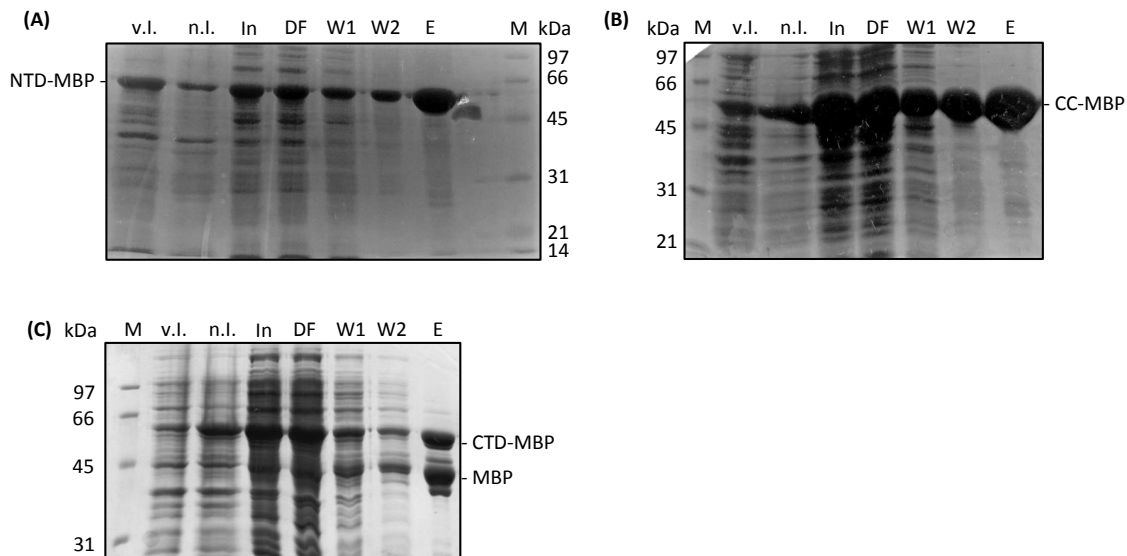


Abbildung 28. Aufreinigung der MBP-getaggten Proteine über Amylose-Agarose. Dargestellt sind 12%-ige SDS-PAA-Gele nach Coomassiefärbung mit Fraktionen der MBP-getaggten Proteine der drei Nop5-Domänen: **(A)** NTD-MBP, **(B)** CC-MBP **(C)** CTD-MBP. In (C) ist neben dem CTD-MBP auch MBP allein im SDS-PAA-Gel nachweisbar, mit einer geringeren Migrationshöhe als CTD-MBP. v.l., vor Induktion; n.l. nach Induktion; In, Input; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, *low range* Proteinmarker.

Die SDS-PAA-Gele in Abbildung 28 zeigen die Ergebnisse der Reinigung der MBP-NTD von Nop5 (28 A), MBP-CC-Domäne von Nop5 (28 B) und MBP-CTD von Nop5 (28 C) unter nativen Bedingungen. Wie in den Waschfraktionen der SDS-PAA-Gele für alle drei Proteine ersichtlich ist, ist sowohl in der ersten als auch in der zweiten Waschfraktion noch MBP-getaggtetes Protein nachweisbar, jedoch zeigt die zweite Waschfraktion im Vergleich zur ersten Waschfraktion weniger Verunreinigungen. In allen Waschfraktionen sind MBP-getaggte Proteine detektierbar, was sich auf eine große induzierte Proteinmenge zurückführen lässt. Im Fall des CTD-MBP ist ein zweites Protein bei ca. 44 kDa in der Elutionsfraktion ersichtlich. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um den MBP-*tag* selbst, als Degradationsprodukt des CTD-MBPs. MBP besitzt ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa [175]. Im Anschluss erfolgte die *in vitro* Co-Immunopräzipitation zwischen den MBP-getaggten Einzeldomänen von Nop5 und dem Rrp4-Exosom mittels Rrp41-Antikörper. His₆-getaggte exosomale Proteine wurden verwendet. Die MBP-getaggten Nop5 Einzeldomänen wurden im gleichen Mengenverhältnis zum Rrp4-Exosom inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente jeweils die MBP-getaggte Einzeldomäne von Nop5, inkubiert mit dem Rrp41-Antikörper, um unspezifische Interaktionen auszuschließen, welche falsch-positive Interaktionsergebnisse zur Folge hätten.

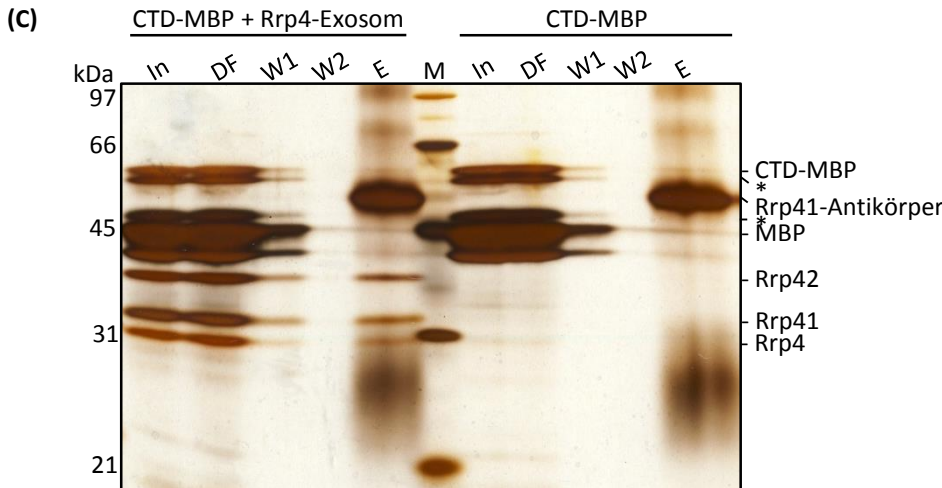
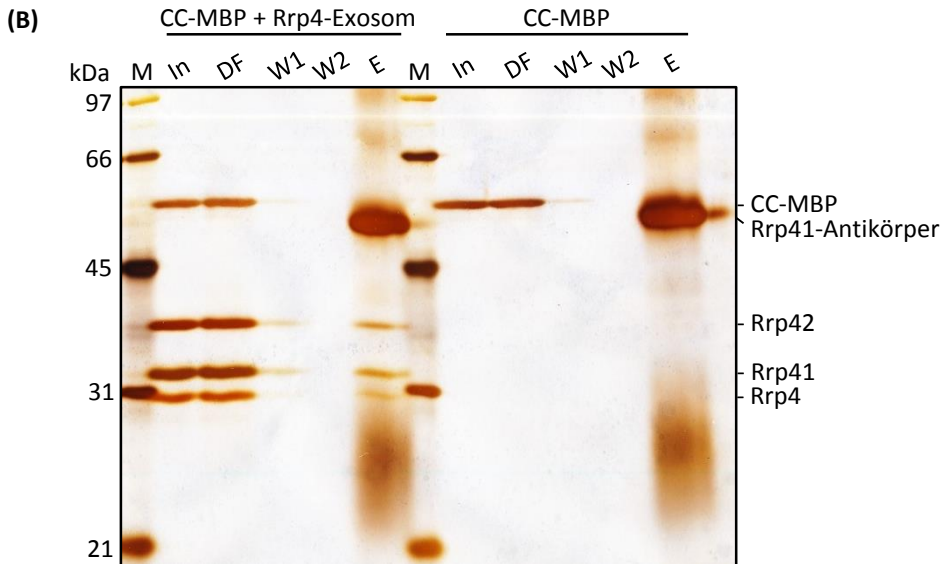
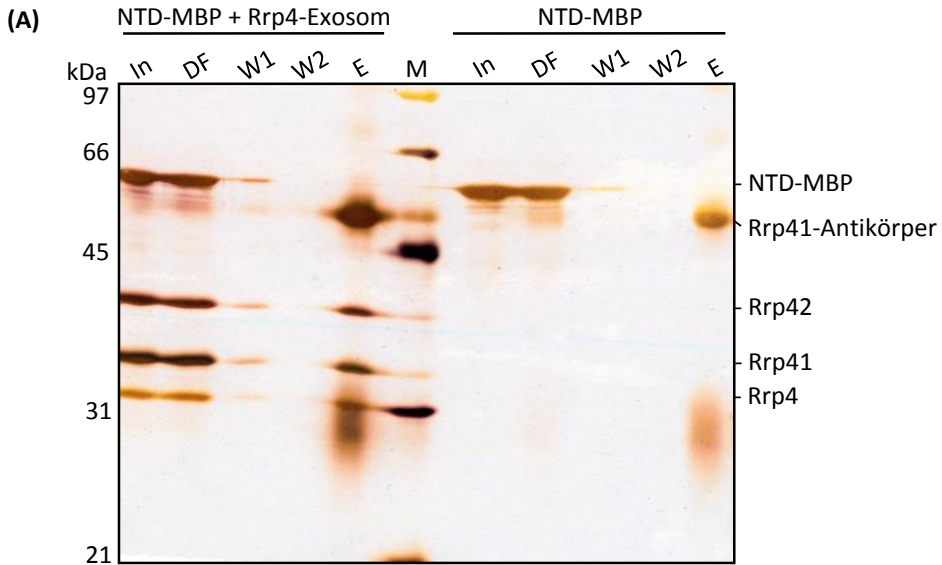


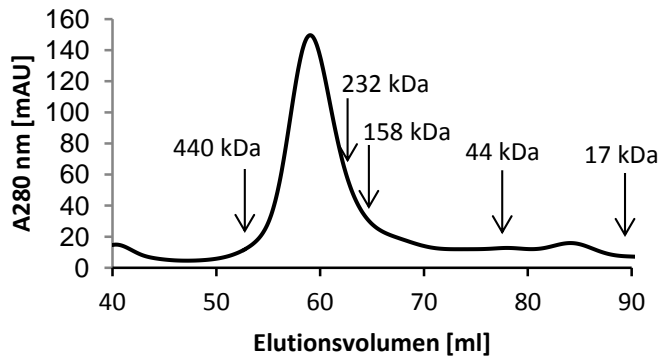
Abbildung 29. *In vitro* Co-Immunopräzipitation der MBP-getaggten Einzeldomänen von Nop5 und dem Rrp4-Exosom. 12%-ige SDS-PAA-Gele nach Silberfärbung zeigen die Ergebnisse der *in vitro* Co-Immunopräzipitation. Verwendeter Antikörper war Rrp41. Jeweils links ist die MBP-getaggte Einzeldomäne von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom dargestellt, rechts die Negativkontrolle (MBP-getaggte Einzeldomäne von Nop5 inkubiert mit den Rrp41-Antikörpern). Bei **(A)**, NTD-MBP, und **(B)**, CC-MBP, ist keine Interaktion mit dem Rrp4-Exosom nachzuweisen. Bei **(C)**, CTD-MBP, zeigt sich eine unspezifische Interaktion mit dem Rrp41-Antikörper. In, Input; DF, Durchfluss; W1, W2, erste und letzte Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; mit * gekennzeichnet sind Degradationsprodukte des CTD-MPBs. M, *low range* Proteinmarker.

In Abbildung 29 A bis C sind die Ergebnisse der *in vitro* Co-Immunopräzipitationen dargestellt. Es zeigte sich, dass eine Interaktion der MBP-getaggten Einzeldomänen von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom, durch *in vitro* Co-Immunopräzipitation, nicht nachweisbar ist. In den Elutionsfraktionen für NTD-MBP (Abbildung 29 A links) und CC-MBP (Abbildung 29 B links) lassen sich nur die Untereinheiten Rrp4, Rrp41 und Rrp42 des Rrp4-Exosoms mittels Silberfärbung nachweisen. Sowohl NTD-MBP als auch CC-MBP sind nur in den Fraktionen für Input, Durchfluss und erster Waschfraktion detektierbar. Für beide Einzeldomänen von Nop5 ist keine unspezifische Interaktion mit dem Rrp41-Antikörper nachweisbar, die Elutionsfraktionen (Abbildung 29 A und 29 B, rechts) zeigen nur Banden in Höhe des Rrp41-Antikörpers. Im Fall des CTD-MPBs ist in der Elutionsfraktion der Probe (Abbildung 29 C, links) in Höhe von ca. 60 kDa das CTD-MBP Protein detektierbar. Jedoch ist auch bei der Negativkontrolle (Abbildung 29 C, rechts) dem Molekulargewicht des CTD-MPBs und dem gleichen Mengenverhältnis der Probe entsprechend, eine Bande des CTD-MBP nachzuweisen. Somit ist im Fall des CTD-MBP eine unspezifische Interaktion mit dem Rrp41-Antikörper vorhanden und es kann von keiner Interaktion mit dem Rrp4-Exosom ausgegangen werden.

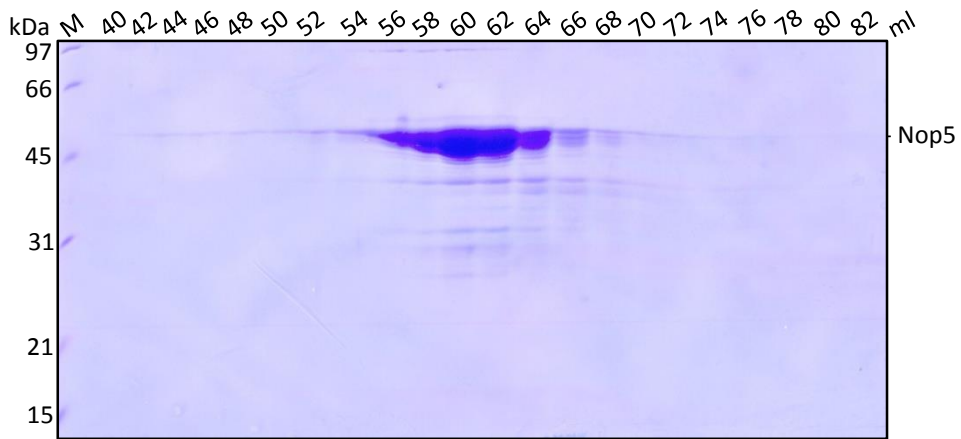
3.2.7 Untersuchungen von Nop5-His₆ mittels Größenausschlusschromatographie

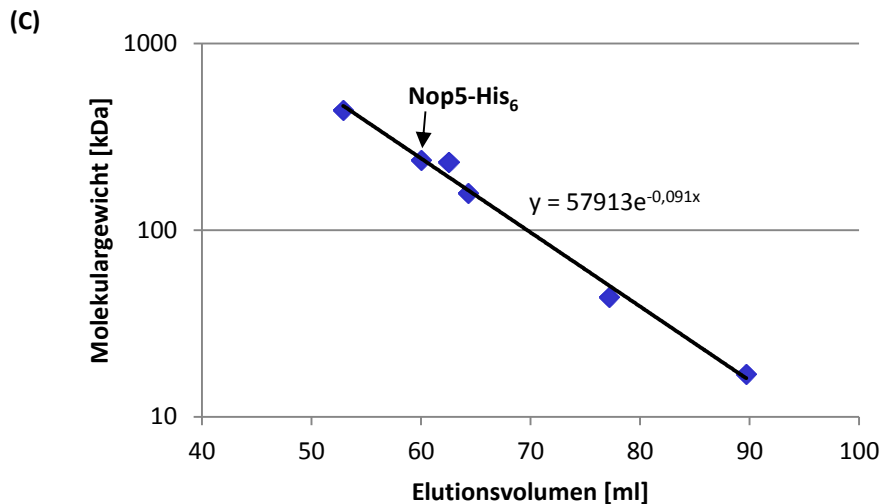
Nop5, beschrieben als Teil der archaealen box C/D snoRNPs in *Sulfolobus solfataricus*, stellt in diesem Proteinkomplex einen Dimer mit *Scaffold*-Funktion dar [150]. Untersucht werden soll in folgendem Kapitel, ob Nop5, als eigenständiges Protein, als Monomer oder Multimer vorliegt. Dieser Fragestellung wurde mittels Größenausschlusschromatographie nachgegangen.

(A)



(B)





Protein	Elutionsvolumen [ml]	Molekulargewicht [kDa]
Ferritin	52,9	440
Catalase	62,5	232
Aldolase	64,3	158
Ovalbumin	77,2	44
Myoglobin	89,7	17
Nop5-His₆	59,98	237,39

Abbildung 30. Größenausschlusschromatographie von Nop5-His₆. (A) Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie von Nop5-His₆ (ÄKTAexplorer, Superdex HiLoad 16/600 200 pg column). Das Absorptionsspektrum (A 280 nm) zeigt die Fraktionen (ml) in welchen Nop5 detektierbar ist. Mit Pfeilen markiert ist die Position über die Angabe der Absorptionsmaxima der Markerproteine (440 kDa Ferritin, 232 kDa Katalase, 158 kDa Aldolase, 44 kDa Ovalbumin, 17 kDa Myoglobin). (B) 12%iges SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung. Die Elutionen von (A) sind aufgetragen und zeigen Nop5, welches in den Fraktionen 56 ml - 66 ml zu finden ist. M, *low range* Proteinmarker. (C) Eichgerade von Nop5 mit Auflistung der Markerproteine in entsprechender Größenangabe. Anhand des Molekulargewichtes der Markerproteine, entsprechend dem Elutionsvolumen, wurde die Geradengleichung errechnet und im Graph neben der Eichgeraden angegeben.

Das Absorptionsmaximum von Nop5-His₆ liegt bei 59,98 ml Elutionsvolumen. Dies entspricht laut der Eichgerade für die Superdex HiLoad 16/600 200 pg column der ÄKTA (Abbildung 30 C) einem Molekulargewicht von 237,39 kDa. Nop5 als Monomer besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 48,5 kDa (berechnet über [176]), weswegen das Elutionsprofil auf einen Pentamer hinweist, das molekulare Gewicht eines Pentamers würde 242,5 kDa betragen. Wahrscheinlicher jedoch ist, dass es sich bei Nop5 um ein tetrameres Protein handelt, welches aufgrund seiner dreidimensionalen

Faltung ein Laufverhalten eines pentameren Proteins aufweist. Für Details siehe Kapitel 4.2.3 der Diskussion.

3.2.8 Nop5 steigert die Polyadenylierung, aber nicht die Degradation von RNA durch das Rrp4-Exosom

Als nächstes wurde der Einfluss von Nop5 auf die Funktion des Rrp4-Exosoms mittels Degradations- und Polyadenylierungsassays analysiert. Die Assays wurden mit dem Rrp4-Exosom durchgeführt, zu welchem Nop5 bzw. der Puffer von Nop5 als Kontrolle zugesetzt wurde. Die Reaktionstemperatur lag bei 60°C, bei welcher das Exosom, jedoch nicht mesophile RNasen von *E. coli* aktiv sind [136]. Inkubationszeiten der einzelnen Assays sind in Minuten den Abbildungen zu entnehmen. Die Proteinkonzentration für jede Einzelreaktion betrug 0.3 pmol in 10 µl Reaktionsansatz. Nach Auftragen und Auftrennen der Einzelreaktionen im Harnstoff-PAA-Gel, wurden die Gele getrocknet und über Nacht auf Phosphoscreens exponiert. Der Prozentsatz des verbliebenen Substrates, nach entsprechender Inkubationszeit mit dem Exosom, wurde mittels Quantity One Software berechnet. Für Details siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.27.

3.2.8.1 Untersuchungen zur Polyadenylierung mittels Poly(A)-RNA als Substrat

Da Poly(A)-RNA als Substrat in unserem Labor etabliert ist, wurde dieses als erstes zu testendes Substrat genutzt, um den Einfluss von Nop5 auf das Rrp4-Exosom zu untersuchen. Zunächst wurden Polyadenylierungsassays durchgeführt, ein repräsentativer Assay ist in Abbildung 31 A zu sehen. In Abbildung 31 B ist die graphische Darstellung des Mittelwertes zweier unabhängiger Versuche, mit Standardabweichungen dargestellt. Für die Polyadenylierungsreaktion wurde ADP dem Reaktionsansatz zugesetzt; Reaktionsansätze wurden in 16%-igen Harnstoff-PAA-Gelen aufgetrennt.

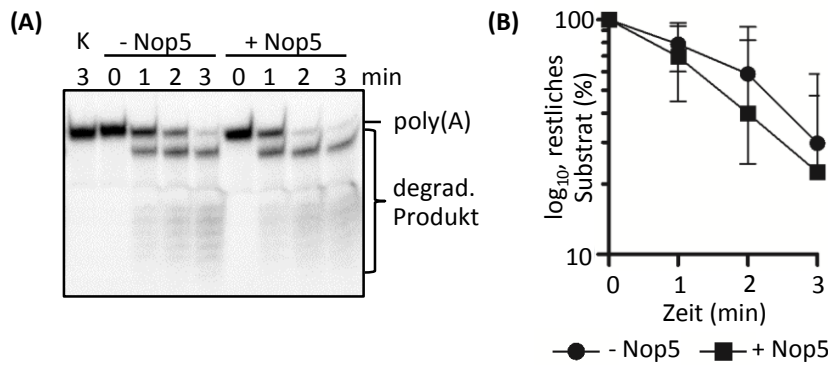


Abbildung 32. Untersuchungen von Nop5 auf die Degradationseffizienz von Poly(A)-RNA durch das Rrp4-Exosom. (A) Abbildung eines 16%-igen Harnstoff-PAA-Gels mit repräsentativen RNA-Degradationsassays. Substrat und Degradationsprodukt sind in der Abbildung hervorgehoben (Phosphoimager Scan). Als Substrat diente 40 pmol Poly(A)-RNA pro Einzelreaktion. Inkubationszeiten (bei 60°C) in min sind bei den entsprechenden Proteinkomplexen angegeben. Pro Reaktion wurde 0,03 pmol Proteinkomplex/μl eingesetzt. (B) Graphische Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Wiederholungen des RNA-Degradationsassays. K, Kontrollreaktionsansatz ohne Protein; - Nop5, Rrp4-Exosom ohne die Zugabe von Nop5; + Nop5, Rrp4-Exosom mit Zugabe von Nop5.

3.2.8.3 Untersuchungen zur Bindung von RNA durch Nop5 mittels Poly(A)-RNA und 16S rRNA als Substrat

Um zu untersuchen ob Nop5 selbst in der Lage ist RNA zu binden, wurden EMSAs (*electromobility shift assays*) durchgeführt. Zwei repräsentative EMSAs sind in Abbildung 33 dargestellt.

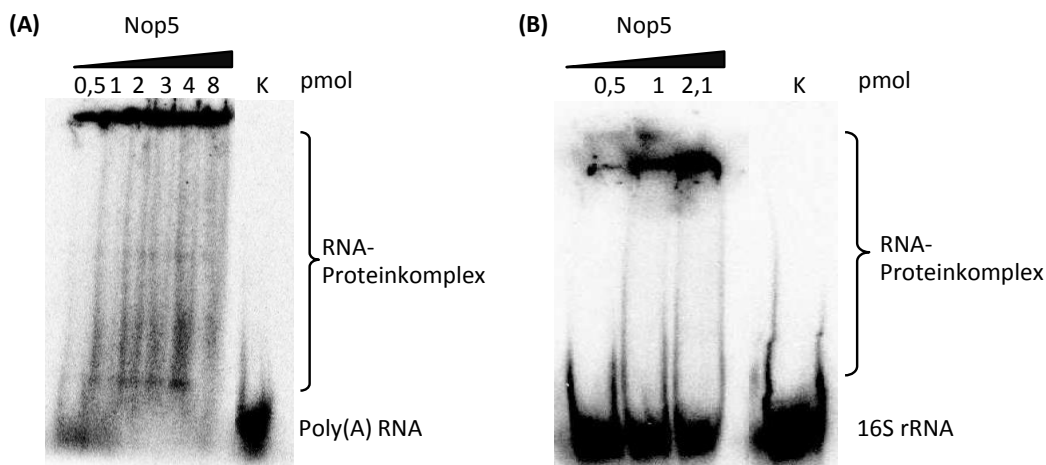


Abbildung 33. EMSA zur Untersuchung der Bindungsaffinität von Nop5 zu RNA. Gezeigt sind Abbildungen von nativen 5%-igen TBE-PAA-Gelen mit repräsentativen RNA/Protein EMSAs (Phosphoimager Scan). Substrat und Bindungsprodukt sind in der Abbildung hervorgehoben. Die Konzentration des Nop5 Proteins (in pmol) ist der Abbildung zu entnehmen. (A) Als Substrat diente 50 fmol radioaktiv markierte Poly(A)-RNA pro Einzelreaktion. (B) Als Substrat diente 50 fmol radioaktiv markierte 16S rRNA pro Einzelreaktion.

Zunächst wurde Poly(A)-RNA als Substrat zur Bindungsuntersuchung gewählt, da für dieses Substrat gezeigt werden konnte, dass Nop5 in der Lage ist die Polyadenylierung zu steigern (siehe Kapitel 3.2.8.1). Es zeigte sich, dass bereits 0,5 pmol Nop5 ausreichend sind, um einen Großteil der radioaktiv markierten Poly(A)-RNA in den Taschen zu halten (Abbildung 33 A). Es war nicht eindeutig, ob der Effekt durch eine Bindungsaffinität von Nop5 zum Substrat zurückzuführen ist, oder das Protein zusammen mit der RNA in den Taschen hängen bleibt. Aufgrund dessen wurde ein weiteres Substrat gewählt, das 163 nt lange 3' Ende der 16S rRNA, welche heteropolymerische Eigenschaften besitzt und mit der bereits in der Vergangenheit im Labor gearbeitet wurde (Abbildung 33 B) [124]. Auch hier ist zu beobachten, dass bereits eine Proteinkonzentration von 0,5 pmol Nop5 ausreichend ist um etwas radioaktiv markiertes Substrat in den Taschen nachzuweisen. Der Effekt verstärkt sich mit zunehmender Konzentration von Nop5. Es lässt sich mit der 16S rRNA als Substrat, ebenfalls nicht ausschließen, dass Nop5 zusammen mit der radioaktiv markierten 16S rRNA in den Taschen hängen bleibt und die Verschiebung der RNA-Konzentration im Gel nicht auf einer Bindungsaffinität von Nop5 zur RNA beruht. An dieser Stelle wurden keine weiteren Untersuchungen zur Bindungsaffinität von Nop5 zu RNA mittels EMSA durchgeführt.

3.2.8.4 Untersuchungen zur Polyadenylierung mittels 121 nt *nuoH* Transkript als Substrat

Im folgenden Schritt sollte der Effekt von Nop5 auf das Rrp4-Exosom untersucht werden, indem ein natürlicheres Substrat für Polyadenylierungsassays verwendet wurde. Poly(A)-RNA ist zwar in unserem Labor sehr gut etabliert, aufgrund seiner Nukleotidzusammensetzung aus 30 Adenosinen jedoch sehr artifiziell. Die 16S rRNA, welche für die Untersuchungen mittels EMSA (siehe Kapitel 3.2.8.3) verwendet wurde, ist zwar ein natürliches, bekanntes Substrat des Exosoms, weist jedoch eine sehr starke Sekundärstruktur auf und ist dadurch nur schwer durch das Exosom prozessierbar [124]. In der Vergangenheit konnte dagegen gezeigt werden, dass die *nuoH* mRNA in *S. solfataricus* *in vivo* durch das Exosom polynukleotidyliert werden kann [120]. Für die folgenden Assays wurden aufgrund dessen die letzten 121 Nukleotide (nt), ausgehend vom 3' Ende, der *nuoH* mRNA genutzt. Die Position entspricht dabei der, für welche die Polynukleotidylierung durch das Exosom nachgewiesen werden konnte. Das Transkript wurde intern radioaktiv markiert und im Folgenden als 121 nt *nuoH* Transkript bezeichnet.

In Abbildung 34 ist ein repräsentativer Polyadenylierungsassay dargestellt, in Abbildung 34 B die graphische Darstellung des Mittelwertes zweier unabhängiger Versuche, mit Standardabweichungen.

Für die Polyadenylierungsreaktion wurde ADP dem Reaktionsansatz zugesetzt; Reaktionsansätze wurden auf 10%-ige Harnstoff-PAA-Gele aufgetragen.

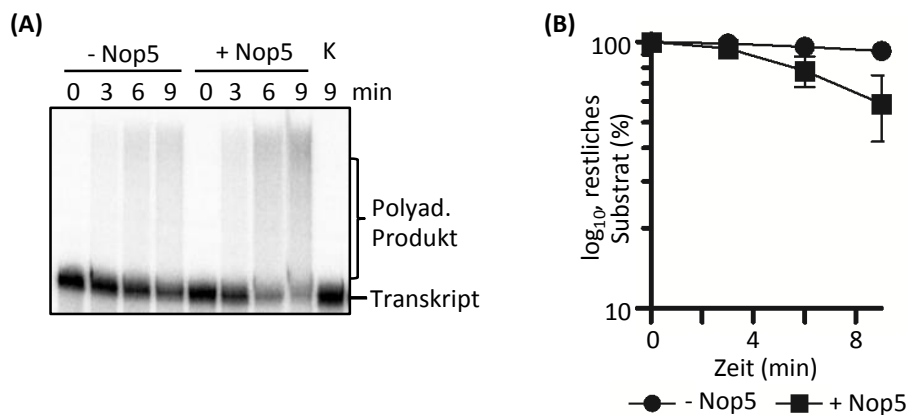


Abbildung 34. Nop5 steigert die Effizienz der Polyadenylierung des 121 nt *nuoH* Transkriptes durch das Rrp4-Exosom. (A) Abbildung eines 10%-igen Harnstoff-PAA-Gels mit repräsentativen RNA-Polyadenylierungsassay (Phosphoimager Scan). Substrat und Polyadenylierungsprodukt sind in der Abbildung hervorgehoben. Als Substrat diente 8 pmol intern markiertes 121 nt *nuoH* Transkript pro Einzelreaktion. Inkubationszeiten (bei 60°C) in min sind bei den entsprechenden Proteinkomplexen angegeben. Pro Reaktion wurde 0,03 pmol Proteinkomplex/μl eingesetzt. (B) Graphische Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Wiederholungen des RNA-Polyadenylierungsassays. K, Kontrollreaktionsansatz ohne Protein; - Nop5, Rrp4-Exosom ohne die Zugabe von Nop5; + Nop5, Rrp4-Exosom mit Zugabe von Nop5.

Es konnte gezeigt werden, dass Nop5 auch im Fall des natürlichen heteropolymerischen Transkriptes *nuoH* in der Lage ist, die Effizienz der Polyadenylierung im Vergleich zum Rrp4-Exosom zu steigern.

3.2.8.5 Untersuchungen zur Degradation mittels 121 nt *nuoH* Transkript als Substrat

Ebenso wie für die Poly(A)-RNA wurde für das 121 nt *nuoH* Transkript der Einfluss von Nop5 auf das Rrp4-Exosom zusätzlich mittels Degradationsassays untersucht. In Abbildung 35 A ist ein repräsentatives 10%-iges Harnstoff-PAA-Gel gezeigt, in 35 B die graphische Darstellung der Mittelwerte zweier unabhängiger Versuche, mit Standardabweichungen. Für die Degradationsreaktion wurde P_i dem Reaktionsansatz zugesetzt; Reaktionsansätze wurden auf 10%-ige Harnstoff-PAA-Gele aufgetragen. Im Fall des 121 nt *nuoH* Transkriptes konnte kein Einfluss von Nop5 auf das Rrp4-Exosom gezeigt werden.

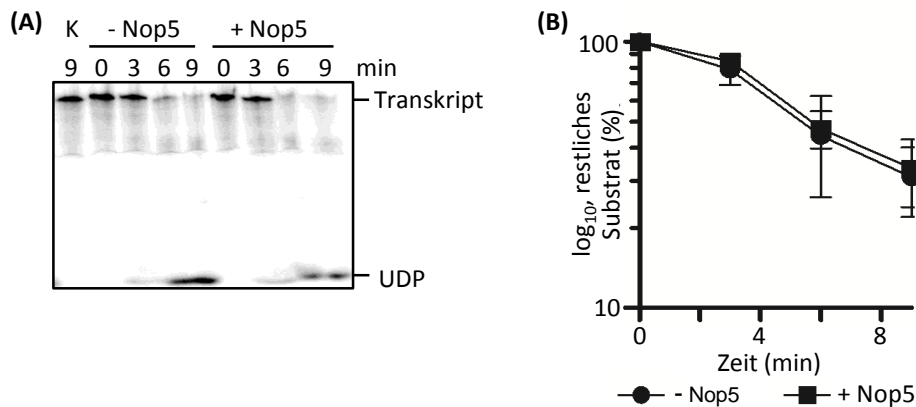


Abbildung 35. Untersuchung von Nop5 auf die Degradationseffizienz des 121 nt *nuoH* Transkriptes durch das Rrp4-Exosom. (A) Abbildung eines 10%-igen Harnstoff-PAA-Gels mit repräsentativem RNA-Degradationsassay (Phosphoimager Scan). Substrat und Degradationsprodukt sind in der Abbildung hervorgehoben. Als Substrat diente 8 pmol des 121 nt *nuoH* Transkriptes pro Einzelreaktion. Inkubationszeiten (bei 60°C) in min sind bei den entsprechenden Proteinkomplexen angegeben. Pro Reaktion wurde 0,03 pmol Proteinkomplex/μl eingesetzt. (B) Graphische Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Wiederholungen des RNA-Degradationsassays. K, Kontrollreaktionsansatz ohne Protein; - Nop5, Rrp4-Exosom ohne die Zugabe von Nop5; + Nop5, Rrp4-Exosom mit Zugabe von Nop5.

3.3 Untersuchungen bezüglich der Interaktion von EF1α und SSO_RS01100 mit dem Exosom

EF1α und SSO_RS01100 konnten mehrmals zusammen mit dem Exosom bei Co-Immunopräzipitationen über Rrp41 -Antikörper aus *S. solfataricus* präzipitiert werden. Bei den Bachelorarbeiten von Franziska Hartmann und Oliver Puckelwald wurden beide Proteine auf eine Interaktion mit dem Exosom untersucht. Mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation des Exosoms und SSO_RS01100 unter Verwendung von Rrp4- und Rrp41-Antikörpern wurde gezeigt, dass das Protein SSO_RS01100 unspezifisch mit den beiden Antikörpern interagiert. Auch eine Aufreinigung des Exosoms mit SSO_RS01100 zeigte, dass das Exosom und SSO_RS01100 in getrennten Fraktionen von der Größenaufschlusschromatographie eluiert [177]. Mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation des Exosoms und EF1α unter Verwendung von Rrp41-Antikörpern wurde gezeigt, dass EF1α nicht zusammen mit dem Exosom präzipitiert werden konnte. Eine Interaktion von EF1α mit den Rrp41-Antikörpern war nicht gegeben.

Für eine genaue Beschreibung der Ergebnisse möchte ich an diesem Punkt auf die Bachelorarbeiten von Franziska Hartmann "Untersuchungen der potentiellen Interaktion des Genprodukts von SSO_RS01100 mit dem archaealen Exosom aus *Sulfolobus solfataricus*" und Oliver Puckelwald

"Untersuchungen zu potentiellen Interaktionspartnern des archaealen Exosoms in *Sulfolobus solfataricus*" verweisen, welche ich während meiner Doktorarbeit betreut habe.

3.4 Untersuchungen des *in vivo* rekonstituierten DnaG-Csl4-Exosoms

DnaG ist eine spezifische, archaeale Untereinheit des Exosoms von *S. solfataricus*. Eine Interaktion von DnaG findet über das Csl4-Protein der Kappe statt [134]. Während die Kristallstruktur des Csl4-Exosoms von *Archaeoglobus fulgidus* bekannt ist [142], ist vom DnaG-Csl4-Exosoms noch unklar, wie sich die strukturelle Anordnung von DnaG mit dem Csl4-Exosom darstellt. In diesem Kapitel wurde die funktionelle Organisation des DnaG-Csl4-Exosoms über SEPM-Elektronenmikroskopie (*single particle electron microscopy*) untersucht. Dazu ist es nötig, das Exosom in großen Mengen zu produzieren, wozu die Methode der Rekonstitution exosomaler Komplexe *in vivo* in *E. coli* genutzt wurde.

3.4.1 Rekonstitution des DnaG-Csl4-Exosoms in *E. coli in vivo*

3.4.1.1 Klonierungsschema

Um das DnaG-Csl4-Exosom für SEPM-Untersuchungen zu produzieren, wurde in dieser Arbeit versucht das DnaG-Csl4-Exosom *in vivo* in *E. coli* zu rekonstituieren. Grundlage dieser Methode bildet die *in vivo* Rekonstitution des Rrp4-Exosoms in *E. coli*. Die Ausbeuten dieses Verfahrens sind dabei höher, als bei einer Überexpression der Einzelproteine in *E. coli* mit einer anschließenden *in vitro* Rekonstitution zum exosomalen Gesamtkomplex [128]. Zur Kontrolle und zum Vergleich in der geplanten SPEM-Untersuchung ist es wichtig, neben dem DnaG-Csl4-Exosom, auch das Csl4-Exosom *in vivo* zu rekonstituieren. Um Klonierungsarbeiten möglichst effizient zu gestalten und Induktionslevel von Einzelproteinen bzw. Proteinkomplexen besser beeinflussen zu können, wurde mit zwei Vektoren gearbeitet (Abbildung 36).

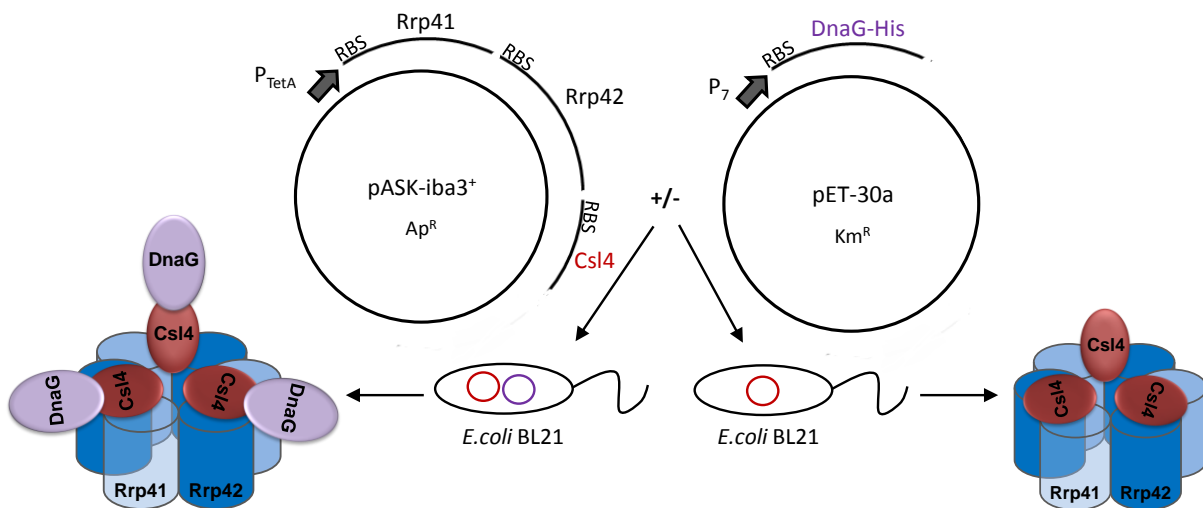


Abbildung 36. Schematische Illustration zur *in vivo* Rekonstitution des DnaG-Csl4-Komplexes und Csl4-Komplexes in *E. coli*. In dem Schema sind die Vektoren zu sehen, ihre Konstruktion und die entsprechenden Resistenzgene. Entsprechend ihrer Farben (Rot/Violett für Csl4/DnaG) wird in Kombination entweder das DnaG-Csl4-Exosom oder das Csl4-Exosom allein überexprimiert.

Auf dem Vektor pASK-iba3+ wurden die Untereinheiten des Csl4-Exosoms, in der Reihenfolge Rrp41-Rrp42-Csl4, unter Kontrolle des Promotors P_{Tet} kloniert. Jedes Protein besitzt dabei seine eigene Ribosomenbindestelle. Tags wurden nicht an die Proteine angefügt. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz und ist über Anhydrotetracyclin (AHT) induzierbar. DnaG dagegen lag in unserem Labor auf dem Vektor pET30a bereits vor [143] und wird als N-terminales DnaG-His₆ über IPTG induziert. Der Vektor besitzt einen T_7 -Promotor und eine Kanamycin-Resistenz. Für die Rekonstitution des DnaG-Csl4-Exosoms *in vivo* wurden beide Vektoren in *E. coli* BL21 transformiert. Die Induktion erfolgte gleichzeitig mit IPTG und AHT, für genaue Induktionsbedingungen siehe Material und Methoden 2.3.21. Die induzierten Einzelproteine finden sich in *E. coli* zum Proteinkomplex zusammen.

3.4.1.2 Isolation des Csl4-Exosoms über Heparinsäule und Gelfiltration

Das Exosom ist ein RNA-bindender Proteinkomplex, vor allem die RNA-bindenden Domänen von Csl4 liegen nach außen exponiert vor [142]. Da das *in vivo* rekonstituierte Exosom keinerlei tags besitzt, basierte die Reinigung des Komplexes auf der Interaktion von Heparin mit RNA [178]. Das Csl4-Exosom wurde zunächst über eine Heparinsäule isoliert und im Anschluss mittels Gelfiltration aufgereinigt (Abbildung 37).

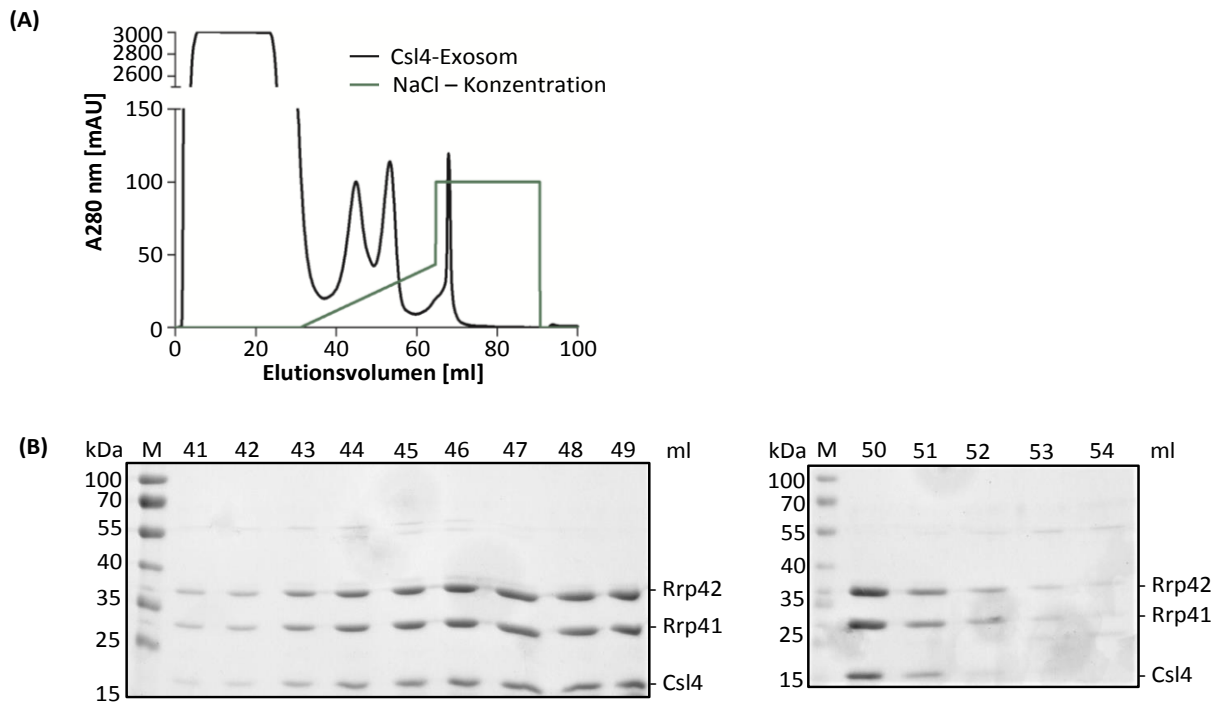


Abbildung 37. Reinigung des Csl4-Exosoms mittels Heparinsäule. (A) Elutionsprofil der Isolation des Csl4-Exosoms über Heparinsäule (ÄKTAexplorer, HiTrap™ Heparin HP 5 ml). Das Absorptionsspektrum (A 280 nm) zeigt die Fraktionen (41 ml – 51 ml) in welchen das Csl4-Exosom detektierbar ist. In grün dargestellt ist der NaCl-Gradient in steigender Konzentration. **(B)** 12% SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung. Die Elutionen von (A) sind aufgetragen und zeigen das Csl4-Exosom, welches in den Fraktionen 41 ml - 51 ml zu finden ist. M, *prestained* Proteinmarker.

Wie Abbildung 37 A und 37 B zu entnehmen ist, kommt es zur Elution des Csl4-Exosoms in einem Volumen zwischen 41 und 51 ml, was einer Konzentration des Pufferzusatzes B von 9% bis 22,5% entspricht. Die Einzelproteine des Csl4-Exosoms sind dabei in gleichem stöchiometrischem Verhältnis im SDS-PAA-Gel (Abbildung 37 B) zu sehen. Um einzelne Proteinverunreinigungen zu entfernen, wurde im Anschluss eine Gelfiltration der gepoolten und konzentrierten Fraktionen von 41 ml bis 51 ml vorgenommen (Abbildung 38).

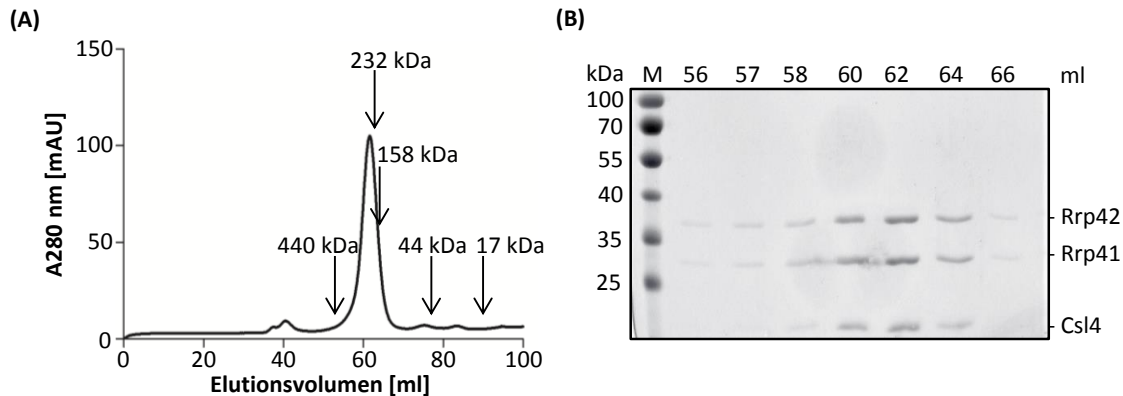


Abbildung 38. Größenausschlusschromatographie des Csl4-Exosoms. (A) Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie des Csl4-Exosoms (ÄKTAexplorer, Superdex HiLoad 16/600 200 µg column). Das Absorptionsspektrum (A 280 nm) zeigt die Fraktionen (ml) in welchen das Csl4-Exosom detektierbar ist. Mit Pfeilen markiert ist die Position über die Angabe der Absorptionsmaxima der Markerproteine (440 kDa Ferritin, 232 kDa Katalase, 158 kDa Aldolase, 44 kDa Ovalbumin, 17 kDa Myoglobin). (B) 12% SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung. Die Elutionen von (A) sind aufgetragen und zeigen das Csl4-Exosom, welches in den Fraktionen 57 - 64 ml zu finden ist. M, *prestained* Proteinmarker.

Das Absorptionsmaximum des Chromatogramms liegt bei 61,58 ml, was einem Molekulargewicht von 213,35 kDa entspricht und in etwa mit den bereits publizierten Daten zur Größe des Csl4-Exosoms (mit *His-tags*) von ca. 240 kDa übereinstimmt [130]. Für die Berechnung des Molekulargewichtes anhand des Elutionsvolumens, wurde die Eichgerade verwendet, welche auch für die Größenbestimmung von Nop5 herangezogen wurde (siehe Kapitel 3.2.7, Ergebnisse).

3.4.1.2 Isolation des DnaG-Csl4-Exosoms über Heparinsäule und Gelfiltration

Das DnaG-Csl4-Exosom wurde ebenso wie das Csl4-Exosom zunächst über die Heparinsäule isoliert. Auch DnaG ist ein Protein welches in der Lage ist RNA bzw. DNA zu binden [143], weshalb auch für diesen Komplex die Heparinsäule ein geeignetes Chromatographieverfahren, für den ersten Reinigungsschritt, bietet.

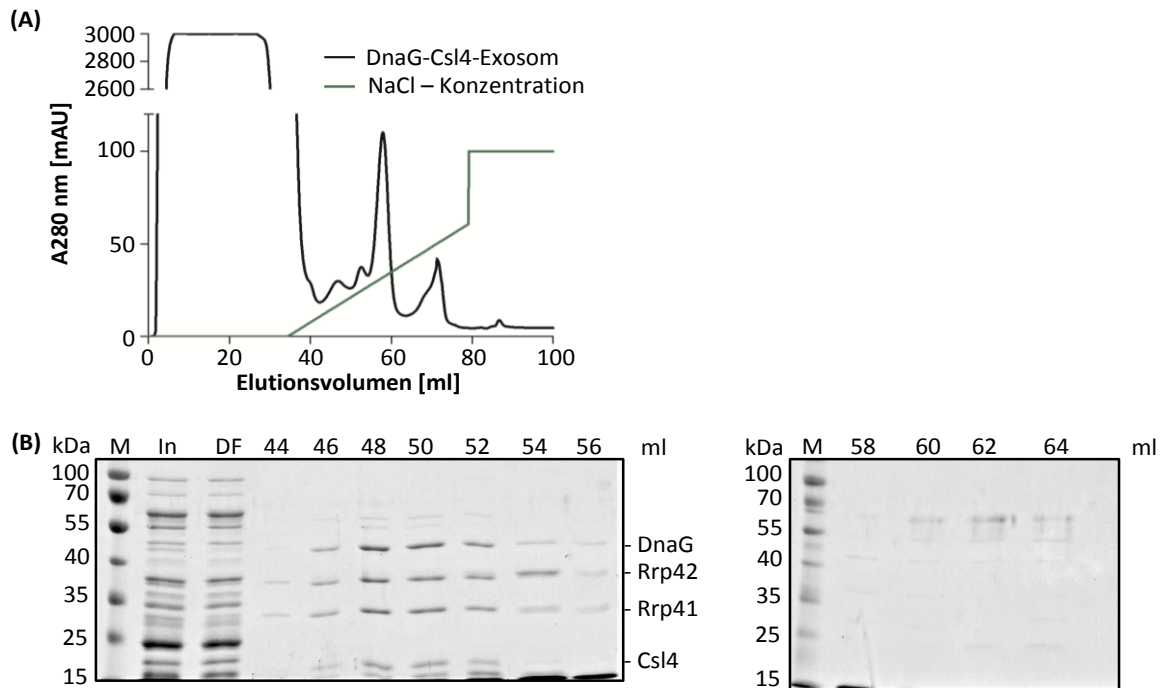


Abbildung 39. Aufreinigung des DnaG-Csl4-Exosoms mittels Heparinsäule. (A) Elutionsprofil der Isolation des DnaG-Csl4-Exosoms über Heparinsäule (ÄKTAexplorer, HiTrap™ Heparin HP 5 ml). Das Absorptionsspektrum (A 280 nm) zeigt die Fraktionen (46 ml – 54 ml) in welchen das DnaG-Csl4-Exosom detektierbar ist. In gründergestellt ist der NaCl-Gradient steigender Konzentration. **(B)** 12% SDS-Gel nach Coomassiefärbung. Die Elutionen von (A) sind aufgetragen und zeigen das Csl4-Exosom, welches in den Fraktionen 46 ml - 54 ml zu finden ist. M, *prestained* Proteinmarker.

Wie Abbildung 39 A und 39 B zu entnehmen ist, kommt es zur Elution des DnaG-Csl4-Exosoms in einem Volumen zwischen 46 und 54 ml, was einer Konzentration des Pufferzusatzes B von 14,4% bis 25,1% entspricht. Die Einzelproteine des DnaG-Csl4-Exosoms sind dabei in gleichem stoichiometrischen Verhältnis im SDS-PAA-Gel (Abbildung 39 B). Um einzelne Proteinverunreinigungen zu entfernen, wurde im Anschluss eine zusätzliche Gelfiltration der gepoolten und konzentrierten Fraktionen von 46 ml bis 54 ml vorgenommen (Abbildung 40).

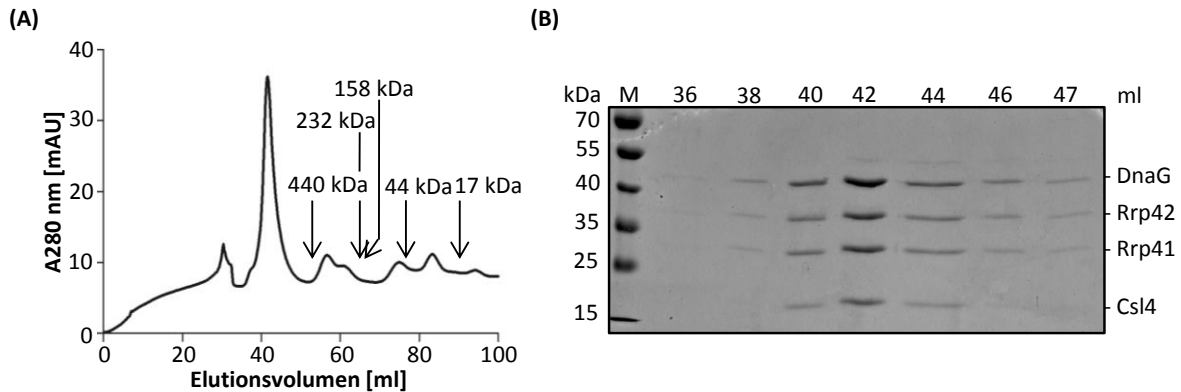


Abbildung 40. Größenausschlusschromatographie des DnaG-Csl4-Exosoms. (A) Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie des DnaG-Csl4-Exosoms (ÄKTAexplorer, Superdex HiLoad 16/600 200 µg column). Das Absorptionsspektrum (A 280 nm) zeigt die Fraktionen (40 ml – 46 ml) in welchen das DnaG-Csl4-Exosom detektierbar ist. Mit Pfeilen markiert ist die Position über die Angabe der Absorptionsmaxima der Markerproteine (440 kDa Ferritin, 232 kDa Katalase, 158 kDa Aldolase, 44 kDa Ovalbumin, 17 kDa Myoglobin). (B) 12% SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung. Die Elutionen von (A) sind aufgetragen und zeigen das DnaG-Csl4-Exosom, welches in den Fraktionen 40 - 46 ml zu finden ist. M, *prestained* Proteinmarker.

Für die Berechnung des Molekulargewichtes anhand des Elutionsvolumens, wurde die Eichgerade verwendet, welche auch für die Größenbestimmung von Nop5 herangezogen wurde (siehe Kapitel 3.2.7).

Das Absorptionsmaximum des Chromatogramms liegt bei 41,61 ml, was einem rechnerischen Molekulargewicht von 1313,15 kDa entspricht (Abbildung 40 A). Das erwartete Molekulargewicht eines DnaG-Csl4-Exosoms mit einem DnaG-Protein pro Csl4, liegt bei etwa 375 kDa; das theoretische Molekulargewicht mit zwei gebundenen DnaG-Proteinen pro Csl4 bei etwa 510 kDa. Der hier vorliegende Komplex ist im Ausschlussvolumen nachgewiesen worden, mit einer Mindestgröße von ca. 1300 kDa (errechnet: 1313,15 kDa). Somit ist er um das 2,5 fache schwerer als ein Csl4-Exosom mit insgesamt sechs bindenden DnaG-Proteinen. Die SDS-PAA-Gele in Abbildung 40 B zeigen eine stöchiometrische Verteilung der Proteine Rrp42, Rrp41 und Csl4, wohingegen DnaG in leicht erhöhter Proteinkonzentration im Komplex vorhanden zu sein scheint. Da die Färbung mit Coomassie jedoch generell auf eine Bindung des Farbstoffs an basische und aromatische Aminosäureseitenketten beruht, ist eine Quantifizierung mittels des Farbstoffes ungeeignet [179]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich DnaG effizienter als die anderen exosomalen Proteine anfärben lässt.

3.4.2 Untersuchung des DnaG-Csl4-Exosoms mittels Glycerolgradienten

Aufgrund des unerwartet hohen Molekulargewichtes des DnaG-Csl4-Exosoms sollte untersucht werden, wie sich das DnaG-Csl4-Exosom in einem Glycerolgradienten verhält und dahingehend kontrolliert werden, ob es sich um Aggregate des DnaG-Csl4-Exosoms handeln könnte. Es wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass etwa die Hälfte des Exosoms von *S. solfataricus* zusammen mit ribosomalen Untereinheiten coseimentiert, wenn Gesamtzellextrakt bzw. Zell-freier Extrakt auf einen Glycerolgradienten aufgetragen wird [131]. Zudem wird DnaG nur in den schweren Gradientenfractionen (P100) von Sucrose- und Glycerolgradienten nachgewiesen, coseimentiert zusammen mit Membranen und ribosomalen Komponenten von *S. solfataricus* [123, 132].

Das *in vivo* in *E. coli* rekonstituierte und aufgereinigte DnaG-Csl4-Exosom, wurde im folgendem Experiment in einem 20-60%-igen Glycerolgradienten aufgetragen. Nach Ultrazentrifugation wurden die einzelnen Fractionen des Glycerolgradienten (zu je 500 μ l) in einem 12%-igen SDS-PAA-Gel aufgetragen und mittels Silberfärbung angefärbt, um auf Verteilung des DnaG-Csl4-Exosoms im Gradienten hin untersucht zu werden (Abbildung 41).

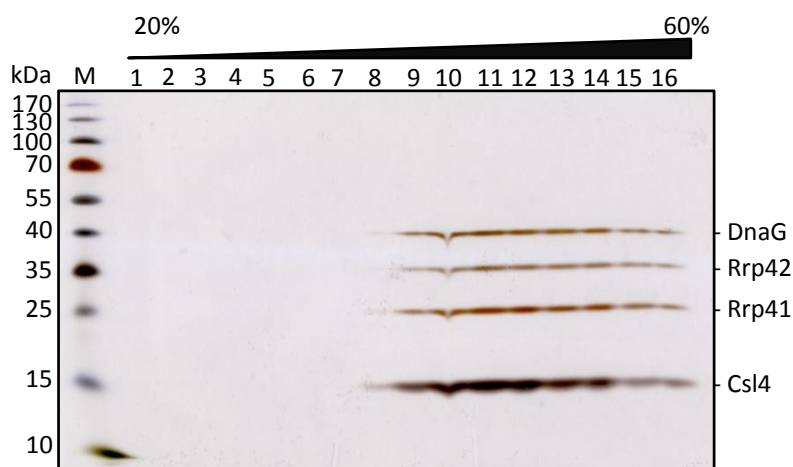


Abbildung 41. Größenanalyse des DnaG-Csl4-Exosoms. Dargestellt ist die Verteilung des DnaG-Csl4-Exosoms im 20–60%-igen Glycerolgradienten (150 mM NaCl). Die Fraktionen des Glycerolgradienten wurden zu je 500 μ l aufgeteilt, im 12% -igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert. Das *in vivo* in *E. coli* rekonstituierte DnaG-Csl4-Exosom ist in Fraktionen 9–16 des Glycerolgradienten detektierbar.

Dabei ist ein Nachweis des *in vivo* in *E. coli* rekonstituierten DnaG-Csl4-Exosoms in den Fraktionen 9 - 16 ersichtlich (Abbildung 41). Dies stimmt mit bereits publizierten Daten überein, in welchen das natürliche Exosom von *S. solfataricus* aus zellfreiem Extrakt, im 10–60 %-igen Glycerolgradienten in den Fraktionen 10–15 zusammen mit ribosomalen Komponenten nachzuweisen ist [131]. Trotz des unerwartet hohen Molekulargewichtes des DnaG-Csl4-Exosoms nach Gelfiltration (siehe Kapitel

3.4.1.2), steht das Ergebnis des Glycerolgradienten somit in keinem Widerspruch zu bereits publizierte Daten.

3.4.3 Untersuchungen bezüglich der Aktivität des DnaG-Csl4-Exosoms mittels Degradationsassays

3.4.3.1 Die *in vivo* in *E. coli* rekonstituierten Csl4- und DnaG-Csl4-Exosome zeigen verringerte Aktivität

Um weiterhin die Funktionalität des DnaG-Csl4-Exosoms zu überprüfen, wurden Degradationsassays durchgeführt. Dabei wurde zum Vergleich der Aktivität des DnaG-Csl4-Exosoms auch die Degradationsfähigkeit des Csl4-Exosoms herangezogen (Abbildung 42).

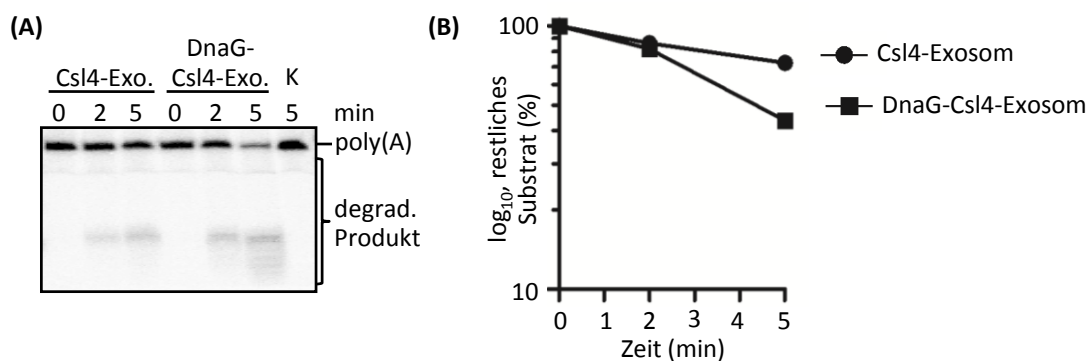
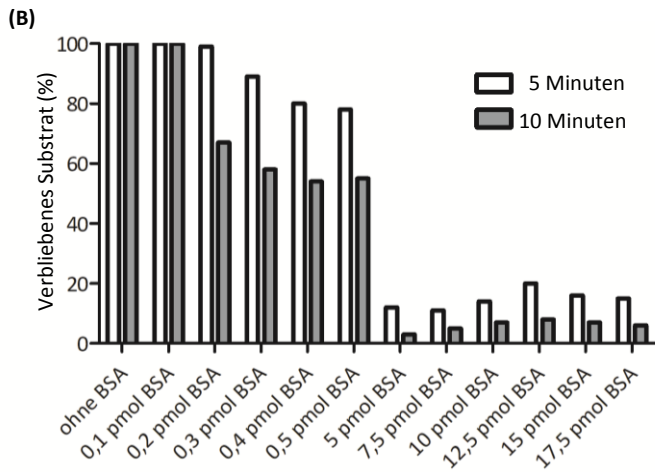
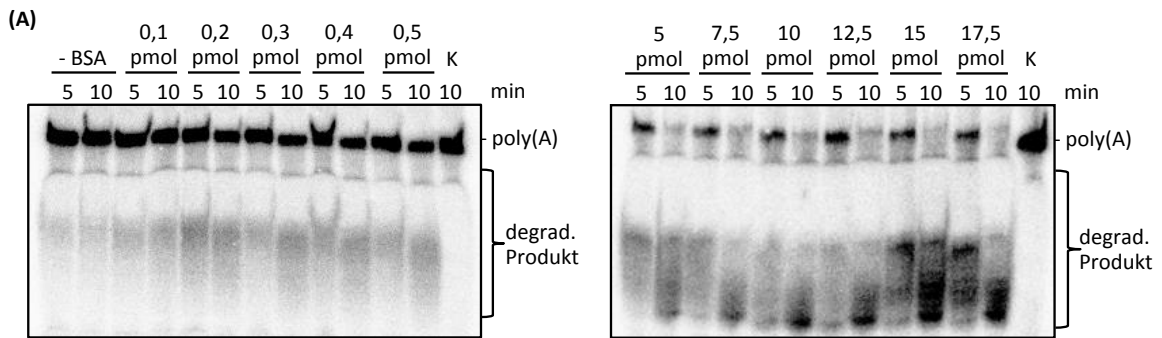


Abbildung 42. Degradationsassay zur Aktivitätsbestimmung des Csl4- und DnaG-Csl4-Exosoms. (A) Abbildung eines 16%-igen Harnstoff-PAA-Gels mit RNA-Degradationsassay (Phosphoimager Scan). Substrat und Degradationsprodukt sind in der Abbildung hervorgehoben. Als Substrat diente 8 fmol radioaktiv markierte Poly(A)-RNA. Inkubationszeiten (bei 60°C) in min sind bei den entsprechenden Proteinkomplexen angegeben. Pro Reaktion wurde 0,03 pmol Proteinkomplex/ μ l eingesetzt. Csl4-Exo., Csl4-Exosom; DnaG-Csl4-Exo., DnaG-Csl4-Exosom; K, Kontrollreaktionsansatz ohne Protein. (B) Graphische Darstellung des RNA-Degradationsassays.

Es zeigt sich, dass beide *in vivo* in *E. coli* rekonstituierten Proteinkomplexe Degradationsaktivität besitzen. Verglichen mit dem Csl4-Exosom ist die Aktivität des DnaG-Csl4-Exosoms erhöht, beide Komplexe zeigen jedoch im Vergleich mit früheren Degradationsassays eine stark verringerte Aktivität. In Degradationsassays, welche in der Vergangenheit durchgeführt wurden, wurde 2 pmol Poly(A)-RNA in 5 Minuten zu ca. 75% durch das Csl4-Exosom degradiert, durch das DnaG-Csl4-Exosom zu 50% [124]. Ebenso wie in dieser Arbeit wurden dabei 0,3 pmol Proteinkomplex pro Einzelreaktion eingesetzt, die Substratkonzentration in vorliegendem Assay lag jedoch bei 8 fmol Poly(A)-RNA pro Einzelreaktion.

3.4.3.2 BSA steigert die Aktivität des Csl4-Exosoms und DnaG-Csl4-Exosoms

Da die *in vivo* in *E. coli* rekonsituierten Csl4-Exosome und DnaG-Csl4-Exosome nur gering aktiv sind, wurde versucht mittels BSA die Aktivität zu steigern. BSA wird in vielen Pufferzusätzen, z.B. bei Restriktionsenzymen, verwendet um der Adhäsion an Eppendorftube-Wänden vorzubeugen und die Enzyme zu stabilisieren. BSA sorgt dabei einerseits für die Herabsetzung von Oberflächenspannungen und schützt andererseits Enzyme effektiv vor Proteasen [180].



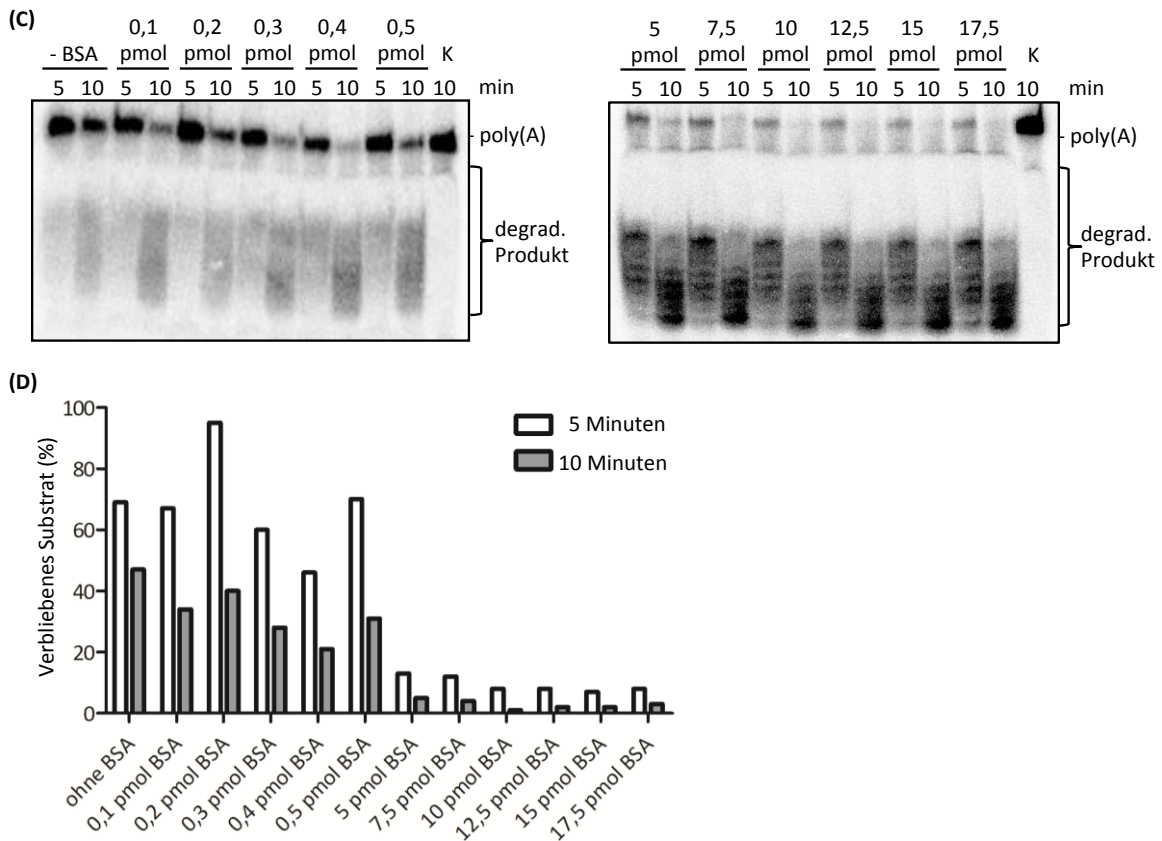
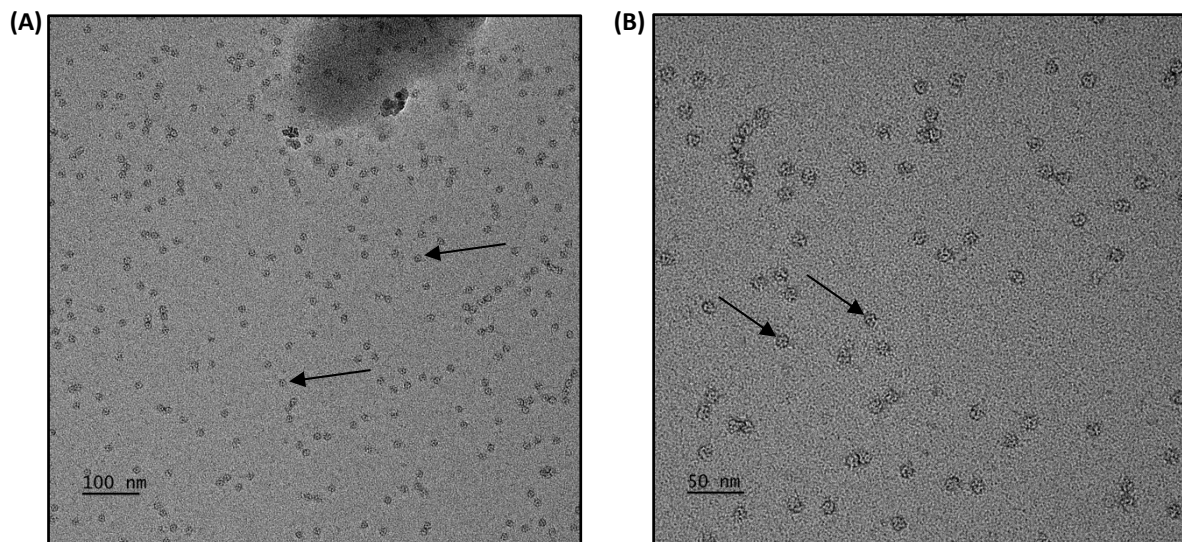


Abbildung 43. BSA beeinflusst die Aktivität des Csl4-Exosoms und des DnaG-Csl4-Exosoms positiv. Csl4-Exosom (A) und DnaG-Csl4-Exosom (C). (A) und (C) Phosphorimager Abbildungen von 16%-igen Harnstoff-PAA-Gelen mit repräsentativen RNA-Degradationsassays. Als Substrat diente 8 fmol radioaktiv markierte Poly(A)-RNA pro Einzelreaktion. Inkubationszeiten (bei 60°C) in min sowie die Konzentration des eingesetzten BSA sind bei den entsprechenden Proteinkomplexen angegeben. Pro Reaktion wurde 0,03 pmol Proteinkomplex/ μ l eingesetzt. Csl4-Exosom (B) und DnaG-Csl4-Exosom (D). (B) und (D) Graphische Darstellung der RNA-Degradationsassays.

Es zeigt sich, dass durch die Zugabe von BSA die Aktivität des Csl4-Exosoms (Abbildung 43 A und B) sowie die des DnaG-Csl4-Exosoms (Abbildung 43 C und D) positiv beeinflusst wird. Ab einer Konzentration von 5 pmol BSA Endkonzentration im Puffer ist eine deutliche Steigerung der Aktivität zu beobachten. Da jedoch keine Aktivitätsassays für BSA-Konzentrationen zwischen 0,6 pmol und 5 pmol durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bereits geringere Konzentrationen als 5 pmol Endkonzentration BSA im Puffer ausreichend sind, um einen vergleichbaren Effekt zu erreichen. Neben der Steigerung der Aktivität durch BSA, zeigt sich in den Aktivitätsassays wiederum, dass das DnaG-Csl4-Exosom im Vergleich zum Csl4-Exosom eine gesteigerte Degradationseffizienz besitzt und bestätigt damit die Ergebnisse aus 3.4.3.1.

3.4.4 Untersuchungen des Csl4-Exosoms und DnaG-Csl4-Exosoms mittels Elektronenmikroskopie

Im Folgenden sollten das Csl4-Exosom und DnaG-Csl4-Exosom mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden, um festzustellen ob diese für folgende Analysen mittels SPEM geeignet sind. Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass das Molekulargewicht des *in vivo* in *E. coli* rekonsituierten Csl4-Exosoms mit vorherigen Daten übereinstimmt und katalytische Aktivität besitzt. Das Molekulargewicht des DnaG-Csl4-Exosoms lag um das 2,5-fache höher als erwartet, jedoch konnte gezeigt werden, dass es sich im Glycerolgradienten verhält wie das natürliche Exosom von *S. solfataricus* (siehe Kapitel 3.4.2). Des Weiteren ist das DnaG-Csl4-Exosom in der Lage RNA zu degradieren und besitzt dabei im Vergleich zum Csl4-Exosom eine gesteigerte Aktivität. Aufgrund dessen wurden Elektronenmikroskopien für beide Komplexe durchgeführt.



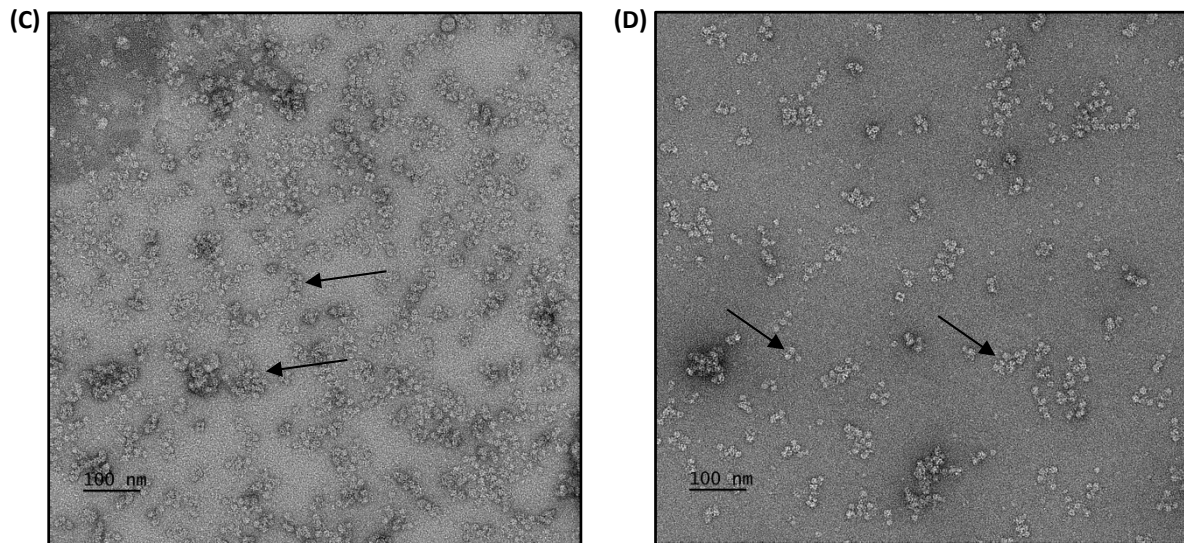


Abbildung 44. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Csl4-Exosoms (A) und (B) und DnaG-Csl4-Exosoms (C) und (D) nach Aufreinigung über Heparin- und Gelfiltrationssystem der ÄKTA. Mit Pfeilen hervorgehoben sind Beispiele der klar ersichtlichen, separaten Proteinkomplexe. (A) Vergrößerung 100 nm. (B) Vergrößerung 50 nm. (C) und (D) Mit Pfeilen hervorgehoben sind Beispiele der aggregierten Proteinkomplexe. Vergrößerung 100 nm.

Das Csl4-Exosom zeigt sich unter dem Elektronenmikroskop als klar zu unterscheidende Einzelkomplexe (Abbildung 44 A und B). Bei der Vergrößerung zu 50 nm ist deutlich der zentrale Kanal zu erkennen, welcher durch die hexamere Grundeinheit des Exosoms gebildet wird. Die Struktur des Csl4-Exosoms, bestehend aus hexamerer Grundeinheit und trimerer Kappe, ist zu erkennen. Das DnaG-Csl4-Exosom dagegen zeigt sich unter dem Elektronenmikroskop als Aggregat. Es sind keine klar zu unterschiedenen Einzelkomplexe zu erkennen. Für eine tiefere Analyse mittels SPEM allerdings sind klare Einzelkomplexe in höherer Konzentration nötig.

3.4.4.1 Untersuchungen des DnaG-Csl4-Exosoms mittels Elektronenmikroskopie nach Zugabe von DDM

n-Dodecyl-beta-Maltoside Detergent (DDM) ist ein Detergens, welches oftmals genutzt wird um hydrophobe Membranproteine zu solubilisieren [181]. DDM ist dabei in der Lage, die Aktivität von Proteinen besser zu erhalten als andere Detergentien wie CHAPS oder NP-40. Gleichzeitig ist die UV-Absorption gering und eignet sich aufgrund dessen besser für ÄKTA Aufreinigungen, welche bei einer Absorption von 280 nm durchgeführt werden. Für die SPEM-Elektronenmikroskopie sind Detergentien in der Regel wenig geeignet, da sie einen starken Hintergrund verursachen und eine

bessere Auflösung als 6–8 Å meist nicht möglich ist (mündliche Übermittlung von Susann Kaltwasser). Laut Dr. Janet Vonck wurden die besten Ergebnisse für SPEM mit DDM erzielt. Es wurden 0,17 mM DDM Endkonzentration für die Aufreinigung des DnaG-Csl4-Exosoms verwendet. Bei dieser Konzentration ist die kritische Mizellenbildung (CMC) in H₂O definiert. Bei 0,12 mM Endkonzentration DDM dagegen ist die CMC für 0,2 M NaCl [181]. Da der Puffer jedoch nur 50 mM NaCl beinhaltetete, wurde sich an der CMC von DDM in H₂O orientiert. Das DDM wurde sowohl in Aufschlusspuffern als auch in Puffern für ÄKTA genutzt. Eine Verschiebung des Maximalpeaks des Chromatogramms im Vergleich mit der ursprünglichen Aufreinigung (siehe Kapitel 3.4.1.2), ohne DDM, war jedoch nicht gegeben. Das Elutionsvolumen lag bei 41,9 ml, was einem Molekulargewicht von 1278,95 kDa entspricht (Abbildung 45 A). Da allerdings auch die Möglichkeit bestand, dass die Aggregation des DnaG-Csl4-Exosoms erst über längere Zeiträume stattfindet, wurde auf zusätzliche vorexperimentelle Tests bezüglich Aktivität und Glycerolgradient verzichtet und das DnaG-Csl4-Exosom direkt für SPEM-Analysen mittels Elektronenmikroskopie voruntersucht. Es zeigt sich, dass es auch unter Verwendung von DDM und verkürzter Zeit zwischen Isolation und Untersuchung des DnaG-Csl4-Exosoms, weiterhin zur Aggregation des Proteinkomplexes kommt, wie sich bei der Untersuchung durch Elektronenmikroskopie zeigte (Abbildung 45 B).

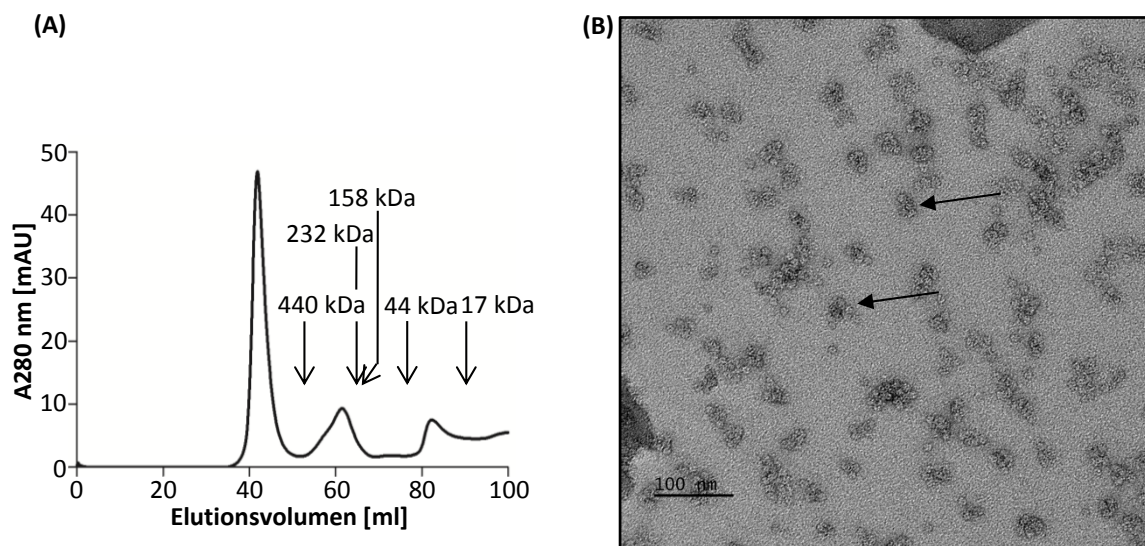


Abbildung 45. Größenausschlusschromatographie und SPEM-Analyse des DnaG-Csl4-Exosoms mit DDM. (A) Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie des DnaG-Csl4-Exosoms (ÄKTAexplorer, Superdex HiLoad 16/600 200 µg column). Das Absorptionsspektrum (A 280 nm) zeigt die Fraktionen (40 ml – 46 ml) in welchen das DnaG-Csl4-Exosom detektierbar ist. Mit Pfeilen markiert ist die Position über die Angabe der Absorptionsmaxima der Markerproteine (440 kDa Ferritin, 232 kDa Katalase, 158 kDa Aldolase, 44 kDa Ovalbumin, 17 kDa Myoglobin). **(B)** SPEM Aufnahmen des DnaG-Csl4-Exosoms nach Aufreinigung über Heparin- und Gelfiltrationssystem der ÄKTA unter Verwendung von 0,2 mM DDM. Mit Pfeilen hervorgehoben sind Beispiele der aggregierten Proteinkomplexe. Vergrößerung 100 nm.

3. 5 iCLIP

Das Exosom wurde sowohl strukturell als auch funktionell *in vitro* intensiv erforscht, jedoch konnten RNA Substrate des Proteinkomplexes aus *S. solfataricus* *in vivo* bislang nicht untersucht werden. Interessant ist die Fragestellung, ob bestimmte RNA-Spezies bevorzugt vom Exosom gebunden werden. Um einer Klärung dieser Frage näher zu kommen, wurde im Zuge der hier vorliegenden Doktorarbeit die Methode des iCLIP (*individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation*) angewendet. RNA, welche *in vivo* an das Exosom bindet, wird dabei mittels RNA Sequenzierung identifiziert. Um das Exosom mit gebundener RNA spezifisch zu isolieren wird eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt, für die Rrp4- und Rrp41-Antikörper genutzt wurden. Als Kontrolle gegen unspezifische RNA-Bindungen während des iCLIP diente ein Thioredoxin-Antikörper, da von Thioredoxin nicht bekannt ist, dass das Protein in der Lage wäre RNA oder DNA zu binden.

3.5.1 Experimente zur Vorbereitung und Optimierung des iCLIP

3.5.1.1 Bestimmung der NaCl-Konzentration des Waschpuffers für die Co-Immunopräzipitation

Für den iCLIP ist es wichtig, dass Proteine während der Co-Immunopräzipitation besonders spezifisch und sauber isoliert werden. Durch höhere Salzkonzentrationen werden generell unspezifische Interaktionen zwischen Proteinen (hier Protein-Antikörper) verringert, welche auf ionischen Bindungen beruhen [182]. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass stabile Interaktionen zwischen exosomalen Untereinheiten bis 2 M NaCl Endkonzentration bestehen [132]. Aufgrund dessen wurde die Co-Immunopräzipitation zunächst bezüglich der NaCl-Konzentration optimiert. Dazu wurde das Exosom von *S. solfataricus* aus Zell-freiem Lysat mittels Rrp4- und Rrp41-Antikörpern isoliert und die Konzentration an NaCl im Waschpuffer bestimmt, welche später für den iCLIP-Hauptversuch verwendet werden sollte. Es wurden Waschbedingungen mit 600 mM NaCl sowie mit 1 M NaCl Endkonzentration gewählt.

Nach erfolgter Co-Immunopräzipitation wurden die Elutionsfraktionen im 12%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert (Abbildung 46). Es ist ersichtlich, dass eine Co-Immunopräzipitation des Exosoms, sowohl mit 600 mM NaCl als auch mit 1 M NaCl Endkonzentration im Waschpuffer, möglich ist und die isolierten Mengen der exosomalen Untereinheiten, bei den beiden gewählten Konzentrationen von NaCl im Waschpuffer, ähnlich konzentriert vorliegen. Dabei ist an dieser Stelle zu anmerken, dass sowohl bei einer Konzentration von 600 mM als auch von

1 M NaCl, höhere Mengen an exosomalen Untereinheiten bei der Verwendung von Rrp4-Antikörpern isoliert werden konnten, als bei der Verwendung von Rrp41-Antikörpern. Da die Interaktion von exosomalen Proteinen auch bei der höheren Salzkonzentration von 1 M NaCl weiterhin stabil war, wurde für das spätere iCLIP-Hauptprotokoll 1 M NaCl Endkonzentration im Waschpuffer genutzt.

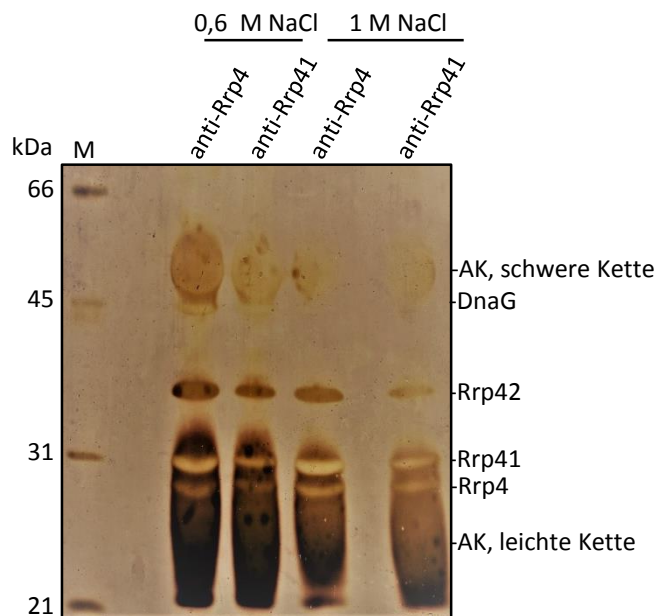


Abbildung 46. Isolation des Exosoms aus Zell-freiem Lysat von *S. solfataricus* mittels Co-Immunopräzipitation unter Verwendung von Rrp4- und Rrp41-Antikörpern. Dargestellt ist die Auftrennung der Elutionsfraktionen der Co-Immunopräzipitation mittels 12%-igen SDS-PAA-Gel nach Silberfärbung. Für den Waschpuffer der Co-Immunopräzipitation wurden 0,6 M NaCl bzw. 1 M NaCl genutzt. Es zeigt sich, dass die Salzkonzentration keinen Einfluss auf die Menge des präzipitierten Exosoms hat. AK, Antikörper; anti-Rrp4, Antikörper gegen die Untereinheit Rrp4 des Exosoms gerichtet; anti-Rrp41, Antikörper gegen die Untereinheit Rrp41 des Exosoms gerichtet; M, *low range* Proteinmarker.

3.5.1.2 Effektive Vernetzung zwischen RNA und Exosom mittels UV-Crosslink

In einem weiteren Vorversuch wurde die Effizienz des UV-Crosslinks sowie die Spezifität der verwendeten Antikörper getestet. Dieser Vorversuch entspricht in der Durchführung in etwa dem iCLIP Protokoll, wird jedoch ohne den finalen Schritt der Linker-Ligation, und sowohl mit als auch ohne UV-Crosslink, durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.33).

In Abbildung 47 A ist dargestellt, dass der UV-Crosslink zwischen Proteinen und RNA erfolgreich war. Mittels Co-Immunopräzipitation war es möglich das Exosom zu isolieren und durch Western-Blot

nachzuweisen (Abbildung 47 B). RNA, welche an das Exosom gebunden war, konnte allerdings nur erfolgreich zusammen mit exosomalen Proteinen nach UV-Crosslink co-immunopräzipitiert und im Anschluss radioaktiv markiert werden (Abbildung 47 A). Abbildung 47 A zeigt die Nitrocellulose-Membran auf einem Röntgenfilm exponiert. Zu sehen ist, dass nur die Spuren radioaktiv markierte RNA aufweisen, in welchen Elutionsfraktionen aufgetragen wurden, die einerseits aus Proben stammen, welche mit UV-Crosslink behandelt wurden und welche eine Co-Immunopräzipitation mittels Rrp4- und Rrp41-Antikörpern unterzogen wurden. Die RNA ist dabei über die gesamte Spur verteilt.

Die generell erfolgreiche Co-Immunopräzipitation des Exosoms ist in Abbildung 47 B dargestellt. Auch in Elutionsfraktionen, welche nicht mit UV-Crosslink behandelt wurden, ist die Untereinheit Rrp41 des Exosoms, mittels Rrp41-Antikörpern nachweisbar. Zum Vergleich des Molekulargewichtes wurde Rrp41-His₆ in der letzten Spur separat aufgetragen.

Sowohl Abbildung 47 A als auch Abbildung 47 B zeigen die Spezifität der verwendeten Antikörper auf Exosom-RNA-Komplexe: Der verwendete Thioredoxin-Antikörper (anti-trx), welcher zur Kontrolle mitgeführt wurde, weist auch bei Co-Immunopräzipitationsproben, welche dem vorherigen UV-Crosslink unterzogen wurden, keine (unspezifisch) gebundene RNA (Abbildung 47 A) oder Bindung der exosomalen Untereinheit Rrp41 (Abbildung 47 B) auf. In 47 B ist Rrp41 nur in den Proben nachweisbar, welche einer Co-Immunopräzipitation mittels Rrp4- und Rrp41-Antikörpern unterzogen wurden. Der Nachweis von Banden in einem molekularen Bereich von 40 kDa bis über 170 kDa, in Abbildung 47 B, in allen sechs Proben, ist darauf zurück zu führen, dass der verwendete Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Antikörper gereicht ist. Da auch die Antikörper der Co-Immunopräzipitation aus Kaninchen stammen und zusammen mit exosomalen Untereinheiten im SDS-PAA-Gel aufgetrennt wurden, detektiert der Sekundärantikörper auch diese Antikörper.

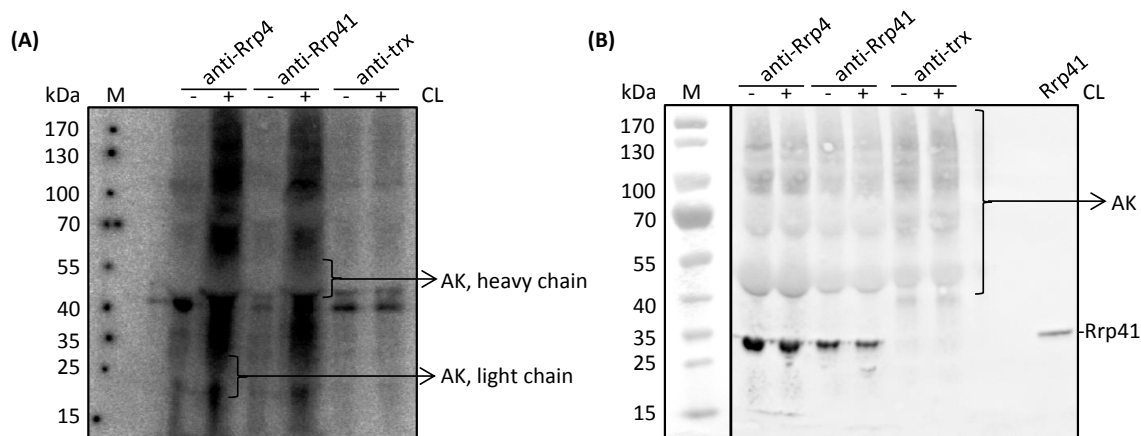


Abbildung 47. RNA-exosomale Proteinkomplexe, welche dem UV-Crosslink unterzogen wurden, wurden erfolgreich mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. (A) Gecrosslinkte (+ CL) RNA-exosomale Proteinkomplexe wurden, im Gegensatz zu nicht-gecrosslinkten (- CL) RNA-exosomal Proteinkomplexen, mittels Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die gebundene RNA wurde nach Co-Immunopräzipitation mittels γ -ATP³² radioaktiv markiert. Die Exposition der Nitrocellulose Membran erfolgte mittels Röntgenfilm. Die Kontrolle anti-trx zeigt, dass der Antikörper, welcher gegen Thioredoxin gerichtet ist, keine unspezifische Bindung an RNA von *S. solfataricus* besitzt. **(B)** Nachweis von Rrp41 mittels Rrp41-Antikörper nach Western Blot. Sowohl exosomale Proteinkomplexe, welche dem Crosslink (+ CL) unterzogen wurden, als auch nicht-gecrosslinkte (- CL) exosomale Proteinkomplexe wurden mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Rrp41 kann sowohl mit anti-Rrp4, also auch mit anti-Rrp41 mit und ohne vorherigen Crosslink präzipitiert werden. Rrp41 ist nicht im Western-Blot detektierbar, wenn trx für die vorangegangene Co-Immunopräzipitation verwendet wurde. Als Referenz diente mittels His₆-tag aufgereinigtes Rrp41 des Exosoms. Die Visualisierung erfolgte mittels Peroxidase Reaktion. AK, Antikörper; anti-Rrp4, Antikörper gegen die Untereinheit Rrp4 des Exosoms gerichtet; anti-Rrp41, Antikörper gegen die Untereinheit Rrp41 des Exosoms gerichtet; anti-trx, Antikörper gegen Thioredoxin gerichtet; CL, Crosslink; M, *prestained* Proteinmarker.

3.5.2 Wachstumskurve *S. solfataricus* und Experimentverlauf

Die Anzucht von *S. solfataricus* erfolgte im Fermenter. Nach 162 Stunden Wachstum wurde die Kultur geerntet, welche im Anschluss für zwei technische Replikate des Experiments verwendet wurde. Zum Zeitpunkt der Ernte befand sich die Kultur in stationärer Wachstumsphase, bei einer OD₆₀₀ nm von 0,7 (Abbildung 48).

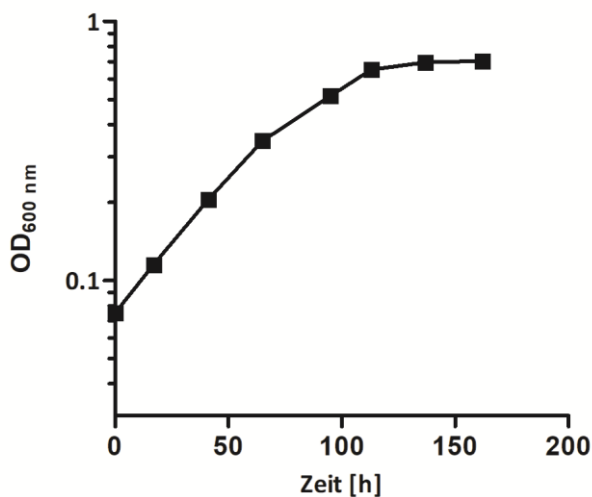


Abbildung 48. Wachstumskurve von *S. solfataricus*. Die Anzucht von *S. solfataricus* erfolgte im Fermenter bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,7. Nach 162 Stunden wurde die Kultur geerntet. Die Zellen wurden für das folgende Protokoll des iCLIP weiterverarbeitet.

Nachdem die Zellen geerntet wurden, wurden sie mittels $UV_{254\text{nm}}$ -Licht behandelt um Protein-RNA-Komplexe kovalent zu vernetzen. Die Zellen wurden nachfolgend aufgeschlossen und eine Co-Immunopräzipitation mittels Rrp4-, Rrp41- und trx-Antikörpern (als Kontrollantikörper gegen unspezifische Bindungen von RNA) durchgeführt. Während diesem Schritt kommt es zur gezielten Isolation von exosomalen Proteinkomplexen (anti-Rrp4, anti-Rrp41), an welche RNA durch den vorherigen UV-Crosslink, gebunden ist. Mittels P^{32} -ATP wurde die RNA im Anschluss radioaktiv markiert. Radioaktive RNA-Proteinkomplexe wurden mittels NU-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Nach dem Blotting wurde die Membran auf einem Röntgenfilm über Nacht exponiert. Der Röntgenfilm diente nachfolgend als Schablone um die RNA-Proteinkomplexe im folgenden Schritt blind auszuschneiden (siehe Abbildung 49). Die geschnittenen Membranstreifen wurden im Anschluss mittels Proteinase K behandelt um Proteine zu verdauen und dadurch die RNA zu isolieren. Dabei bleibt trotz des Verdaus der Proteine durch die Proteinase K die Aminosäure an die RNA gebunden und nachweisbar, welche mittels UV-Crosslink an die RNA kovalent vernetzt wurde. Die RNA wurde für das folgende Illumina-Sequenzierungsverfahren vorbereitet indem u.a. Arbeitsschritte der Linkerligation und RT-PCR stattfanden.

Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Kooperation durchgeführt: Die experimentelle Planung wurde von Dr. Lennart Weber, Dr. Oliver Rossbach und Dr. Christian Preußner vorgenommen. Vorexperimente und das Hauptexperiment wurden bis zum Punkt der Membranexposition von

Dr. Lennart Weber und mir durchgeführt. Die folgende Weiterverarbeitung der Membran und die entsprechende Behandlung der Proben durch Dr. Oliver Rossbach und Dr. Christian Preußner. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten unterlag Dr. Jochen Bathke. Zur Kartierung der *reads* diente das Genom von *S. solfataricus*.

Über die Sequenzierungsdaten lassen sich in nachfolgenden Kapiteln Rückschlüsse auf, an exosomale Proteine, gebundene RNA erzielen. Dabei wird durch die mitgeführten Kontrollantikörper die Spezifität der isolierten RNA sichergestellt.

Durch das blinde Ausschneiden der Membran, wobei der Röntgenfilm als Schablone diente, ist es zur Kreuzkontamination der Kontrollprobe 2 (K (2)) mit der Probe Rrp41 (1) gekommen (mündliche Mitteilung durch Dr. Oliver Rossbach). Sowohl die Anzahl der kartierten *reads* nach Erhalt der Sequenzierungsdaten (siehe Tabelle 82), als auch der Adenin-Gehalt der nicht kartierbaren *reads* (siehe Abbildung 50) ist eher mit den eigentlichen Proben vergleichbar als der zweiten Negativ-Kontrolle K (1).

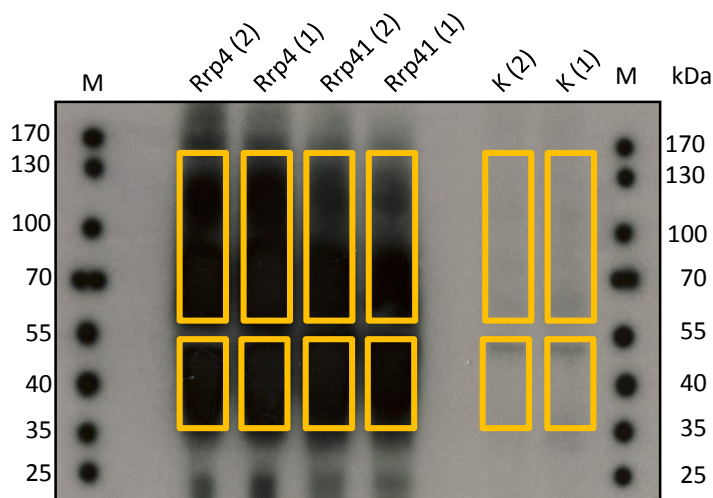


Abbildung 49. Schnittmuster der Nitrocellulose-Membran. Gezeigt ist die Nitrocellulose-Membran, aus welcher für spätere Sequenzierungen die Membran entsprechend der gelben Markierungen geschnitten wurde. Die Exposition der Nitrocellulose-Membran erfolgte zur Visualisierung mittels Röntgenfilm. Der Röntgenfilm diente im folgenden Schritt als Schablone für das blinde Ausschneiden der Proben aus der Nitrocellulose-Membran. Rrp4 (1), Rrp4-Antikörper, Replik 1; Rrp4 (2), Rrp4-Antikörper, Replik 2; Rrp41 (1), Rrp41-Antikörper, Replik 1; Rrp41 (2), Rrp41-Antikörper, Replik 2; K (1), trx-Antikörper, Replik 1; K (2), trx-Antikörper, Replik 2; M, *prestained* Proteinmarker. Antikörper wurden im Schritt der Co-Immunopräzipitation während des Protokolls des iCLIPs verwendet.

3.5.3 Sequenzierungsdaten - an das Genom von *S. solfataricus* kartierte reads

Die Sequenzierungsdaten wurden durch Jochen Bathke ausgewertet. Die Proben werden im Folgenden nach verwendetem Antikörper und technischem Replikat benannt:

BC1 (in den Originaldaten) / *rd*-Rrp4 (1): Rrp4-Antikörper, *reads* Replikat 1
 BC2 (in den Originaldaten) / *rd*-Rrp41 (1): Rrp41-Antikörper, *reads* Replikat 1
 BC3 (in den Originaldaten) / K (1): trx-Antikörper, Replikat 1; *reads* Kontrolle 1
 BC4 (in den Originaldaten) / *rd*-Rrp41 (2): BC4: Rrp4-Antikörper, *reads* Replikat 2
 BC5 (in den Originaldaten) / *rd*-Rrp41 (2): BC5: Rrp41-Antikörper, *reads* Replikat 2
 BC6 (in den Originaldaten) / K (2): BC6: trx-Antikörper, Replikat 2; *reads* Kontrolle 2

In nachfolgender Tabelle ist die Anzahl der *reads* aufgeführt, die an das Genom von *S. solfataricus* kartiert wurden, ohne PCR-Duplikate, aufgeführt:

Tabelle 82. Die Anzahl der *reads*, welche an das Genom von *S. solfataricus* kartiert werden konnten. PCR-Duplikate wurden nicht mit einbezogen. *rd*-Rrp4 (1), Rrp4-Antikörper, *reads* Replikat 1; *rd*-Rrp4 (2), Rrp4-Antikörper, *reads* Replikat 2; *rd*-Rrp41 (1), Rrp41-Antikörper, *reads* Replikat 1; *rd*-Rrp41 (2), Rrp41-Antikörper, *reads* Replikat 2; K (1), trx-Antikörper, *reads* Replikat 1; K (2), trx-Antikörper, *reads* Replikat 2

Probe	Kartierte <i>reads</i>
<i>rd</i> -Rrp4 (1)	1 684 835
<i>rd</i> -Rrp4 (2)	2 036 678
<i>rd</i> -Rrp41 (1)	560 534
<i>rd</i> -Rrp41 (2)	1 095 407
K (1)	5 823
K (2)	83 361

Wie bereits im Vorexperiment in Kapitel 3.5.1.1 gezeigt werden konnte, bindet der Rrp4-Antikörper mit besserer Effizienz Proteine als der Rrp41-Antikörper. Dies ist auch in der Anzahl der kartierten *reads* wiedergespiegelt, da die Proben aus den beiden technischen Duplikaten des Rrp4-Antikörpers höhere Werte zeigten als unter Verwendung des Rrp41-Antikörpers (siehe Tabelle 82). Die *reads* der Probe des Thioedoxin-Kontroll-Antikörpers (K (1)) zeigen dagegen eine wesentlich geringere Anzahl von kartierten *reads* an das Genom von *S. solfataricus* auf als die *reads* aus den beiden Proben mit spezifischen, gegen exosomale Untereinheiten gerichteten Antikörpern Rrp4 und Rrp41. In der zweiten Kontrollprobe K (2) waren 83 361 *reads*, wohingegen in der ersten Kontrollprobe K (1) nur 5 823 *reads* waren. Ursache für die höhere Anzahl von *reads* in K (2) ist vermutlich eine Kreuzkontamination (siehe Abbildung 49) mit der Probe *rd*-Rrp41 (1).

3.5.4 Nicht kartierte *reads* weisen einen hohen Adenin-Anteil auf

Das Exosom ist ein Proteinkomplex, welcher einerseits in der Lage ist, RNA als 3'-5'-Exoribonuklease zu degradieren, andererseits jedoch auch RNA prozessieren kann, indem das 3'-Ende der RNA mit Adeninen, heteropolymerischen *tails* polynukleotidyliert wird [120, 136]. Diese *tails* sind nicht im Genom von *S. solfataricus* kodiert, wodurch sie in den Sequenzierungsdaten des iCLIP nicht an das Genom von *S. solfataricus* kartiert werden können und aufgrund dessen dem Teil der bioinformatischen Daten zugeordnet werden, welche als "nicht kartierbar" deklariert sind. Um *tails* in den Sequenzierungsdaten des iCLIP nachzuweisen, wurden die nicht kartierten Bereiche auf den Adenin-Anteil hin prozentual untersucht (durchgeführt von Jochen Bathke). Dabei stellte sich heraus, dass der Adenin-Anteil in allen Proben, in welchen gegen Rrp4- oder Rrp41-gerichtete Antikörper verwendet wurden, über 73% lag. Am zweithäufigsten nachgewiesen werden konnte Guanin, gefolgt von Cytosin und Thymin bzw. Uracil (Abbildung 50). In Kontrollprobe (K (1)) waren die Anteile von Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil jedoch deutlich höher, der Adenin-Anteil lag nur bei 43%. Die zweite Thioredoxin-Kontrollprobe, K (2), wies mit 77% allerdings, wie die Proben *rd*-Rrp4 (1), *rd*-Rrp4 (2), *rd*-Rrp41 (1), *rd*-Rrp41 (2), einen sehr stark erhöhten Adenin-Anteil auf. Ursache dessen ist wahrscheinlich in der Probenvorbereitung (siehe Abbildung 49).

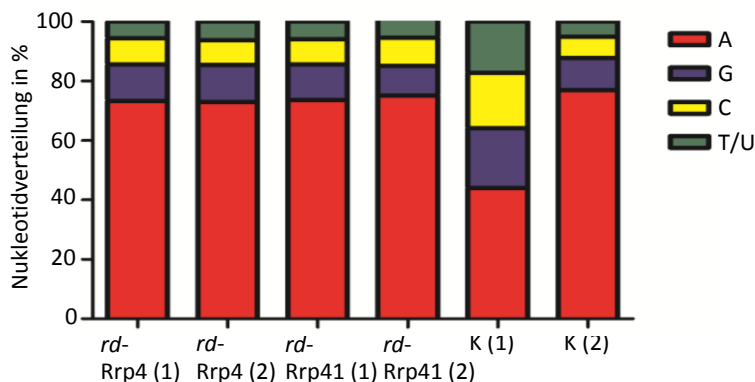


Abbildung 50. Adenin ist das häufigste Nukleotid der 3' Anhänge von RNA, wenn Rrp4- und Rrp41-Antikörper für die Co-Immunopräzipitation verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte aus iCLIP-reads, welche nicht gegen das vollständige Genom von *S. solfataricus* kartiert werden konnten. Gezeigt ist ein Balkendiagramm welches die Verteilung der Nukleotide in den 3' Anhängen von RNA darstellt. Adenin (A) ist das häufigste Nukleotid (ca. 75%), gefolgt von Guanin (G), Cytosin (C) und Uracil (U) bzw. Thymin (T) der RNA in den Proben der Rrp4- und Rrp41-Antikörper. Die Nukleotidverteilung der Kontrollprobe BC6 zeigt eine gleichmäßigere Verteilung der Nukleotide der 3' Anhänge der RNA. Pro Antikörper sind zwei biologische Replikate dargestellt. *rd*-Rrp4 (1), Rrp4-Antikörper, *reads* Replikat 1; *rd*-Rrp4 (2), Rrp4-Antikörper, *reads* Replikat 2; *rd*-Rrp41 (1), Rrp41-Antikörper, *reads* Replikat 1; *rd*-Rrp41 (2), Rrp41-Antikörper, *reads* Replikat 2; K (1), trx-Antikörper, *reads* Replikat 1; K (2), trx-Antikörper, *reads* Replikat 2

Die Proben wurden des Weiteren auf die Nukleotidverteilung bezogen auf die Basenposition im 3' *tail* untersucht (Abbildung Anhang S1). In allen Proben, *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2) ist dabei ersichtlich, dass Adenin das Nukleotid mit der höchsten Abundanz in den nicht kartierbaren *reads* ist. Dabei ist der prozentuale Anteil von Adenin am höchsten je kürzer der *read* bzw. *tail* ist. Bei späteren Positionen im *read* nimmt aufgrund der geringeren Anzahl auswertbarer Nukleotide das statistische Rauschen zu. Auch hier ist in der zweiten Kontrolle (K (2)) ein ähnliches Verhalten wie für die Proben *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2) ersichtlich. In der ersten Kontrolle (K (1)) hingegen sind die Nukleotide nahezu gleichverteilt.

3.5.5 Das Exosom bindet zirkuläre RNA

In den Sequenzierungsdaten des iCLIP konnten zirkuläre RNAs nachgewiesen werden (durchgeführt durch Jochen Bathke). Den größten Anteil machte dabei die zirkuläre 16S rRNA aus, ein Produkt welches bei der Reifung von prä-16S rRNA zu reifer 16S rRNA entsteht. Durch endonukleolytische Schnitte wird dabei ein *spacer* aus der prä-16S rRNA herausgeschnitten, welcher im Anschluss ligiert wird [183]. Zirkuläre RNAs sind in Archaea bekannt, vor allem als Intermediate der Prozessierung von rRNAs und Introns von tRNAs. Jedoch sind auch kleine, nicht codierende RNAs sowie C/D box RNAs unter diesen zu finden [183, 184]. In Tabelle 83 sind die, durch den iCLIP identifizierten zirkulären RNAs aufgelistet. Die Liste umfasst bereits bekannte zirkuläre RNAs sowie neue zirkuläre RNA-Kandidaten. Im Anhang, in Tabelle S2, sind die Rohdaten aller potentiellen zirkulären RNAs aufgelistet, darunter auch Kandidaten, welche jedoch aufgrund unscharfer Peaks oder zu geringer *read*-Anzahlen als unsicher in dieser Arbeit eingestuft wurden und deswegen nicht in die Tabelle 83 aufgenommen wurden.

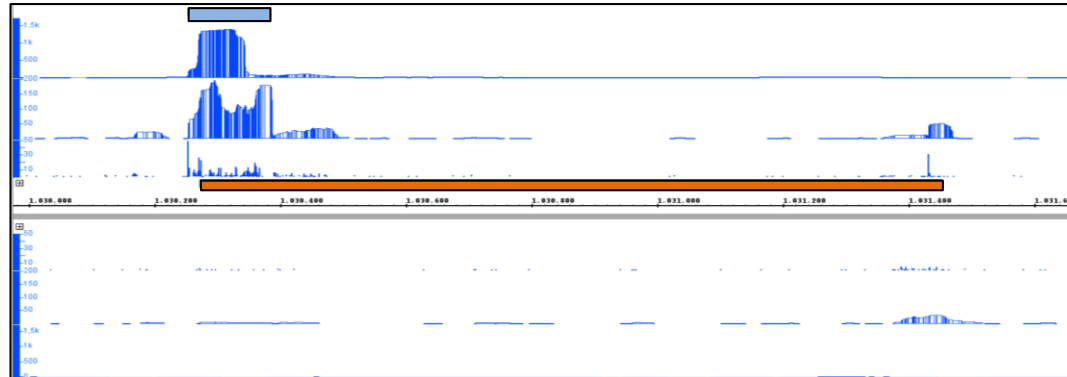
Tabelle 83. Zirkuläre RNAs, welche in den iCLIP-Sequenzierungsdaten identifiziert werden konnten. Angegeben sind Start- und Endpositionen von bekannten zirkulären RNAs und potentiellen zirkulären RNA-Kandidaten. Zudem ist die Anzahl der *reads* angegeben. Die identifizierten zirkulären RNAs in den vier Proben *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2) wurden zusammengefasst und nach Position auf *forward* oder *reverse* Strang aufgesplittet.

Zirkuläre RNA	Start	Ende	<i>reads</i>
<i>Plus Strang</i>			
16S rRNA	871659	873217	15 650
Neuer Kandidat - Überlappender Bereich des Endes der 16S rRNA und dem Anfang der 23S rRNA; unscharfe Peaks	872274	873710	ca. 320
23S rRNA	873335	876430	290
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	873492	873710	ca. 250
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	874180	874277	ca. 30
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS05855, Scharfe Peaks	1030271	1030386	ca. 90
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS06560, Scharfe Peaks	1177035	1177149	ca. 60
Neuer Kandidat der 23S rRNA, unscharfe Peaks	875529	875746	12
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	874005	874275	ca. 20
<i>Minus Strang</i>			
Intron der tRNA ^{Trp}	72769	72833	21
Neuer Kandidat - S-Methyl-5-Thioribose-1-Phosphate Isomerase, nur wenig <i>reads</i>	2721567	2721446	5
Neuer Kandidat - FAD-binding Oxidoreduktase, nur wenig <i>reads</i>	1987559	1988310	5

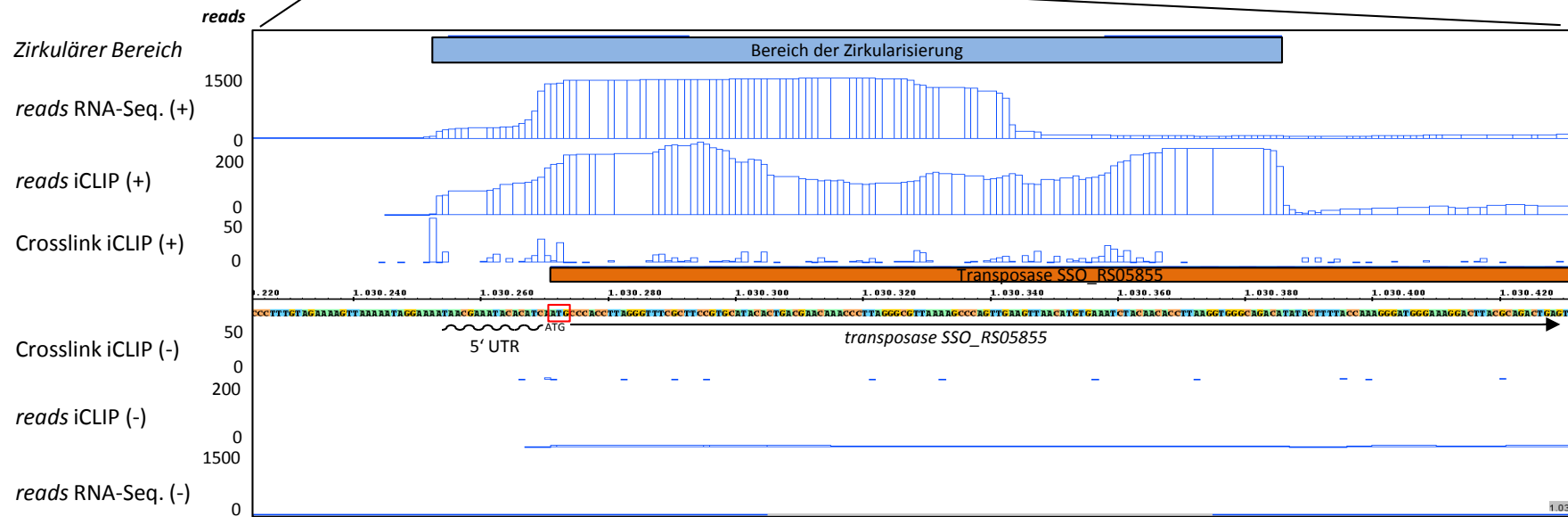
Neben bereits bekannten zirkulären RNAs sind auch bisher noch unbeschriebene zirkuläre RNA-Kandidaten aufgelistet, u. a. die zirkuläre RNA der Transposasen SSO_RS05855 und SSO_RS06560. Beide RNAs weisen 95% Sequenzidentität auf [185]. In Abbildung 51 sind ihre Genorte mittels IGB (*Integrated Genome Browser*) dargestellt.

(A)

Überblick Genbereich der Transposase SSO_RS05855 von Position 1 030 270 – 1 030 384

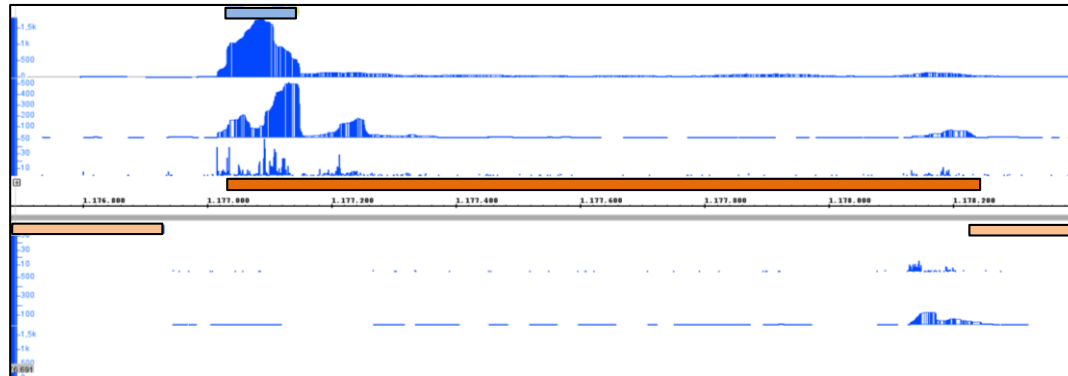


Vergrößerung des Zirkularisierungsbereiches



(B)

Überblick Genbereich der Transposase SSO_RS06560 von Position 1 177 035 – 1 177 149



Vergrößerung des Zirkularisierungsbereiches

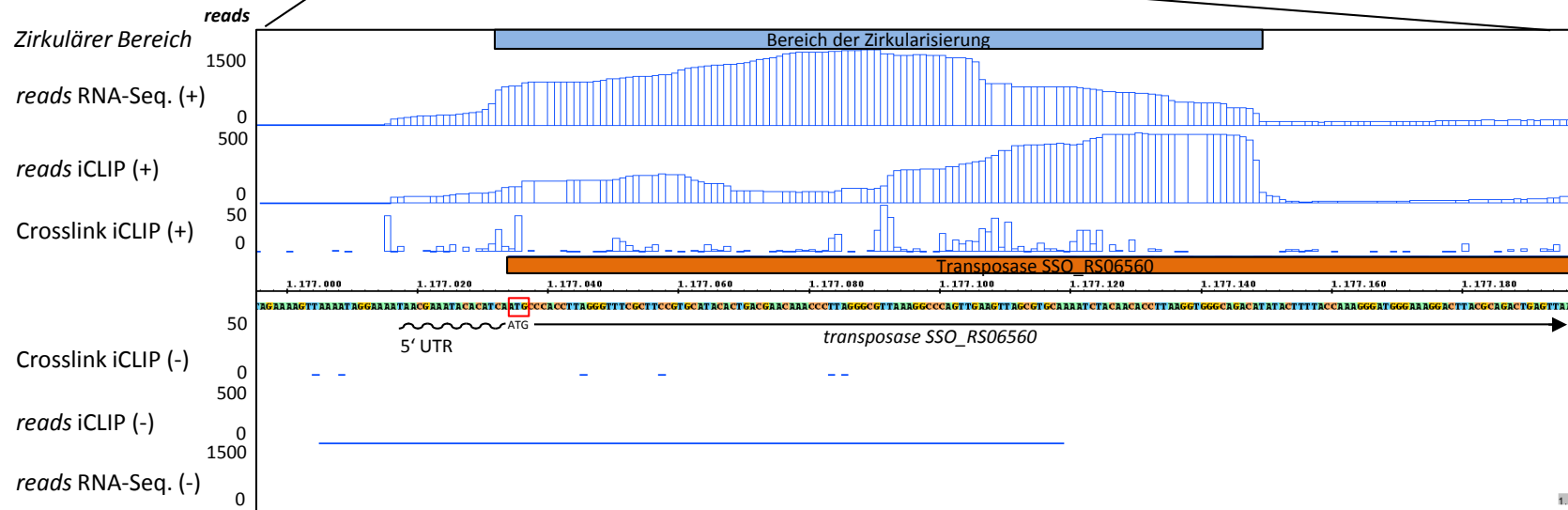


Abbildung 51. Darstellung des genetischen Bereiches der Transposase SSO_RS05855 (A) und der Transposase SSO_RS06560 (B). Die Position des Genortes ist in bp angegeben. Neben einem Gesamtüberblick über das vollständige Transkript der beiden Transposasen ist im Detail der Bereich des Transkriptes, welcher der Zirkularisierung unterliegt hervorgehoben. Es sind sowohl die Peakhöhen von Crosslinks, der *reads* im iCLIP und die *reads* in der RNA-Sequenzierung sind links der Abbildung zu entnehmen. Als zirkularer Bereich bezeichnet sind die nachgewiesenen zirkulären Sequenzen (hellblaue Balken) hervorgehoben. In orangen Balken ist das Gesamtgen dargestellt. In hellorange (B) die angrenzenden Gene. Das Startcodon ATG ist in einer roten Box hervorgehoben. Zudem ist die 5' UTR der Abbildung zu entnehmen. Die Abbildungen wurden mittels IGB-Software erstellt.

Aus Abbildung 51 ist zu entnehmen, dass der *open reading frame* der Transposase SSO_RS05855 1185 bp (Abbildung 52 A) und der *open reading frame* der Transposase SSO_RS06560 1212 bp (Abbildung 52 B) lang ist. Der zirkuläre Bereich umfasst nicht gesamten *open reading frame*, sondern nur die ersten 115 bp des 5' Endes der mRNA der Transposasen. Der 5' UTR ist nicht Bestandteil der zirkulären RNA. Innerhalb der entstehenden zirkulären RNA der Transposase SSO_RS05855 ist ein ATG vorzufinden, welches potenziell als Startcodon eines 18 AS langen Peptides (**Met P T L G F R F R A Y T D E Q T L R**) dienen könnte.

Für ihre Verifizierung als zirkuläre RNAs wurde *Sulfolobus solfataricus* bis zur stationären Wachstumsphase, mit einer OD_{600nm} 0.75, vergleichbar der des Hauptversuches des iCLIP, angezogen. Die Zellen wurden geerntet und Gesamt-RNA mittels TRIzol isoliert (siehe Kapitel 2.3.29.2). Mittels Primern, welche zueinander entgegengesetzt gerichtet sind, und entsprechend nur bei einer Zirkularisierung der RNA ein PCR-Produkt liefern können (Abbildung 52 A), wurde eine semiquantitative RT-PCR auf die isolierte Gesamt-RNA durchgeführt.

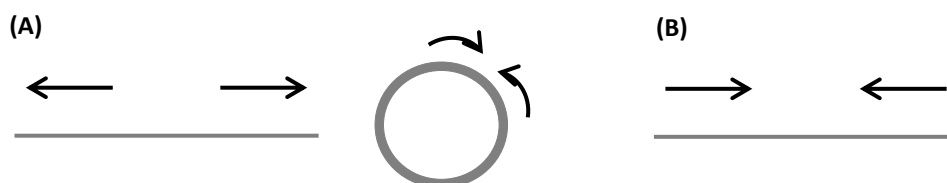
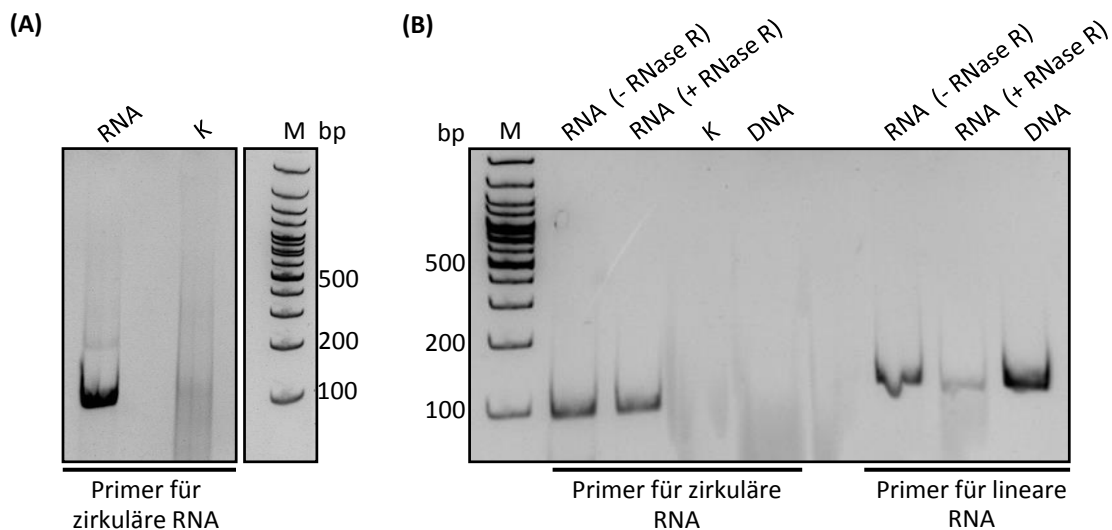


Abbildung 52. Schematische Illustration des Designs für RT-PCR Primer, welche gegen zirkuläre RNA-Produkte (A) oder lineare RNA-Produkte (B) gerichtet sind. Kreise illustrieren zirkuläre RNA, Linien illustrieren lineare RNA. Pfeile illustrieren die Laufrichtung der Primer.

In Abbildung 53 A und 53 C ist zu sehen, dass PCR-Produkte mittels den zirkulären Primern entstehen konnten, was darauf hindeutet, dass zirkuläre RNA vorliegt. In Abbildung 53 C sind zudem mehrere

PCR-Produkte ersichtlich, welche markerähnlich im 10%-igen TBE-PAA-Gel aufgetrennt wurden. Dies deutet auf eine Produktion von cDNA nach dem "rolling circle" Mechanismus hin, in welchem die Reverse Transkriptase aufgrund der Zirkularität der RNA diese mehrmals nacheinander revers transkribieren kann. Um eine vollständige Verifikation der zirkulären RNAs zu gewährleisten, wurde die RT-PCR wiederholt, wobei im Vorfeld ein Verdau der Gesamt-RNA mit RNase R durchgeführt wurde (Abbildung 53 B und 53 D). RNase R verdaut lineare ssRNA, aber keine zirkuläre RNA, mit der Folge, dass zirkuläre RNAs angereichert werden. Zusätzlich wurde diese, zweite RT-PCR mit Primern durchgeführt, welche nur PCR-Produkte liefern, wenn lineare RNA vorliegt (Abbildung 52 B). Wenn Primer für zirkuläre RNA genutzt wurden, konnten PCR-Produkte entstehen, unabhängig davon, ob die verwendete RNA einer RNase R Behandlung unterzogen wurde oder nicht. Wurden dagegen Primer für lineare PCR-Produkte eingesetzt, war die entstandene Menge an PCR-Produkten nach RNase R Behandlung geringer, als ohne RNase R Behandlung (Abbildung 53 B und 53 D). Die PCR-Produkte, welche unter Verwendung der Primer für lineare RNA als auch mit Primern für zirkuläre RNA entstehen, weisen eine Größe von ca. 100 bp auf, was mit der erwarteten Größe von 115 bp übereinstimmt.

Transposase SSO_RS05855



Transposase SSO_RS06560

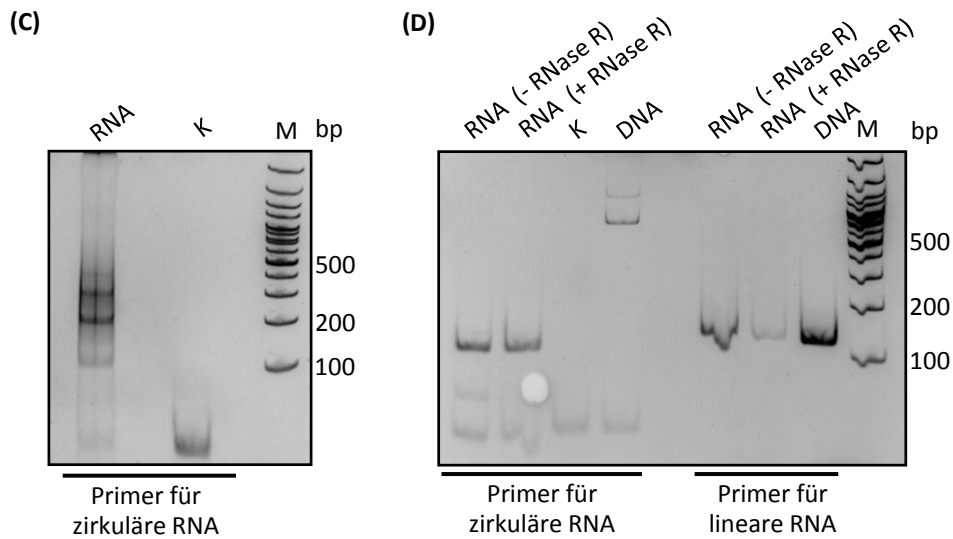


Abbildung 53. Nachweis zirkulärer RNA der Transposase SSO_RS05855 (A, B) und der Transposase SSO_RS06560 (C, D) mittels semiquantitativer RT-PCR. Für die RT-PCR-Reaktion wurden 100 ng Gesamt-RNA von *S. solfataricus* (stationäre Wachstumsphase) genutzt. PCR-Produkte sind im 10% -igen TBE-PAA-Gel aufgetrennt. **(A)** und **(C)**: Genutzt wurden Primer, welche gegen zirkuläre RNAs gerichtet waren. **(B)** und **(D)**: Gesamt-RNA wurde genutzt, welche mit (+) oder ohne (-) RNase R behandelt wurde. Als Positivkontrolle der Funktionalität der RT-PCR diente 100 ng chromosomale DNA von *S. solfataricus* als Positivkontrolle. Es wurden Primer sowohl gegen zirkuläre als auch gegen lineare RNA verwendet. K, Kontrollreaktionsansatz mit Zugabe von H₂O anstelle von RNA; DNA, Positivkontrolle; M, 100 bp PlusPageRuler.

PCR-Produkte, welche mit Primern für zirkuläre RNA entstanden, wurden im Anschluss in das pJET-Vektorensystem kloniert, in *E. coli* JM109 transformiert und Klone für die Sequenzierung gepickt. Die Sequenzierungsreaktion ergab Sequenzen welche sich wie folgend von den iCLIP-Sequenzierungsdaten unterschieden (Abbildung 54): Die Sequenz der RNA, welche mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte, weist im Vergleich zu den iCLIP-Sequenzierungsdaten einen 15 bp langen deletieren Bereich auf. Dieser lag zwischen zwei kurzen repetiven Sequenzen, welche bei beiden Transposasen die Sequenz „CACCTTAAGG“ und „CACCTTAGG“ hatten. Innerhalb dieser 15 bp ist die ursprüngliche Zirkularisierungsstelle der RNA zu finden. Zusätzlich kam es im Fall der Transposase SSO_RS05855 zu vereinzelt Basensubstitutionen.

identisch, zudem ergab der Blast gegen das Chromosom von *S. solfataricus* P2 13 gefundene Sequenzen. Dabei auch beide Sequenzen der Transposasen (Abbildung 55). Die Sequenzen zeigen eine Identität von mindestens 91% zueinander.

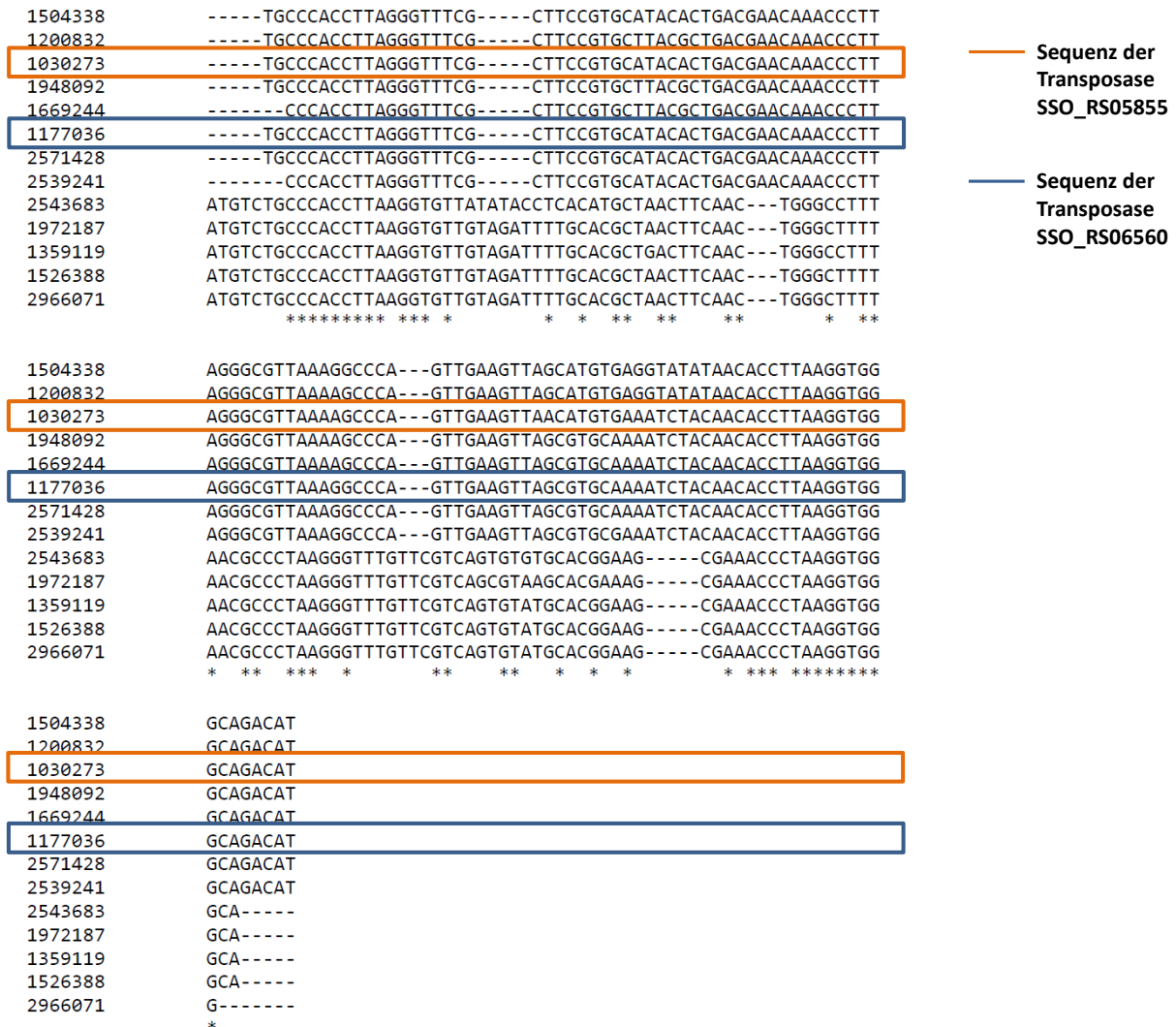


Abbildung 55. Nukleotid-Alignment der zirkularisierten RNAs der Transposasen SSO_RS05855 (orange Box) und SSO_RS06560 (blaue Box). Die Sequenz der Transposasen von 115 bp (späterer zirkularisierter Bereich) wurde gegen das Chromosom von *S. solfataricus* P2 geblastet. Insgesamt konnten 13 Sequenzbereiche identifiziert werden, welche mindestens zu 91% identisch zueinander sind. Sterne induzieren Nukleotide, welcher in jeder der Sequenzen an identischer Position übereinstimmen. Die Sequenzen sind nach der Position im Chromosom von *S. solfataricus* des ersten Nukleotides der Sequenz benannt. Das Alignment wurde mittels ClustalW2 Server erstellt.

Ein Blast der zirkularisierten, deletierten 25-mer Sequenz der Transposase SSO_RS05855 ergab 13 Treffer im Genom von *S. solfataricus*, jedoch nur die ersten 20 Nukleotide (Teil A Abbildung 54 A) der Sequenz. Die letzten 5 Nukleotide (Teil B Abbildung 54 A) wurden nicht zusammen mit den ersten 20 Nukleotiden gefunden, was für die Zirkularisierung und Ligation an entsprechender Stelle spricht. Entsprechendes trifft auf den Blast der zirkularisierten, deletierten 25-mer Sequenz der Transposase

SSO_RS06560 zu, welcher 13 Treffer im Genom von *S. solfataricus* ergab. Auch hier wurden jedoch nur die ersten 14 Nukleotide (Teil A Abbildung 54 B) der Sequenz gefunden. Die letzten 11 Nukleotide (Teil B Abbildung 54 B) wurden nicht zusammen mit den ersten 14 Nukleotiden gefunden, wodurch auch hier die Hypothese für die Zirkularisierung und Ligation an entsprechender Stelle verstärkt wird.

3.5.6 Das Exosom bindet spezifisch RNA

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob das Exosom in der Lage ist RNA anzureichern. Deshalb wurde eine zusätzliche RNA-Transkriptomanalyse von *Sulfolobus solfataricus* durchgeführt und diese mit der iCLIP-Sequenzierung verglichen. Für die Transkriptomanalyse wurde *S. solfataricus* bis zur stationären Wachstumsphase, mit einer OD_{600nm} 0.74, vergleichbar der des Hauptversuches des iCLIP, angezogen. Gesamt-RNA wurde mittels Hot-Phenol-Methode isoliert und, nach erfolgreichem DNase-Verdau, sequenziert (Illumina-Verfahren). Die Auswertung der Sequenzierungsdaten wurde durch Jochen Bathke vorgenommen. Die Kartierungs-Rate der Daten lag bei 95%.

Die Anzahl der *reads* der Transkriptomdaten wurde mit der Anzahl der *reads* der iCLIP-Sequenzierungsdaten verglichen (durchgeführt von Jochen Bathke). Transkripte, welche im iCLIP mindestens 10 *reads* aufwiesen ($iCLIP > 10$) und dabei aber mindestens doppelt so häufig vorkamen wie in der Transkriptomanalyse ($RNA-Seq \leq 2 * iCLIP \text{ reads}$), wurden als "am Exosom angereichert" definiert. Die Eingrenzungen wurden willkürlich gewählt (mündliche Aussage von Jochen Bathke). Transkripte, welche als angereichert definiert wurden, zeigen hohe Peaks in Sequenzierungsdaten des iCLIP, jedoch geringe Peakhöhen in der Transkriptomanalyse. Diese Transkripte sollten vom Exosom besser gebunden werden als Transkripte, welcher dieser Definition nicht unterliegen. Als "nicht angereichert" zählen Transkripte, welche hohe Peaks in Transkriptomdaten zeigen, jedoch wenige *reads* in den iCLIP-Sequenzierungsdaten aufweisen.

In Abbildung 56 sind die angereicherten RNAs graphisch dargestellt. Dabei gab es sowohl angereicherte Transkripte mit nur einer Crosslink-Position, als auch angereicherte Transkripte mit mehr als einer Crosslink-Position. Die Crosslink-Position ist dabei das Nukleotid der RNA, welches mit dem Exosom während des Experimentes durch UV-Crosslink quervernetzt wurde. Für weitere Analysen zur Verifikation der angereicherten RNA, wurden nur Transkripte in die engere Wahl genommen, welche mindestens 5-fach im iCLIP, verglichen mit den Sequenzierungsdaten, angereichert waren und mindestens drei Crosslink-Positionen aufwiesen. In Tabelle S3 im Anhang sind die Rohdaten für Abbildung 56 aufgeführt.

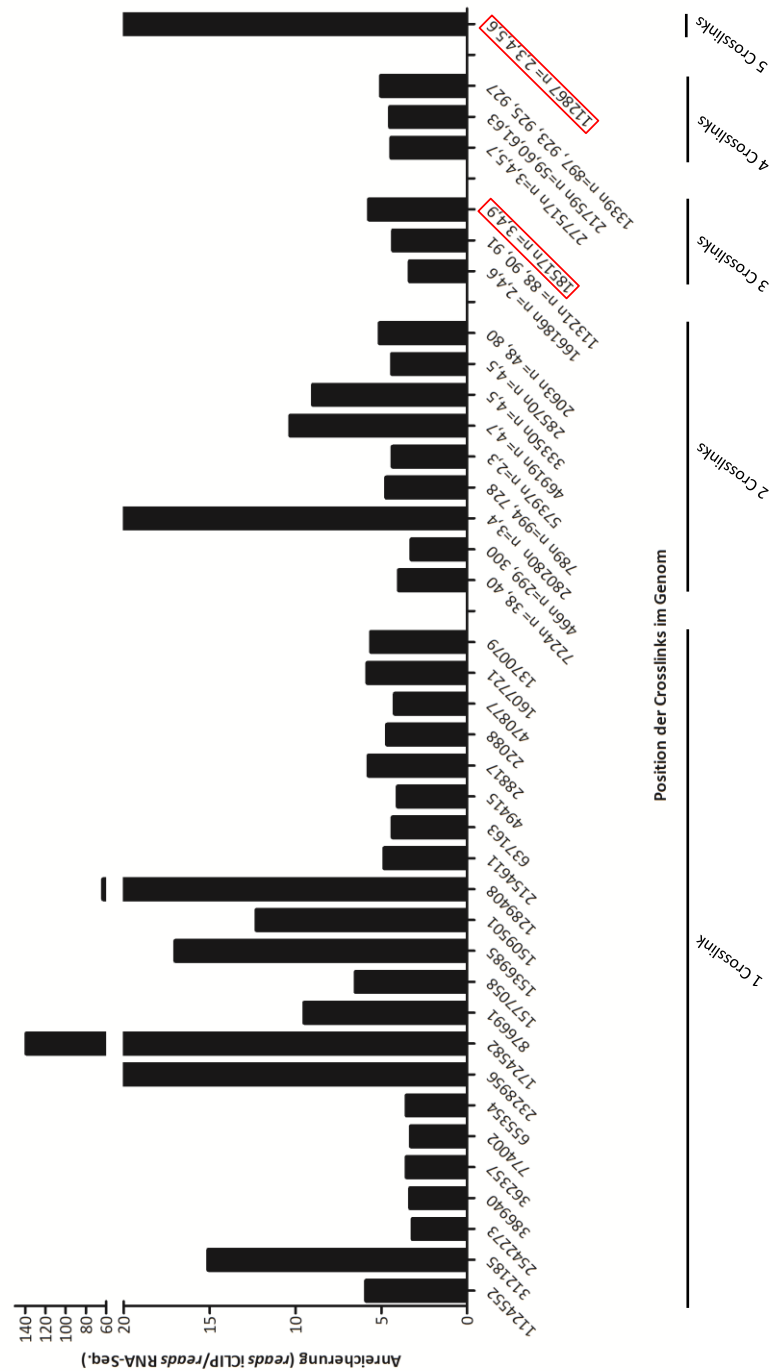


Abbildung 56. Das Exosom von *S. solfataricus* bindet spezifisch RNA. Dargestellt ist die Position von Crosslinks (X-Achse) von Transkripten aus dem Genom von *S. solfataricus*, welche im Vergleich von den *reads* im iCLIP und *reads* der Transkriptomanalyse als "angereicherte RNA am Exosom" nachgewiesen werden konnten. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der *kartierten reads* im iCLIP, im Verhältnis zur Anzahl *kartierter reads* aus der Transkriptom-Sequenzierung aufgetragen. Transkripte, welche im iCLIP mindestens 10 *reads* aufwiesen (iCLIP > 10) und dabei aber mindestens doppelt so häufig vorkamen wie in der Transkriptomanalyse (RNA-Seq $\leq 2 \cdot$ iCLIP *reads*), wurden als "am Exosom angereichert" definiert. Die angereicherten Transkripte wurden entsprechend der Anzahl der Crosslink-Positionen (1, 2, 3, 4 oder 5) gruppiert. Rot umrandet sind Transkripte hervorgehoben, die für weiterführende Experimente genutzt wurden. n, spezifische Nukleotidangabe der Crosslinkposition innerhalb des Transkriptes (z.B. 185 17n, n = 3,4,9 zeigt drei Crosslink Positionen an Position 185 173, 185174 und 185 179 im Genom an). Die Auswertung der bioinformatischen Daten erfolgte durch Jochen Bathke.

Zusätzlich sind in Tabelle 84 für die „angereicherten RNAs“ die erzielten *reads* in der RNA-Sequenzierung ersichtlich. Für die bereits erwähnten, Analysen zur Verifikation der angereicherten RNA, sollten die gewählten angereicherten Transkripte zudem auch ausreichend *reads* in den RNA-Sequenzierungsdaten aufweisen. Damit ist sichergestellt, dass das Transkript hinreichend abundant im Transkriptom von *S. solfataricus* ist und dass besonders hohe Werte (erhöhte Gefahr von statistischen Ausreißern), welche für die Anreicherung berechnet wurden, ausgegliedert wurden. Besonders hohe Werte entstehen, wenn die *reads* in den RNA-Sequenzierungsdaten zu gering oder nicht vorhanden waren, wie beispielsweise für das Transkript 1 289 408 und das Transkript 1 724 582. Für weiterführende Analysen sollten die angereicherten Transkripte mindestens 50, jedoch unter 200 *reads* in der RNA-Sequenzierung aufzeigen.

Tabelle 84. Readanzahl von angereicherten Transkripten von *S. solfataricus*. Aufgelistet sind die erzielten *reads* in der RNA-Sequenzierung der vom Exosom angereicherten Transkripten aus dem Genom von *S. solfataricus*. Die Transkripte wurden nach der Peakhöhe (Anzahl der erreichten *reads*) gruppiert. Grau hervorgehoben sind die Transkripte, die für weiterführende Experimente genutzt wurden. n, spezifische Nukleotidangabe der Crosslinkposition innerhalb des Transkriptes (z.B. 185 17n, n = 3,4,9 zeigt drei Crosslink Positionen an Position 185 173, 185174 und 185 179 im Genom an).

Angereicherte RNA	<i>reads</i> in der RNA-Sequenzierung
<50 <i>reads</i>	
2328956	0
1724582	0
1289408	1
1536985	4
280280n n=3,4	4
1577058	8
1124552	9
1370079	10
1509501	11
1607721	11
312185	12
22088	12
655354	15
2542273	16
876691	20
46919n n= 4,7	21
2063n n= 48, 80	24
637163	29
28817	32
386940	34
470877	37
	45

49415	47
466n n= 299, 300	
<i>50 – 100 reads</i>	
11321n n= 88, 90, 91	56
362357	73
57397n n=2,3	75
7224n n= 38, 40	85
18517n n= 3,4,9	99
<i>101 – 150 reads</i>	
33350n n= 4,5	116
21759n n=59,60,61,63	138
277517n n=3,4,5,7	142
2154611	145
<i>151 – 200 reads</i>	
166186n n= 2,4,6	158
112867 n= 2,3,4,5,6	174
<i>> 200 reads</i>	
1339n n= 897, 923, 925, 927	235
774002	304
789n n=994, 728	408
28570n n= 4,5	473

Die beiden Transkripte, welche in Abbildung 56 rot umrandet und in Tabelle 84 grau hervorgehoben sind, wurden gewählt um experimentell als „am Exosom angereichert“ verifiziert zu werden. Beide Kandidaten waren mindestens 5-fach im iCLIP, verglichen mit den RNA-Sequenzierungsdaten, angereichert und wiesen zudem mindestens 3 Crosslink-Positionen auf. Die Kandidaten waren (i) die *antisense* RNA zur tRNA^{Ser}, mit den Crosslink-Positionen in 185 173, 185 174 und 185 179. Das Transkript wird in folgendem als *antisense* tRNA^{Ser} bezeichnet (Abbildung 57) und (ii) ein Transkript, welches im intergenischen Bereich lokalisiert liegt und die Crosslink-Positionen 1 128 672, 1 128 673, 1 128 674, 1 128 675 und 1 128 676 aufweist. Das Transkript weist zudem einen Poly(A)-*stretch* auf und wird in folgendem als 1 128 672 bezeichnet. Leider erwies sich für folgende Experimente das Transkript 1 128 672 als technisch schwierig zu amplifizieren (Abbildung 58), da die Gesamtlänge des Transkriptes nur 58 bp aufwies. Deswegen wurde sich für weitere Untersuchungen zunächst nur auf die *antisense* tRNA^{Ser} konzentriert.

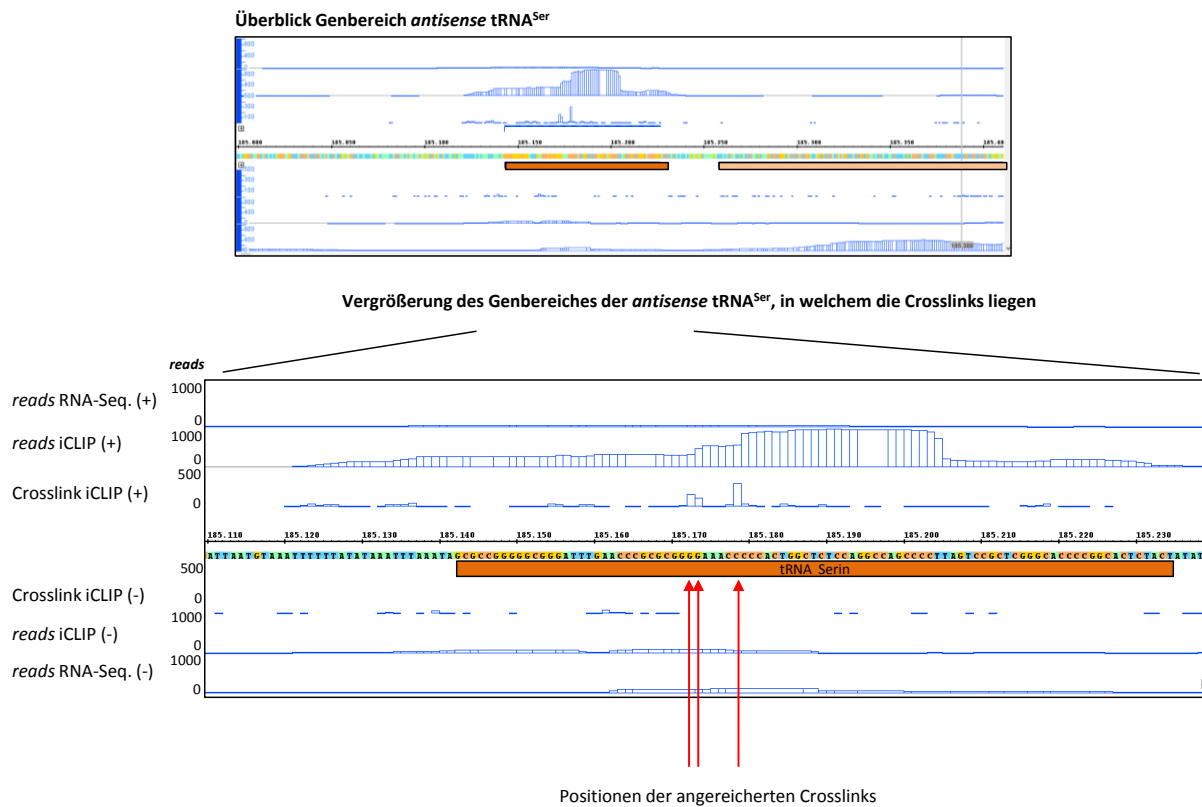


Abbildung 57. Darstellung des genetischen Bereiches des am Exosom angereicherten Transkriptes der *antisense tRNA^{Ser}*. Es sind Crosslinks in den Positionen 185 173, 185 174 und 185 179 vorhanden. Die *tRNA^{Ser}* liegt auf dem Minus-Strang, die am Exosom angereicherte RNA (*antisense tRNA^{Ser}*) liegt jedoch auf dem Plus-Strang. Die Position ist in bp angegeben. Neben einem Gesamtüberblick über das vollständige Transkript, ist ebenso ein Detailbereiches des Transkriptes hervorgehoben. Es sind sowohl die Peakhöhen von Crosslinks, der *reads* im iCLIP und die *reads* in der RNA-Sequenzierung dargestellt. Die Positionen der als angereichert bezeichneten Crosslinks sind mittels roten Pfeilen markiert. Der genetische Bereich der *antisense tRNA^{Ser}* und der *tRNA^{Ser}* sind mittels dunkelorange Balken dargestellt. Angrenzende Gene sind mittels hellorange Balken illustriert. Die Abbildungen wurden mittels IGB-Software erstellt.

bleiben. Als Kontrolle und zum Vergleich wurde ein identisch designter RNA-Protein-EMSA durchgeführt, in welchem das angereicherte Transkript sowohl als radioaktiv markiertes Substrat als auch als kalter Kompetitor eingesetzt wurde.

In den EMSA-Analysen wurde 2 pmol Rrp4-Csl4-Exosom eingesetzt. Als angereichertes Substrat wurde die *antisense* tRNA^{Ser} verwendet. Das *in vitro* Transkript ist 114 bp lang und weist einen Adenin-Anteil von 21,9% auf. Radioaktiv markiert (intern, mittels α -UTP) wurde, mittels *in vitro* Transkription, eines der "nicht angereicherten Transkripte". Bei dem ausgewählten *in vitro* Transkript handelt es sich um 100 bp des Genes *tmoA* (toluene-4-monooxygenase system protein A). Die Gesamtlänge von *tmoA* beträgt 806 bp von Position 1 065 792 – 1 066 598. Das 100 bp lange *in vitro* Transkript liegt in der Position von 1 066 436 – 1 066 536 von *tmoA* und erzielte in den Transkriptomdaten eine Peakhöhe von ca. 3 500 *reads*, in den Sequenzierungsdaten des iCLIP jedoch nur ca. 25 *reads*. Zur vereinfachten Darstellung werden die 100 bp *in vitro* Transkript im Folgenden als *tmoA* benannt. *tmoA* konnte nur 1 Mal gegen das Genom von *S. solfataricus* geblastet werden und weist eine gleichmäßige Verteilung der Nukleotide, mit einem Adenin-Anteil von 33% auf. Die Genorte von *tmoA* und der *antisense* tRNA^{Ser} sind in Abbildung 59 ersichtlich.

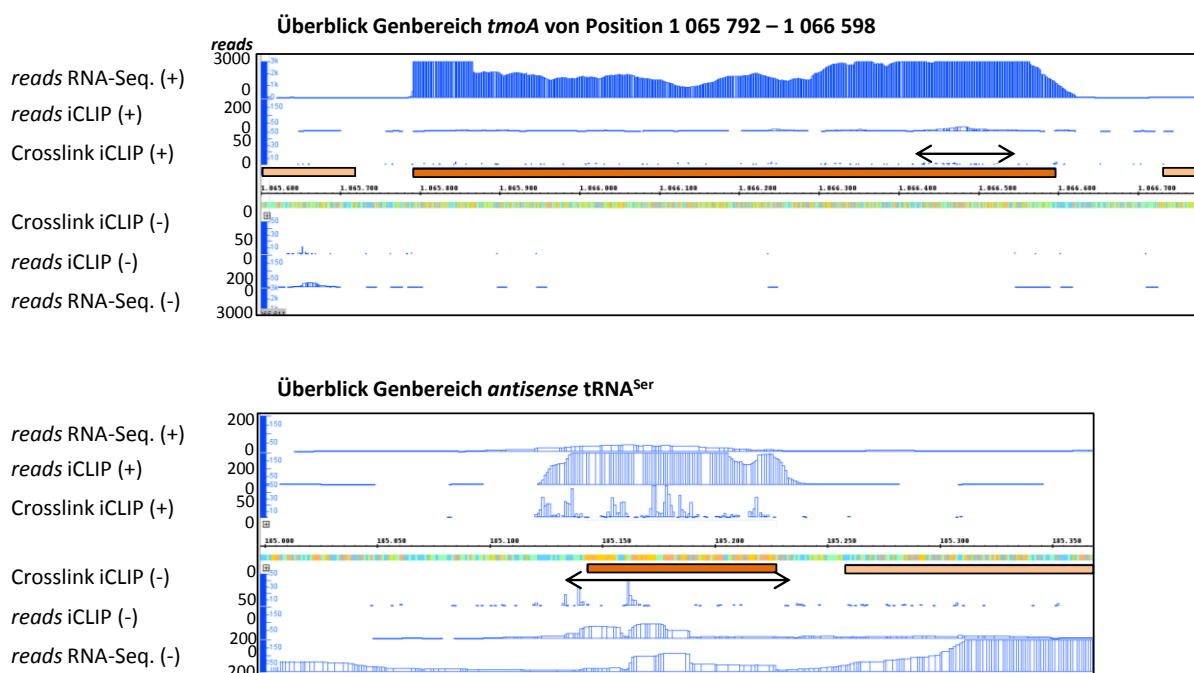


Abbildung 59. Vergleich der erzielten *reads* im iCLIP und der RNA-Sequenzierung des Genes *tmoA* sowie der *antisense* tRNA^{Ser}. Die Position ist in bp angegeben. Es sind sowohl die Peakhöhen von Crosslinks, der *reads* im iCLIP und die *reads* in der RNA-Sequenzierung dargestellt. Es ist gezeigt, dass das Gen *tmoA* im Gegensatz zu der *antisense* tRNA^{Ser} deutlich höhere Peaks in den RNA-Sequenzierungsdaten aufweist, wohingegen die *antisense* tRNA^{Ser} in den iCLIP-Daten höhere Peaks als *tmoA* besitzt. Die Genbereiche von *tmoA* und der *antisense* tRNA^{Ser}, welche für die *in vitro* Transkription genutzt wurden, sind mittels schwarzer Doppelpfeile markiert. Die Abbildungen wurden mittels IGB-Software erstellt.

(A) antisense tRNA^{Ser}

5' ATATAAATTTAAATAGCGCCGGGGCGGGGATTGAACCCGCGCGGGAAACCCCACTGGCTCTCCAGGCCAGCCCCTTAGTCCGCTCGGGCACCCCG
GCACTCTACTATATTA 3'

A (21,9%), T (19,3%), C (33,3%), G (25,4%)

(B) tmoA

5' GCATATGCCGCTATGGCAAATAAACTAATGACTTCGTGTTCTCCTCAGCAACTCAAAGTATACAACTGATGAGGCTAGGCATGCGCAAATAGGGCACC 3'

A (33%), T (22%), C (24%), G (21%)

Abbildung 60. Darstellung der DNA-Sequenz für die *in vitro* Transkripte von *tmoA* sowie der *antisense tRNA^{Ser}*, welche für den EMSA genutzt wurden. Ebenso angegeben ist der prozentuale Anteil der Nucleotidzusammensetzung der Sequenz.

Ein repräsentativer EMSA ist in Abbildung 61 A zu sehen. Abbildung 61 B zeigt die graphische Darstellung der Mittelwerte zweier unabhängiger Versuche. Die Reaktionsansätze wurden in 5%-igen TBE-PAA-Gelen unter nativen Bedingungen bei 4°C aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mittels QuantityOne Software von BioRad. Die Konzentration von nicht radioaktiv markierten Kompetitor ist der Abbildung 61 A zu entnehmen.

Zu sehen ist in Abbildung 61 A (links) der eigentliche kompetitive Protein-RNA-EMSA, in welchem das radioaktiv markierte Transkript *tmoA* in Konkurrenz zu dem nicht radioaktiv markierten Transkript *antisense tRNA^{Ser}* steht. *tmoA* konnte in Transkriptomdaten von *S. solfataricus* eine hohe Peakhöhe, im iCLIP jedoch nur eine geringe Peakhöhe aufweisen, während die *antisense tRNA^{Ser}* als eine "durch das Exosom angereicherte RNA" definiert wurde. In Abbildung 61 A (rechts) ist der Kontroll-EMSA zu sehen, wobei die *antisense tRNA^{Ser}* sowohl als radioaktiv markierte RNA als auch als nicht radioaktiv markierter Kompetitor eingesetzt wurde. Die Konzentrationen waren dabei entsprechend dem durchgeführten EMSA aus Abbildung 61 A linker Seite. Der Kontroll-EMSA (rechts) diente dem Vergleich der Effizienz der Bindung von *tmoA* zu der *antisense tRNA^{Ser}* durch das eingesetzte Rrp4-Csl4-Exosom.

Es zeigt sich, dass der exosomale Komplex in der Lage ist, beide radioaktiv markierten Transkripte zu binden: In den Spuren ohne Zusatz von nicht radioaktiv markierten Kompetitor ist jeweils kein ungebundenes Ausgangssubstrat mehr zu detektieren, es erfolgte eine Verschiebung des Substrates durch die Bindung mit dem Rrp4-Csl4-Exosom im Gel nach oben. Durch Zugabe von 3 pmol des Kompetitors der *antisense tRNA^{Ser}* wird *tmoA* vom Exosom verdrängt, da der kalte Kompetitor bevorzugt vom Exosom gebunden wird. Somit liegt mehr *tmoA* ungebunden vor, ersichtlich durch mehr verbleibendes radioaktiv markiertes Ausgangssubstrat, als ohne Zusatz des kalten Kompetitors. Der Effekt verstärkt sich je mehr kalte RNA von der *antisense tRNA^{Ser}* dem EMSA zugegeben wird. Zum Vergleich dazu ist auf rechter Seite von Abbildung 61 A der Kontroll-EMSA aufgetragen, indem

die *antisense* tRNA^{Ser} sowohl als Kompetitor als auch als radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt wurde. Es ist zu sehen, dass die *antisense* tRNA^{Ser} bis zu einer Konzentration von 3 pmol vollständig durch das Exosom gebunden wird. Ab 7 pmol eingesetztem Substrat *antisense* tRNA^{Ser} verbleibt auch in dem Kontroll-EMSA ungebundenes radioaktiv markiertes Ausgangssubstrat zurück, jedoch ist die Effizienz der Bindung der *antisense* tRNA^{Ser} durch das Exosom höher als die Bindung von *tmoA* (Abbildung 61 A links verglichen mit Abbildung 61 A rechts). Während bei dem Einsatz von 10 pmol kalter *antisense* tRNA^{Ser} noch 69% der radioaktiv markierten *antisense* tRNA^{Ser} durch das Exosom gebunden werden kann, kann bei gleicher Konzentration von *antisense* tRNA^{Ser} nur noch 7% von der radioaktiv markierten *tmoA* durch das Exosom gebunden werden (Abbildung 61 B).

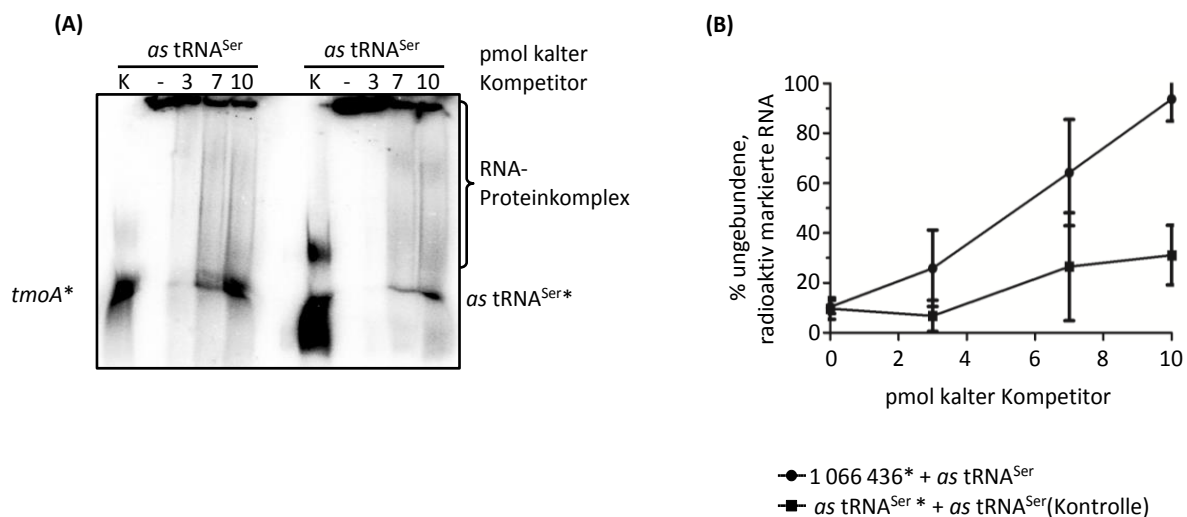


Abbildung 61. Das Exosom bindet das Transkript *antisense* tRNA^{Ser} bevorzugter im Vergleich zum Transkript *tmoA*. (A) Abbildung eines nativen 5%-igen TBE-PAA-Gels mit repräsentativen Protein-RNA EMSA (Phosphoimager Scan). Radioaktiv markiertes Substrat (*) und gebundener RNA-Proteinkomplex sind in der Abbildung hervorgehoben. Die jeweilig eingesetzte Konzentration des Kompetitors *antisense* tRNA^{Ser} (in pmol) ist über den Spuren der Abbildung zu entnehmen. Die Konzentration des radioaktiv markierten Substrates lag jeweils bei 8 fmol. Pro Reaktion wurde 2 pmol Rrp4-Csl4-Exosom eingesetzt. *antisense* tRNA^{Ser} wurde anhand der Sequenzierungsdaten von Transkriptom und iCLIP als eine RNA definiert, welche am Exosom angereichert vorliegt. *tmoA* hingegen wurde als nicht durch das Exosom angereichert definiert. Es zeigt sich, dass mit steigender Konzentration des eingesetzten Kompetitors mehr radioaktiv markiertes Ausgangssubstrat ungebunden vorliegt. Dabei wird bei gleicher Konzentration von kalter Kompetitor-RNA *tmoA* schlechter durch das Rrp4-Csl4-Exosom gebunden als *antisense* tRNA^{Ser}. (B) Graphische Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Wiederholungen des Protein-RNA-EMSAs. Die Konzentration der eingesetzten Kompetitor-RNA ist der X-Achse zu entnehmen. Auf der Y-Achse ist das verbliebene Ausgangssubstrat in Prozent, ersichtlich. K, Kontrollreaktionsansatz ohne Protein; -, Reaktionsansatz ohne Kompetitor.

Es konnte somit gezeigt werden, dass das Exosom in der Lage ist *antisense* tRNA^{Ser} bevorzugt im Vergleich zu *tmoA* zu binden. Dies steht im Einklang mit den Aussagen der Sequenzierungsanalysen des Transkriptoms und des iCLIPs, in welchen *antisense* tRNA^{Ser} "als angereichert durch das Exosom" definiert werden konnte.

3.5.6.1 Northern Blots gegen die *antisense* tRNA^{Ser}

Überraschenderweise zeigten die RNA-Sequenzierungsdaten im iCLIP höhere Werte für eine *antisense* RNA der tRNA^{Ser} statt für die tRNA^{Ser} selbst (Abbildung 62). Um die Existenz der *antisense* RNA zu verifizieren wurde ein Northern Blot mit Sonden designt für den Nachweis der *antisense* RNA der tRNA^{Ser} und für den Nachweis tRNA^{Ser} durchgeführt. Dafür *S. solfataricus* bis zur stationären Wachstumsphase, mit einer OD_{600nm} 0.75, vergleichbar der des Hauptversuches des iCLIP, angezogen. Gesamt-RNA wurde mittels Hot-Phenol-Methode isoliert und in den Konzentrationen 1 µg, 500 ng und 1 ng auf ein Harnstoff-TBE-Gel aufgetragen. Nach Northern-Blot erfolgte der Nachweis der RNA mittels radioaktiv markierter Sonden. Die Auswertung erfolgte mittels QuantityOne Software von BioRad.

Es ist ersichtlich, dass die erhaltenen Signale für die Sonde, welche gegen die tRNA^{Ser} (*foreward* Sonde), sehr deutliche und klare Bandensignale ergibt, welche entsprechend der Menge der aufgetragenen RNA, die stärksten Signale bei 1 µg haben. Die Sonde, gerichtet gegen die *antisense* tRNA^{Ser} (*reverse* Sonde) hingegen zeigt keine klaren Banden. Entsprechend ließ sich im Northern Blot nur die tRNA^{Ser} als klares Signal nachweisen, jedoch keine *antisense* tRNA^{Ser} (Abbildung 62). Weitere Signale sind durch potentielle längere Vorstufen, potentielle Degradationsprodukten der tRNA^{Ser} und *antisense* tRNA^{Ser} oder generell unspezifischen Signalen zu begründen.

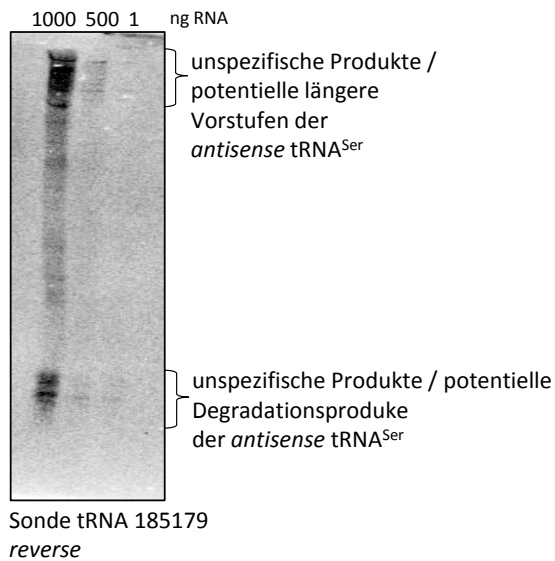
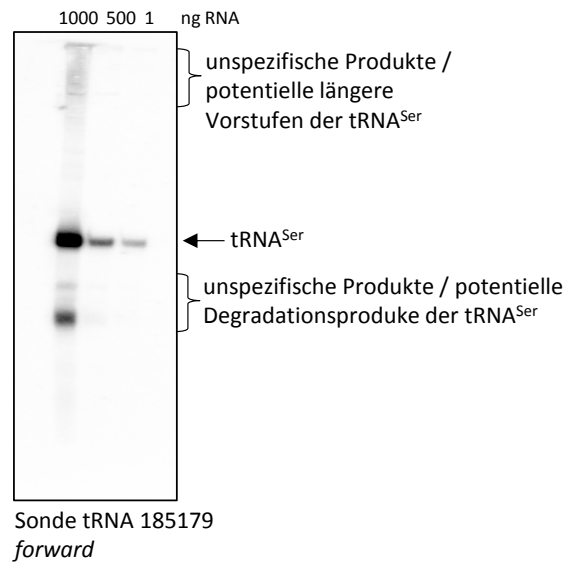
(A) Northern Blot für den Nachweis der *antisense* tRNA^{Ser}**(B)** Northern Blot für den Nachweis der tRNA^{Ser}

Abbildung 62. Untersuchung der tRNA^{Ser} und *antisense* tRNA^{Ser} mittels Northern Blot. Abbildung des Northern Blotes nach Auftrennung von Gesamt-RNA von *S. solfataricus* im 10%-igen Harnstoff-TBE-Gel (Phosphoimager Scan). Die Konzentration der Gesamt-RNA ist der Abbildung zu entnehmen. Sonde zum Nachweis der *antisense* RNA für die tRNA^{Ser} war die Sonde tRNA 185179 *reverse* **(A)** und der tRNA^{Ser} die Sonde tRNA 185179 *forward* **(B)**. Es zeigt sich, dass sich nur die tRNA^{Ser} mit klaren Signalen in der Gesamt-RNA von *S. solfataricus* nachweisen lässt. Weitere Signale sind als potentielle längere Vorstufen, potentiellen Degradationsprodukten der tRNA^{Ser} und *antisense* tRNA^{Ser} oder generell unspezifischen Signalen zu begründen.

4 Diskussion

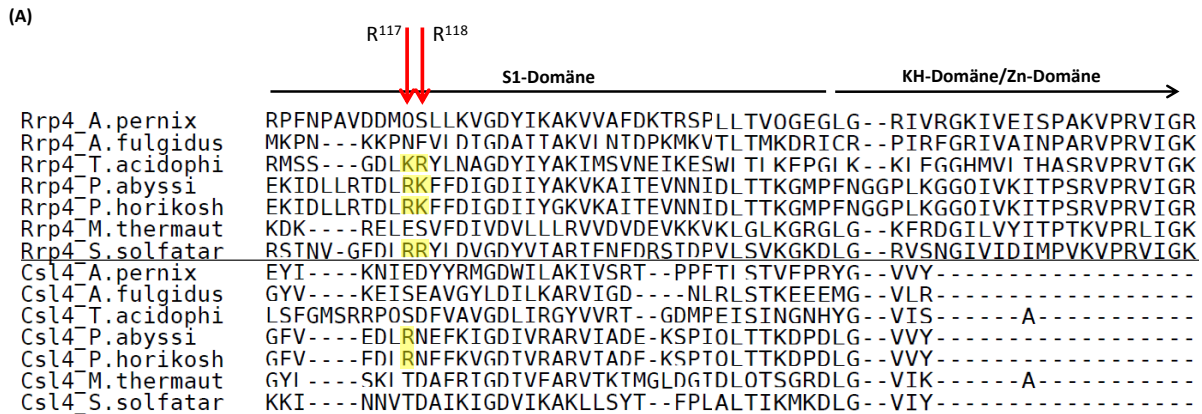
4. 1 Untersuchungen bezüglich der Poly(A)-Präferenz des Rrp4-Exosoms

Um die, für die Poly(A)-Präferenz verantwortlichen Aminosäuren von Rrp4 zu identifizieren, wurden Aminosäuren von Rrp4 durch die nicht konservierten korrespondierende Aminosäuren in gleicher Position von Csl4 ausgetauscht. Substituierte Aminosäuren waren Tryptophan (W⁸⁸) in Rrp4 zu Alanin aus Csl4 sowie Asparaginsäure (D⁹¹) in Rrp4 zu Serin aus Csl4. Diese beiden gewählten Aminosäuren sind zwar nicht als RNA bindend bekannt, RNA-Bindedomänen umfassen jedoch auch oftmals Bereiche, welche über die eigentlichen RNA-Erkennungsmotive hinausgehen. Benachbarte Aminosäuren von RNA-Bindungsmotiven können wichtig sein, um Strukturen im RNA-Bindungsbereich aufrecht zu erhalten. Ein Beispiel dafür ist Ro, ein 60 kDa großes Protein, bei welchem nicht nur das eigentliche RRM (*RNA-recognition-motif*), sondern auch die tertiäre Struktur zur Bindung der RNA beiträgt [186]. Zudem konnte für das La-Protein gezeigt werden, dass ein konservierter Bereich aus aromatischen Aminosäuren im sog. "La-Motiv" für die hochaffine Bindung von pre-tRNA verantwortlich ist. La bindet spezifisch poly(U)_{OH}-tails am 3' Ende von neu synthetisierten RNA-Polymerase III Transkripten. Eine Mutation der Asparaginsäure im La-Motiv führt im konservierten, aromatischen Bereich ebenfalls zu einer Verminderung der Spezifität gegenüber 3' OH gegenüber 3' Phosphat [187]. Bei den beiden Substitutionen in den hier eingesetzten Proteinvarianten, liegen die Aminosäuren in einem konservierten Bereich von Rrp4, von Aminosäure 88 bis 92 (Sequenz W⁸⁸VVDI⁹²), welcher in Csl4 (A⁸⁸LVS⁹²) nicht vorzufinden ist (siehe Abbildung 15). Zudem liegt der Bereich der gewählten Aminosäuren W⁸⁸VVDI⁹² an der S1-Pore von Rrp4 lokalisiert, in welchem RNA-Substrate in das Lumen des Hexamers geleitet werden [142]. Es ist möglich, dass Aminosäuren, welche für die Poly(A)-Präferenz verantwortlich sind, innerhalb dieser Region lokalisiert liegen.



Abbildung 63. Kristallstruktur des Rrp4-Exosoms von *S. solfataricus*. In dunkelblau, türkis, grün, weiß, hellbraun und violett ist der Hexamer, bestehend aus Rrp41 und Rrp42, dargestellt. Auf dem Hexamer aufgelagert ist die trimere Kappe aus drei Rrp4-Proteinen (gelb, braun und hellblau). In Gelb hervorgehoben, und durch die rote Box markiert, sind die konservierten Aminosäuren W⁸⁸VVDI⁹² von Rrp4, welche an der S1-Pore lokalisiert sind. W⁸⁸ und D⁹¹ wurden durch korrespondierende Aminosäuren von Csl4 substituiert. [188]

Jedoch zeigte sich, dass sowohl Aktivität als auch Poly(A)-Präferenz zwischen den substituierten Rrp4-Varianten und dem Wildtyp-Rrp4 Protein sehr ähnlich waren [160]. Weitere Kandidaten für Aminosäuren, welche für die Poly(A)-Präferenz verantwortlich sein könnten, sind ein Arginin in Position 117 (R¹¹⁷) sowie ein Arginin in Position 118 (R¹¹⁸) von Rrp4 (siehe Abbildung 64). In dieser Position sind, innerhalb der archaealen Rrp4-Proteine, positive Aminosäure-Seitenketten als Lysin oder Arginin konserviert, was in Csl4 in korrespondierenden Positionen nicht gegeben ist. Bereiche von positiv geladenen Aminosäuren sind häufig an der Bindung von RNA beteiligt [189, 190]. In zukünftigen Arbeiten wären somit R¹¹⁷ und R¹¹⁸ Kandidaten für weitere Substitutionen. Zudem könnten mehr als eine Aminosäure gleichzeitig substituiert werden, falls für den Effekt der Poly(A)-Spezifität, mehrere Aminosäuren zusammen verantwortlich sind.



cons

* : : : .

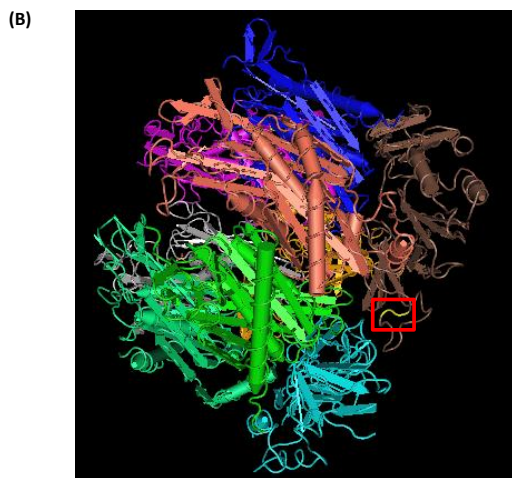


Abbildung 64. Darstellung der beiden potentiellen Aminosäure-Kandidaten (R¹¹⁷ und R¹¹⁸) für die Poly(A)-Präferenz von Rrp4. (A) Alignment der S1-Domäne von Rrp4 und Csl4 aus ausgewählten Archaea. Mit Pfeilen angedeutet ist der weiterführende Verlauf der S1-Domäne in die nebenliegende KH- bzw. Zn-Domäne. Mit roten Pfeilen hervorgehoben sind zwei Argininreste (R¹¹⁷ und R¹¹⁸) von Rrp4. In entsprechender Position sind positiv geladene Aminosäurereste in Rrp4 konserviert (in gelb hervorgehoben), nicht in entsprechender Position in Csl4. Des Weiteren sind in Csl4 aus *Sulfolobus solfataricus* die entsprechend korrespondierende Aminosäuren in rot hervorgehoben, durch welche eine Substitution in Rrp4 erfolgen würde. Abkürzungen: A. pernix, *Aeropyrum pernix*; A. fulgidus, *Archaeoglobus fulgidus*; T. acidophi, *Thermoplasma acidophilum*; P. abysssi, *Pyrococcus abyssii*; P. horikosh, *Pyrococcus horikoshii*; M. thermoaut, *Methanobacterium thermoautotrophicum*; S. solfatar, *Sulfolobus solfataricus*. Für das Alignment wurden Archaea Stämme genutzt, welche 2001 von Koonin et al., in dessen Alignment (Figure 1) verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des T-Coffee Server [129]. (B) Kristallstruktur des Rrp4-Exosoms von *S. solfataricus*. In dunkelblau, türkis, grün, weiß, hellbraun und violett ist der Hexamer, bestehend aus Rrp41 und Rrp42, dargestellt. Auf dem Hexamer aufgelagert ist die trimere Kappe aus drei Rrp4-Proteinen (gelb, braun und hellblau). In Gelb hervorgehoben, und durch die rote Box markiert, sind die zwei möglichen Kandidaten R¹¹⁷ und R¹¹⁸ für eine zukünftige Aminosäure-Substitution. Beide Aminosäuren liegen auf der Proteinoberfläche [188].

Da sich der Austausch einzelner Aminosäuren als komplex erwiesen hatte, wurde im nächsten Schritt eine Substitution der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4 vorgenommen. Ein Austausch der Poly(A)-Präferenz von Rrp4 auf Csl4, verursacht durch die Substitution der S1-Domäne zwischen den beiden

Kappenproteinen, war in dieser Arbeit nicht möglich. Eine Überexpression der beiden Hybridproteine Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 war zwar gegeben (siehe Abbildung 17), jedoch konnte in Experimenten mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation keine Interaktion mit dem hexameren Ring des Exosoms nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Die *in vitro* Co-Immunopräzipitation in dieser Arbeit wurde unter Standardbedingungen durchgeführt, unter welcher ein Nachweis der Interaktion des hexameren Ringes mit Rrp4 und Csl4 möglich war [132, 134, 158]. Künftig könnte die Salzkonzentration des Assays variiert werden, wodurch in der Vergangenheit auch Interaktionsstudien verbessert durchgeführt werden konnten. Mittels 500 mM NaCl konnte der Nachweis der Interaktion von Δ KH-Rrp4 mit dem Hexamer via *in vitro* Co-Immunopräzipitation erbracht werden, welche bei 150 mM nur schwach ausgebildet war [132]. Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf über 150 mM NaCl, welche in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, könnte für künftige Interaktionsstudien genutzt werden um die Interaktion von Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 mit dem Hexamer erneut zu testen.

Bezüglich der Aktivitäten und der Poly(A)-Präferenz der beiden Hybridproteine konnte keine sichere Aussage getroffen werden (siehe Abbildung 19 und 20). Zwar wird Poly(A)-RNA noch degradiert, wenn der hexamere Ring mit Rrp4S1Csl4 bzw. Csl4S1Rrp4 im Assay eingesetzt wird, allerdings könnte diese Restaktivität, sowohl im Aktivitätsassay als auch im Kompetitionsassay, auf die Aktivität des hexameren Ringes selbst zurückzuführen sein, und nicht auf eine Aktivität des hexameren Ringes zusammen mit den Fusionsproteinen (Abbildung 19 und 20). Die Aktivitäten des hexameren Ringes und die des hexameren Ringes mit Rrp4S1Csl4 bzw. Csl4S1Rrp4 sind von vergleichbarer Intensität. Somit ist eine Aussage darüber, ob ein Austausch der Poly(A)-Präferenz über einen Domänenaustausch von S1 zwischen Rrp4 und Csl4 stattgefunden hat, nicht möglich.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass Struktur und Integrität der exosomalen Proteine für die grundsätzliche Funktionalität des Exosoms nötig sind. Durch Austausch der Domänen zwischen Rrp4 und Csl4 könnte die Funktionalität von Csl4 und Rrp4 selbst, aber auch ein genereller, unerwarteter Einfluss auf die Funktionalität des Hexamers erfolgt sein: Audin et al., 2013, zeigen, dass die Kappenproteine die Konformation des Hexamers beeinflussen können [191]. Ohne gebundene Kappe ist der Hexamer in der Lage zwischen zwei verschiedenen Konformationen von Rrp42 (Zustand A und Zustand B) zu wechseln. Dabei liegt der flexible Bereich in der Bindungsregion der Kappenproteine lokalisiert. Die Zustände A und B sind über die möglichen Resonanzen der Methylgruppen von Ile- δ 1, Leu- δ , und Val- δ definiert. Nach Bindung der Kappenproteine, vermindert sich diese Flexibilität des Hexamers und Zustand A wird bevorzugt. Zudem zeigte sich, dass bei Deletion der NTD von Rrp4 die Bindungsaffinität von Δ NT-Rrp4 zum hexameren Ring im Zustand A, im Vergleich zum WT-Rrp4 erhöht wird. Kontakte der S1 und KH Domäne von Rrp4 bestehen mit Rrp42 [191]. Für das

eukaryotische Exosom wurde gezeigt, dass eine gegenseitige Beeinflussung der Untereinheiten besteht: Rrp6 ist in der Lage die Aktivität von Rrp44 zu stimulieren, wahrscheinlich über die Weitung des S1/KH-Ringes der gebundenen Kappenproteine, wobei Csl4, Rrp4 und Rrp40 vom zentralen Kanal weg bewegt werden [103].

4. 2 Untersuchungen bezüglich Nop5 im Kontext des archaealen Exosoms

Nop5 ist, als *Scaffold* Protein, Teil der archaealen box C/D snoRNPs [150]. Die Interaktion des Exosoms mit Nop5 *in vivo* konnte bisher nur einmalig beschrieben werden, mittels *in vitro* Experimenten zeigen kann jedoch eine Interaktion von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom jedoch wiederholt nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von Nop5 mit dem Exosom nicht über, an das Exosom gebundene, RNA vermittelt wird, sondern direkt mit Rrp4 erfolgt. Da auch die Zellviabilität während des gesamten Wachstums von *S. solfataricus*, von Beginn des Wachstums bis zur Ernte der Zellen in der späten stationären Phase, bei rund 90% lag, ist zudem davon auszugehen, dass die Interaktion zwischen Nop5 und dem Exosom nicht auf ein Artefakt durch Aggregatbildung, zurückzuführen ist ([158], Daten von Lassek). Die schwere Nachweisbarkeit der Interaktion zwischen Nop5 und dem archaealen Exosom *in vivo* kann darauf zurückzuführen sein, dass der Hauptanteil von Nop5 im archaealen box C/D snoRNPs gebunden vorliegt und einer Interaktion mit dem Exosom nicht zur Verfügung steht. Des Weiteren ist es möglich, dass die Bindung von Nop5 zum archaealen Exosom abhängig von der Wachstumsphase ist, da ein Nachweis von Nop5 aus Zellen der späten stationären Wachstumsphase erfolgt ([158], Daten von Lassek).

4.2.1 Verifikation der Interaktion zwischen Nop5 mit dem Rrp4-Exosom

Verifiziert wurde die Interaktion mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation unter Verwendung von Rrp41-Antikörpern, wobei nachgewiesen werden konnte, dass Nop5 über Rrp4 mit dem Exosom interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass keine Interaktion zwischen Nop5 und dem Csl4-Exosom oder dem hexameren Ring selbst besteht ([158], Daten von Hou). Die von Hou durchgeführte *in vitro* Co-Immunopräzipitation wurde mit His₆-tags an Proteinen des Hexamers durchgeführt. Um zu bestätigen, dass diese His₆-tags die Interaktion von Nop5 mit dem Exosom nicht beeinflussen, wurde die *in vitro* Co-Immunopräzipitation in der hier vorliegenden Arbeit ohne His₆-tags an Rrp41 und

Rrp42 wiederholt (Abbildung 21). Es konnte verifiziert werden, dass eine Interaktion von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom nachweislich nicht auf His₆-tags beruhte bzw. von diesen nicht beeinflusst wurde. Entsprechend bestand Interesse an der interagierenden Domäne von Nop5 mit Rrp4. Resultate des dafür durchgeführten *Bacterial-two-Hybrid System Assays* (Abbildung 23) konnten zeigen, dass Nop5 höchst wahrscheinlich über seine Coiled-Coil Domäne mit Rrp4 interagiert. Auch eine zusätzliche Interaktion über die CTD von Nop5 mit Rrp4 ist möglich. Die NTD dagegen scheint nicht an der Interaktion von Nop5 mit Rrp4 beteiligt zu sein. Die NTD weist zu 24% eine Identität mit den Aminosäuren, und zu 44% eine Ähnlichkeit in den Eigenschaften der Aminosäuren, mit der CTD von DnaG auf [148]. DnaG selbst interagiert über seine CTD mit Csl4 und somit dem Exosom, ist jedoch nicht in der Lage mit Rrp4 zu interagieren [134]. Da die NTD von Nop5 mit der CTD von DnaG ähnlich ist und die CTD von DnaG nicht mit Rrp4 interagieren kann, ist auch das Ergebnis des *Bacterial two Hybrid System Assays*, in welchem kein Nachweis der Interaktion der NTD von Nop5 mit Rrp4 erbracht werden konnte, erklärbar. Um die Interaktion der Einzeldomänen von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom zu verifizieren, wurden die drei Domänen von Nop5, CTD, Coiled-Coil und NTD, einzeln mittels MBP-tag (Maltose-Binding-Protein) in *E. coli* überexprimiert und *in vitro* mit dem Rrp4-Exosom inkubiert. Mittels Rrp41-Antikörpern fand eine *in vitro* Co-Immunopräzipitation statt. Ein Nachweis der Interaktion der Domänen von Nop5 mit dem Rrp4-Exosom war nicht möglich (Abbildung 29). Ein Grund dafür könnte sein, dass der MBP-tag, welcher eine Größe von 42 kDa aufweist, eine Interaktion der Einzeldomänen mit dem Rrp4-Exosom sterisch behindert. Ebenso ist es möglich, dass zwei Domänen von Nop5 für eine stabile Interaktion mit dem Rrp4-Exosom nötig sind. Die Vermutung liegt nahe, da im *Bacterial two Hybrid System Assay* nicht nur die Coiled-Coil Domäne mit Rrp4 eine Interaktion zeigte, sondern auch die CTD eine, wenn auch geringere, Interaktion mit Rrp4 aufwies (Abbildung 23). Ebenso könnten mehrere Domänen von Nop5 für die Interaktion nötig sein bzw. Einzeldomänen des Proteins könnten in der Lage sein die Konfirmation der restlichen Domänen von Nop5 zu beeinflussen und somit zur Interaktion beitragen. DnaG interagiert, wie bereits erwähnt, über die CTD mit dem Csl4-Exosom. Jedoch konnte weder eine DnaG Variante bei welcher die NTD deletiert wurde (DnaG-ΔNT) noch eine DnaG-Variante, bei welcher die CTD deletiert wurde (DnaG-ΔCT) mit dem Csl4-Exosom interagieren. Entsprechend zeigt sich, wie wichtig das Vorliegen aller Domänen von Proteinen für deren vollständige Funktionalität ist [124].

Leider war im *Bacterial two Hybrid System Assay* kein Nachweis der Interaktion von einem Protein Nop5, vollständiger Länge, mit Rrp4 möglich. Möglicherweise sind, aufgrund der Größe der beiden Proteine vollständiger Länge (Nop5 und Rrp4), welche an die beiden Domänen der Adenylatcyclase, T18 und T25 fusioniert wurden (siehe 2.3.10 Material und Methoden), T18 und T25 sterisch zu weit voneinander entfernt um miteinander in Kontakt zu treten. Für eine Verifikation, dass Nop5 in der

Lage ist mit Rrp4 selbst zu interagieren, wurden *Surface plasmon resonance* Experimente (Biacore/SPR) durchgeführt (Abbildung 27). Dabei diente Nop5 als Ligand, Rrp4 als Analyt. Es zeigte sich, dass eine Interaktion zwischen Rrp4 und Nop5 prinzipiell möglich ist. Die Affinitätskonstante K_D lag bei 7.2×10^{-7} M. Schwache Interaktionen liegen bei 10^{-3} M, starke Interaktionen bei 10^{-9} M. Signalmoleküle zeigen z.B. schwache Interaktionen, besonders starke Interaktionen sind bei der Bindung zwischen Steptavidin und Biotin vorzufinden [174]. Die Dissoziation zwischen Rrp4 und Nop5 lässt sich während des SPRs bereits mittels Pufferzugabe auslösen, es sind zur Auflösung der Assoziation der beiden Proteine keine Detergenzien nötig. Für eine starke Interaktion zwischen Nop5 mit dem Rrp4-Exosom sind demzufolge wahrscheinlich zusätzliche Interaktionen mit dem hexameren Ring nötig, welche bei einer alleinigen Interaktion zwischen Nop5 und Rrp4 nicht gegeben sind. Damit lässt sich das Ergebnis des *Pull-down* Assays begründen, in welchem ein Nachweis der direkten Interaktion zwischen Rrp4-His₆ und Nop5 (ohne His₆-tag) nicht möglich war (Abbildung 26). Das Resultat des SPR weist drauf hin, dass die Bindung zwischen Rrp4 und Nop5, im *pull down*-Assay, bereits während der Waschschriffe aufgelöst wurde. Dadurch ist die Interaktion zwischen Nop5 und Rrp4 möglich und nachweislich, jedoch nicht stabil genug, um den Bedingungen des *pull down* Assays stand zu halten. Ein Nachweis via *in vitro* Co-Immunopräzipitation zwischen Rrp4 und Nop5 mittels Rrp4-Antikörpern war ebenso nicht möglich, da einerseits eine schwache Interaktion von Nop5 mit den Rrp4-Antikörpern vorlag (Abbildung 24) und andererseits auch hier die Interaktion zwischen Nop5 und Rrp4 auch hier nicht stark genug war, um die Waschbedingungen der Co-Immunopräzipitation zu überdauern. Zum Vergleich dazu war ein Nachweis der Interaktion von DnaG mit dem Rrp4-Csl4-Exosom *in vivo* und dem Csl4-Exosom *in vitro* mittels Co-Immunopräzipitation möglich, eine direkte Interaktion der Einzelproteine zwischen DnaG und Csl4 über Co-Immunopräzipitation hingegen konnte ebenso nicht erbracht werden. Auch hier wurden zusätzliche Interaktionen von DnaG mit dem hexameren Ring postuliert, welche für eine stabile Interaktion zwischen DnaG und dem Exosom nötig sind [192].

4.2.2 Funktion von Nop5 im Kontext des Exosoms

In vivo konnte gezeigt werden, dass das Exosom verschiedene Zusammensetzungen bezüglich der Kappe besitzt [132], was auf funktionelle Unterschiede bezüglich der Substratpräferenzen der verschiedenen Exosom-Varianten hinweisen kann. Zudem konnte für DnaG gezeigt werden, dass das Protein auch in der Lage ist, die Löslichkeit des Exosoms zu beeinflussen: die archaealen Sm-Proteine interagieren über DnaG mit dem Exosom, eine Bindung der Sm-Proteine führt zu einer Erhöhung des Anteils des löslichen Exosoms im Vergleich zum unlöslichen Exosom. Auch der Anteil von RNA mit

3' A-reichem *tail* erhöhte sich durch die Überexpression der Sm-Proteine in *S. solfataricus* [193]. Eine Interaktion von Nop5 mit dem Exosom könnte ebenso zu veränderten Eigenschaften des Exosoms bezüglich Substratpräferenzen oder zusätzlichen Interaktionspartnern führen, was vor allem unter bestimmten Wachstumsbedingungen (der späten stationären Wachstumsphase, bei welcher die Interaktion von Nop5 mit dem Exosom entdeckt wurde) eine wichtige Rolle spielen könnte. Nop5 zeigt eine Erhöhung der Polyadenylierungseffizienz der genutzten Substrate in den *in vitro* Assays (Abbildungen 31 und 34), was ein Hinweis auf eine Erhöhung des RNA-*tailing* und vermehrten RNA-Abbaus *in vivo* sein könnte. Einen signifikanten Einfluss auf die Degradationsfähigkeit des Rrp4-Exosoms gab es dagegen nicht (Abbildungen 32 und 35). Bei Nop5 könnte es sich folglich um ein Protein mit dualer Funktionalität handeln, welches zum einen im snoRNP-Komplex eine wichtige Rolle als *Scaffold*-Protein übernimmt und zum anderen im Kontext des Exosoms Einfluss auf *tailing* und Degradation von RNA ausübt. Ein Beispiel für ein dual funktionales Protein ist L7Ae, welches ebenfalls Teil des snoRNP-Komplexes ist und in diesem die sRNA in der konservierten C/D box Region bindet. Andererseits ist L7A Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit [156]. DnaG ist wichtig für die Vermittlung der Poly(A)-Präferenz auf das Csl4-Exosom [134] und für den Abbau stabiler RNAs durch das Exosom. Da jedoch auch Archaea ohne Exosom *dnaG* im Genom aufweisen, ist davon auszugehen, dass DnaG eine zusätzliche Funktion im RNA Metabolismus, ohne das Exosom, aufweist [124]. DnaG ist zudem als bakterielle Primase annotiert. Gezeigt werden konnte, dass DnaG in *in vitro* Assays, in der Lage ist als Primase zu wirken [143]. Weiteres Beispiel für ein multifunktionales Protein ist Thioredoxin aus *E. coli*, welches in der Abwehr oxidativen Stresses involviert ist. Nach T7-Bakteriophageninfektion allerdings kann Thioredoxin auch einen Komplex mit der T7 DNA-Polymerase bilden und zu erhöhter T7 DNA-Replikation führen [194].

Die CTD von Nop5 scheint von zentraler Bedeutung für die Interaktion mit dem Rrp4-Exosom zu sein. Daneben könnte die CTD von Nop5 auch wichtig sein, um RNA oder zusätzliche Proteine zum Exosom zu rekrutieren. Im sRNP-Komplex ist die CTD von Nop5 zusammen mit L7Ae wichtig, um die Box C/D der sRNA zu binden. Die NTD von Nop5 dagegen ist wichtig, um im sRNP-Komplex mit Fibrillarin zu interagieren [154]. Zudem konnte vor kurzem gezeigt werden, dass Nop5, zusammen mit Fibrillarin, mit den archaealen Sm-Proteinen co-gereinigt wird [193]. Auch konnten exosomale Proteine (Rrp41, Rrp42, Rrp4 sowie DnaG) mit den archaealen Sm-Proteinen nachgewiesen werden [193]. Eine funktionelle Verbindung zwischen Nop5, dem Exosom und den Sm-Proteinen wäre somit denkbar.

4.2.3 Größenausschlusschromatographie von Nop5

In Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich das Verhalten von Nop5-His₆ als Einzelprotein mittels Gelfiltration untersucht. Entgegen den Erwartungen eluiert Nop5-His₆ in der Gelfiltration als Komplex mit einer Größe von rund 237 kDa, was einem Pentamer entsprechen würde (Abbildung 31). Wahrscheinlicher jedoch ist, dass es sich bei Nop5 um ein Homotetramer handelt, welcher aufgrund seiner dreidimensionalen Faltung früher als erwartet eluiert. Die Proteinfaltung (globulär, fibrillär) kann den hydrodynamischen Radius eines Proteins und somit die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in der Säulenmatrix beeinflussen. Dies hat Einfluss auf das berechnete Molekulargewicht, anhand des Elutionsvolumens [195]. Im snoRNP-Komplex dimerisiert Nop5 über seine Coiled-Coil Domäne und unterstützt als dimeres *Scaffold* Protein die Assoziation von je zwei Kopien L7Ae, Fibrillarin und einer sRNA. Mittels *single particle electron microscopy* konnte gezeigt werden, dass auch der snoRNP Komplex selbst als Dimer vorliegt und somit vier Kopien jedes Proteins und zwei sRNAs im Komplex vorhanden sind. Neben der Interaktion zwischen den beiden sRNAs, welche die beiden Nop5-Fibrillarin Heterotetramere verbinden, ist auch die Dimerisierung von Nop5 über die Coiled-Coil Domäne essentiell, um den di-sRNP Komplex zu verankern [196]. Es wäre folglich zu erwarten gewesen, dass Nop5-His₆ als Proteinkomplex dimerer Größe eluiert. Ein Vorliegen eines Heterotetramers jedoch, ist aufgrund der nachgewiesenen Assoziation im di-sRNP-Komplex, denkbar.

4.3 Untersuchungen bezüglich der Interaktion von EF1 α und SSO_RS01100 mit dem Exosom

EF1 α und SSO_RS01100 konnten mehrmals zusammen mit dem Exosom bei Co-Immunopräzipitationen über Rrp41 -Antikörper aus *S. solfataricus* präzipitiert werden. Durch die Ergebnisse aus den Bachelorarbeiten von Franziska Hartmann und Oliver Puckelwald konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei SSO_RS01100 um ein Protein handelt, welches generell unspezifische Bindungen aufgrund von "Klebrigkeit" handelt. Die ursprünglich gezeigte Interaktion von EF1 α mit dem Exosom [130] lässt sich darauf begünden, dass es sich bei EF1 α um Transkriptionsfaktor handelt und die Interaktion mit EF1 α mit dem Exosom wahrscheinlich über RNA vermittelt wird. Beide Proteine sind somit keine Interaktionspartner des Exosoms.

Für eine genaue Diskussion der Ergebnisse möchte ich auch an dieser Stelle auf die Bachelorarbeiten von Franziska Hartmann und Oliver Puckelwald verweisen [177, 197].

4.4 Untersuchungen des *in vivo* rekonstituierten DnaG-Csl4-Exosoms

Kristallstrukturen des Csl4-Exosoms sind bereits erstellt worden, die strukturelle Anordnung von Csl4 auf dem Hexamer von *Archaeoglobus fulgidus* ist aufgeklärt [142]. Die Organisation und Interaktion von DnaG, mit dem Csl4-Exosom, ist jedoch noch nicht dokumentiert. Bisher ist bekannt, dass DnaG mittels CTD mit Csl4 interagiert, wobei die Interaktion von den Einzelproteinen DnaG und Csl4 selbst nicht nachzuweisen ist. Eine stabile Interaktion von DnaG ist erst mit dem Csl4-Exosom möglich, was darauf schließen lässt, dass zusätzliche Kontaktpunkte von DnaG mit dem hexameren Ring, zusätzlich zu den Kontaktstellen mit Csl4, für eine stabile Interaktion nötig sind [124, 134]. Zudem wurde DnaG-*His₆-tag*, überexprimiert in *S. solfataricus*, mittels *single-particle electron microscopy* (SPEM)-Analyse untersucht. Es stellte sich heraus, dass das in diesem Fall untersuchte Protein, welches eine Größe von 90 kDa aufwies höchst wahrscheinlich einen Dimer bildet. DnaG zeigte sich dabei als symmetrisches Protein mit zentraler Pore, wobei bereits das monomere Protein zwei Lappenformen aufwies [145].

Um die Assoziation von DnaG mit dem Csl4-Exosom aufzuklären, sollten SPEM-Analysen durchgeführt werden. Leider kam es nach Überexpression und Reinigung des DnaG-Csl4-Exosoms zur Aggregation dessen, was sich einerseits durch ein überraschend hohes Molekulargewicht des DnaG-Csl4-Exosoms von mindestens 1300 kDa äußerte (Abbildung 40) und sich als Aggregat unter dem Elektronenmikroskop zeigte (Abbildung 44 C und 44 D). Aufgrund des unerwartet hohen Molekulargewichtes wurde das *in vivo* rekonstituierte DnaG-Csl4-Exosom im Vorfeld der ersten SPEM-Analyse auf einen 20 - 60%-igen Glycerolgradienten aufgetragen, um eine weitere Aussage über sein Größenverhalten treffen zu können (Abbildung 41). In früheren *in vivo* Studien konnte das natürliche Exosom von *S. solfataricus* zusammen mit Membranbestandteilen und ribosomalen Untereinheiten in schweren Fraktionen von Dichtegradienten nachgewiesen werden [131, 138]. Auch im hier durchgeführten Experiment war das DnaG-Csl4-Exosom in den schweren Dichtefractionen des Glycerolgradienten (Fraktionen 9 - 16) vorzufinden und steht somit in Einklang mit früheren Ergebnissen. Übereinstimmend wurden die Molekulargewichte der 50S Untereinheit der archaealen Ribosome von 1,6 MDa [198, 199] und die 30S Untereinheit von 0,9 MDa [199] beschrieben - somit liegt das DnaG-Csl4-Exosom mit mindestens 1,3 MDa im gleichen Bereich des Molekulargewichtes der Untereinheiten der ribosomalen Untereinheiten.

Mittels Aktivitätsassays konnte gezeigt werden, dass trotz der Aggregation des DnaG-Csl4-Exosoms, dieses in der Lage ist, Poly(A)-RNA zu degradieren. Dabei zeigte sich, dass das DnaG-Csl4-Exosom eine höhere Effizienz in der Degradation von Poly(A)-RNA als das Csl4-Exosom besitzt (Abbildung 42). Dies

bestätigt frühere Publikationen, in welchen herausgefunden wurde, dass DnaG dem Exosom eine Poly(A)-Präferenz vermittelt und A-reiche RNA besser als ein Csl4-Exosom prozessiert [134]. Das die Aggregate des DnaG-Csl4-Exosoms katalytisch aktiv sind, und zudem ein übereinstimmendes Sedimentationsverhalten zeigen, wie aus *S. solfataricus* Zelllysate aufgereinigte natürliche Exosome, könnte Hinweis darauf sein, dass auch die natürlichen Exosome von *S. solfataricus* im Zelllysate zur Aggregation neigen.

Für die Reinigung des DnaG-Csl4-Exosoms wurde zunächst das DnaG-Csl4-Exosom *in vivo* in *E. coli* rekonstituiert, im Anschluss mittels Heparin-Säule primär gereinigt und in der folgenden Gelfiltration als sauberer Komplex von verbliebenen Verunreinigungen getrennt (Abbildung 39 und 40). Ein identisches Verfahren wurde mit dem Csl4-Exosom vorgenommen, welches ebenfalls in *in vivo* in *E. coli* rekonstituiert wurde. Nach dem zweiten Reinigungsschritt, der Gelfiltration, zeigte der Komplex ein errechnetes Molekulargewicht von 213,35 kDa (Abbildung 38), was dem bereits publizierten Molekulargewicht von dem Csl4-Exosom, von ca. 240 kDa [130], entsprach. Auch nach elektronenmikroskopischer Betrachtung zeigten sich klare, sauber voneinander getrennte einzelne Csl4-Exosome, eine Aggregation war nicht vorhanden (Abbildung 44 A und 44 B). Dies zeigt, dass für das Csl4-Exosom die gewählte Methode der *in vivo* Rekonstitution in *E. coli* und die sich anschließende Reinigung des Proteinkomplexes funktioniert. Daraus lässt sich rückschließen, dass DnaG die Aggregation des DnaG-Csl4-Exosoms verursachen könnte. Das Protein wurde als bakterielle Primase annotiert und über HisTrap HP und HiTrap HP Q Säulen mit anschließender Gelfiltration gereinigt [143]. Auch hier konnte für DnaG ein lösliches Aggregat (> 95%), mit über 750 kDa, mittels Gelfiltration nachgewiesen werden. Nur ein kleiner Teil von DnaG wurde in monomerer Form mittels Gelfiltration isoliert. Auch mit einer hohen Konzentration von PEG und Glycerol war es nicht möglich die Aggregate von DnaG vollständig aufzulösen. Ebenso zeigte sich, dass DnaG, mit sowie ohne His₆-tag, oder mit MBP-tag weiterhin Aggregate bildet [143]. DnaG scheint somit generell zur Aggregation zu neigen. *In vivo*, in *S. solfataricus*, könnte einer Aggregation durch geringere Konzentrationen von DnaG in der Zelle, der Hilfe von Chaperonen oder durch Bildung von heterogenen Proteinkomplexen entgegen gewirkt werden. Gezeigt werden konnte, dass die archaelen Sm-Proteine (SmAP1 und SmAP2) mit DnaG interagieren und die Löslichkeit des Exosoms, vermittelt über DnaG, erhöhen [193]. Publierte Ergebnisse lassen vermuten, dass der Großteil des Exosoms, zusammen mit DnaG, in *S. solfataricus* membranassoziiert ist [138]. Die RNase E, als Bestandteil des Degradosoms von Bakterien, liegt membranassoziiert vor, wobei sie in der Lage ist an der Membran zu diffundieren und dort Foci zu bilden [64, 65]. Entsprechend können transiente Degradationszentren entstehen, in welchen die PNPase Teil ist. Somit scheint es in prokaryotischen Zellen eine Präferenz für die Kompartimentierung des RNA-Metabolismus zu geben.

In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich durch die *in vivo* Rekonstitution und Überexpression in *E. coli* die Aggregation des DnaG-Csl4-Exosoms zu verringern. Der Komplex zeigte einerseits ein Molekulargewicht von mindestens 1300 kDa nach Gelfiltration und andererseits eine nachweisliche Aggregation in der elektronenmikroskopischen Untersuchung. Ziel des Projektes war eine SPEM-Analyse des DnaG-Csl4-Komplexes. Für SPEM-Analysen sind eine ausreichend hohe Konzentration an Einzelkomplexen nötig (mindestens 0,2 mg/ml) sowie für den Bearbeitungsprozess während der Analyse eine geringe Salzkonzentration von <50 mM NaCl. Der Einsatz von Detergenzien zeigt laut Erfahrungen einen hohen Hintergrund in der Elektronenmikroskopie und beeinflusst das Auflösungsvermögen negativ. Mit dem Detergens N-Dodecyl-beta-Maltoside (DDM) konnten in der Vergangenheit die besten Ergebnisse bei Nutzung von SPEM erzielt werden (mündliche Übermittlung von Dr. Janet Vonck, Susann Kaltwasser). Deshalb wurde DDM in der Arbeit gewählt, um DnaG-Csl4-Aggregate aufzulösen bzw. deren Bildung zu verhindern. DDM ist ein nichtionisches Detergens und wird auch zur Isolation von Membranproteinen eingesetzt [181]. Das Detergens könnte sich somit gut für die Aufreinigung des DnaG-Csl4-Exosoms eignen, da vermutet wird, dass das Exosom Membranassoziiert vorliegt. Exosome mit einem hohen DnaG- und Csl4-Anteil wurden *in vivo* in Fraktionen von Dichtegradienten nachgewiesen, in welchen auch Membranbestandteile oder ribosomale Untereinheiten zu finden sind [131, 138]. DDM gehört zu den gering schädlichen Detergenzien, welche die Proteinaktivität wenig beeinträchtigen. Des Weiteren zeigt DDM wenig Einfluss auf die UV-Absorption im 280 nm Bereich und ist somit für die Arbeit über das Äkta-Chromatographieverfahren sehr gut geeignet [181]. Um zunächst zu testen, ob Detergenzien generell Einfluss auf die Verhinderung der Aggregation des DnaG-Csl4-Komplexes haben, wurde neben DDM auch Triton-X-100 im Vorversuch genutzt, um das DnaG-Csl4-Exosom mittels Heparin- und Gelfiltration zu reinigen. Durch Triton-X-100 zeigt das Chromatogramm keine Verlagerung der Elutionspeaks im Vergleich zur Proteinreinigung ohne Detergens (Daten nicht gezeigt). Auch bei dem Einsatz von DDM konnte keine Peakverlagerung im Chromatogramm festgestellt werden (siehe Abbildung 45 A). Für die SPEM-Analyse wurden im Vorfeld noch ein Glycerolgradient sowie ein Aktivitätstest mit dem DnaG-Csl4-Exosom durchgeführt. Für die zweie SPEM-Analyse wurden die Komplexe direkt für die Analyse genutzt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eine Aggregation erst nach Elution, über längere Zeiträume, verstärkt stattfindet. Jedoch zeigte sich auch hier eine die Aggregation der DnaG-Csl4-Komplexe, weswegen eine SPEM-Analyse nicht möglich war und das Projekt an diesem Punkt gestoppt wurde.

4.5 iCLIP - individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation

Mittels iCLIP sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche RNA-Arten *in vivo* an das Exosom von *S. solfataricus* binden. Durch die Kombination aus Co-Immunopräzipitation und RNA Sequenzierung konnten diese Substrate identifiziert werden. Die Auswertung der bioinformatischen Daten wurde von Dr. Jochen Bathke vorgenommen.

Die Auswertung der Sequenzierungsdaten des iCLIP ergab in den nicht kartierten *reads* in den Proben *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2) einen Adenin-Anteil von über 73% (Abbildung 50). Unter den nicht kartierbaren *reads* befinden sich dabei vermutlich vor allem *reads*, welche den 3'-RNA-*tails* von *S. solfataricus* zugeordnet werden können. 3'-*tails* sind nicht im Genom von *S. solfataricus* codiert, sie werden matrizenunabhängig an das 3' Ende der RNA angefügt. Über 50 *tails* konnten am 3' Ende der 16S rRNA und *nuoH* RNA nachgewiesen werden [120]. 3'-*tails* entstehen durch eine der beiden Funktionen des Exosoms, der 3'-Polynukleotidylierung von RNA. Die *tails* werden posttranskriptional an das 3' Ende der RNA angefügt und weisen einen hohen Adenin-Anteil auf. Von ihnen wird vermutet, dass sie ähnlich wie Poly(A)-*tails* für den Abbau von RNA markieren [29-31]. Neben Adenin wird Guanin, als zweithäufigstes Nukleotid, präferiert in die *tails* eingefügt [136]. Der Guanin-Anteil der nicht kartierbaren *reads* lag deutlich unter dem Adenin-Anteil (ca. 12%), war dabei aber das zweithäufigste Nukleotid (Abbildung 50). Somit sprechen beide Tatsachen (Adenin als häufigstes Nukleotid mit deutlicherer Bevorzugung gegenüber Guanin) dafür, dass von nicht kartierbaren *reads* ein sehr hoher Anteil den 3'-*tails* zuzuordnen ist. Unterstützt wird dies durch die mitgeführte Kontrolle K (1). Der in dieser Kontrollprobe verwendete Antikörper war gegen Thioredoxin gerichtet. Von Thioredoxin ist nicht bekannt, dass es RNA oder DNA bindet, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die *reads* aus Sequenzierungsdaten der Kontrollprobe auf unspezifische RNA-Bindung zurückzuführen sind. In K (1) war vergleichsweise zu den Proben *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2) die Anzahl der kartierten *reads* deutlich geringer (siehe Tabelle 81), was für eine hohe spezifische Bindung von RNA an das Exosom durch verwendete Rrp4- und Rrp41-Antikörper spricht. Hinzu kommt, dass der Adenin-Anteil in K (1) der nicht kartierbaren *reads* wesentlich geringer war als bei *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2). Er lag bei 43%, was mit der Erwartung übereinstimmt, dass in der Probe keine 3'-*tails* vorzufinden sind - der Adenin-Anteil von K (1) sollte entsprechend wesentlich geringer ausfallen. Somit ist davon auszugehen, dass der erhöhte Adenin-Anteil der vier Proben *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2) tatsächlich auf das Vorliegen von 3'-*tails* zurückzuführen ist. Betrachtet man allerdings die Probe K (2), die zweite *trx*-Kontrollprobe, ist zu sehen, dass auch hier der Adenin-Anteil, ähnlich der Proben *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1) und *rd-Rrp41* (2), stark erhöht

vorliegt (77%). Auch in K (2) wäre jedoch eine stärkere Gleichverteilung der Nukleotide, wie in K (1), zu erwarten gewesen. Ursache dessen liegt höchst wahrscheinlich in der Probenvorbereitung für die Sequenzierungsreaktion des iCLIP (Abbildung 49). Die Membran auf welcher die Proben nach Auftrennung in der NU-PAGE geblottet wurden, wurde im Laufe des Verfahrens blind ausgeschnitten (siehe Kapitel 2.3.33.7 Material und Methoden). Dabei ist es möglich, dass es zur Kreuzkontamination von Proben kommen kann. Im vorliegenden Fall ist es sehr wahrscheinlich dass in K (2) mit *rd-Rrp41* (2) kreuzkontaminiert wurde (siehe Ladungsschema in Abbildung 49). Zudem weist K (2) eine 14-fach höhere *Readanzahl* als K (2) auf (siehe Tabelle 81), was ebenfalls Hinweis darauf ist, dass es zur Kreuzkontamination kam. *rd-Rrp41* (2) wurde neben K (2) auf die NU-PAGE aufgetragen. Um im Vorfeld die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzkontamination zu verringern, wurde eine Spur zwischen den Proben K (2) und *rd-Rrp41* (2) frei gelassen, jedoch scheint diese Maßnahme nicht ausreichend gewesen zu sein. Für zukünftige iCLIP-Verfahren müssen separate Gele für Kontrollen und Proben genutzt werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Probe K (2) entsprechend kritischer betrachtet bzw. ausgeklammert.

Während der Sequenzierung des iCLIPs konnten auch zirkuläre RNAs an das Exosom gebunden identifiziert werden. Prominent war dabei vor allem die zirkuläre RNA der 16S rRNA. Diese entsteht, wenn aus prä-16S rRNA ein *spacer* herausgeschnitten und der *spacer* zu der zirkulären Form der 16S rRNA ligiert wird [184]. Die zirkuläre Form der 16S rRNA beinhaltet dabei strukturelle Motive, welche auch von Box C/D small RNAs gefunden werden. Sie ist in der Lage an L7Ae zu binden, ein Protein des Methylierungskomplexes in Archaea [183]. Da auch Nop5 (Kapitel 3.2 und 4.2) Teil des Methylierungskomplexes von Archaea ist, könnte dies als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Exosom, zirkulären RNAs und dem Methylierungskomplex gewertet werden.

Insgesamt konnten 12 zirkuläre RNAs identifiziert (Tabelle 83 Ergebnisteil) werden. Zwei von Ihnen, die zirkulären RNAs der Transposasen SSO_RS05855 und SSO_RS06560, waren bisher nicht bekannt. Sie konnten in dieser Arbeit als zirkuläre RNAs verifiziert werden. SSO_RS05855 und SSO_RS06560 weisen zu 95% Sequenzidentität auf, und stellen somit Homologe dar. Überraschenderweise zeigte sich in den Sequenzen der beiden Sequenzierungsreaktionen, sowohl bei SSO_RS05855 als auch bei SSO_RS06560 ein Sequenzunterschied von 15 bp zwischen der Sequenzierungsreaktion des iCLIP und der Sequenzierungsreaktion des PCR-Produktes nach RNase R Verdau (siehe Abbildung 54). Dabei handelte es sich um eine Deletion, welche zwischen zwei repetitiven Sequenzelementen lag und zudem den Zirkularisierungspunkt der RNA umfasste. Eine falsch positive Identifikation einer zirkulären RNA kann Folge des Template Wechsels der Polymerase während der Sequenzierungsreaktion sein, wenn repetitive Sequenzelemente vorliegen. Sequenzen welche mindestens 5 repetitive Basen am Ende der vorhergesagten zirkulären RNA aufweisen haben ein

erhöhtes Potential [184]. In dieser Arbeit jedoch konnte eine falsch positive Identifikation der zirkulären RNA jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden:

(i) Die repetitiven Elemente liegen nicht im direkten Bereich der zirkulären Verbindung der vorhergesagte Sequenz der zirkulären RNA (siehe Abbildung 54), sondern 4 bis 10 Basen davor.

(ii) Um die Detektion einer falsch positiven zirkulären RNA auszuschließen und als „echte“ zirkuläre RNA zu verifizieren, wurde die RT-PCR wiederholt und im Vorfeld ein Verdau der eingesetzten Gesamt-RNA mit RNase R vorgenommen. RNase R eine 3'-5'-Exoribonuklease ist in der Lage ssRNA zu verdauen, greift jedoch zirkuläre oder lassoartig gefaltete RNA nicht an [200]. Da auch RT-PCR Produkte nach RNase R Verdau, unter dem Einsatz von Primern gegen zirkuläre Produkte gerichtet, entstehen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um eine zirkuläre RNA handelt (Abbildung 53).

(iii) Der Deletionsbereich von 15 bp, welcher der Hauptunterschied zwischen den beiden Sequenzierungsreaktionen ist (iCLIP und RT-PCR-Produkt-Sequenzierung) könnte auf einen zusätzlichen Reifungsschritt der zirkulären RNA zurückzuführen sein. Es wäre denkbar, dass es während der Reifung zu einer Zirkularisierung der ursprünglichen RNA-Sequenz kommt und nachfolgend zu einem weiteren Prozessierungsschritt der zirkulären RNA. Alternativ wäre es auch denkbar, dass es mehrere Ligationspunkte der zirkulären RNA und somit mehrere Formen einer zirkulären RNA *in vivo* gibt. Dies scheint auch Grund dafür zu sein, dass zusätzlich zu den bereits bekannten 23S zirkulären RNA auch mehrere neue Kandidaten für die 23S rRNA in zirkularer Form in dieser Arbeit identifiziert wurden (siehe Tabelle 83). Generell scheint es aber häufiger vorzukommen, dass es mehrere möglichen Ligationsstellen derselben zirkulären RNA gibt; auch im Nachweis zirkulärer RNAs bei Danan et al. kam es zum Auftreten von Differenzen zwischen der vorhergesagten Ligationspunkt durch Transkriptomanalyse und der durch RT-PCR nachgewiesenen zirkulären RNA [184].

Welche Funktion die verifizierte zirkuläre RNA der beiden Transposasen in *S. solfataricus* übernehmen könnte ist noch unklar, Funktionen von zirkulären RNAs sind generell wenig aufgeklärt. Meist sind sie instabile Intermediate ohne Funktion, welche bei Reifung oder Prozessierung von tRNAs oder rRNAs entstehen [183, 201, 202]. Allein die hier vorliegenden Daten konnten von den 12 gefundenen zirkulären RNAs, 8 als zirkuläre RNAs von tRNAs oder rRNAs identifiziert werden. Das zirkuläre RNAs Funktionen ausüben können zeigt die zirkuläre Form der tRNA von Tryptophan in *Haloferax volcanii*: die zirkuläre RNA des Introns von der tRNA^{Trp} wirkt als Box C/D small RNA im Methylierungskomplex und ist in diesem für die richtige Modifikation der reifen tRNA^{Trp} zuständig [201, 202]. Möglicherweise dient die Zirkularisierung einer RNA aber auch ihrer Stabilisierung: Sowohl *S. solfataricus* und *Pyrococcus* sind hyperthermophile Mikroorganismen, in welchen zirkuläre

Formen von C/D box RNAs nachgewiesen werden konnten. 5'- und 3'-Enden sind bei Eukaryoten normalerweise bei C/D box RNAs durch Basenpaarungen in direkter Nähe zueinander zu finden, aber nicht kovalent verbunden [203], bei *S. solfataricus* und *Pyrococcus* konnten jedoch sowohl die lineare Form als auch die zirkularisierte Form der gleichen RNA nachgewiesen werden. Durch Zirkularisierung könnte somit das 5'- und 3'-Ende der RNA stabil in Nähe zueinander gebracht werden [184, 204]. Mögliche weitere Funktion von zirkulären RNAs zeigen *antisense*-box non coding RNAs, deren zirkuläre Form vermutlich an der Regulation der Transpositions-Aktivität von Transposasen mitwirken [184, 205]. Da es sich bei den zirkulären RNAs SSO_RS05855 und SSO_RS06560 um Transkripte von Transposasen handelt, wäre zu vermuten, dass auch hier eine mögliche Funktion in der Transpositions-Regulation liegt.

Zentral war in dieser Arbeit die Frage, ob bestimmte RNAs bevorzugt durch das Exosom gebunden und angereichert werden. Dafür durchgeführt wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse von *S. solfataricus*. Mehrere Kandidaten konnten höhere *reads* in die iCLIP Daten aufweisen als in den Transkriptomdaten und somit als „angereichert“ am Exosom identifiziert werden. Von den in Tabelle 84 gelisteten angereicherten RNAs zeigen > 30% der RNAs *Crosslinks* in Positionen, welche *antisense* des Genes liegen. Zudem scheinen häufig auch tRNAs vom Exosom gebunden zu werden: 21% der gelisteten RNAs waren tRNAs bzw. *antisense* tRNAs. Um zu verifizieren, dass die RNAs, welche aufgeführt sind, tatsächlich besser durch das Exosom gebunden werden, als RNAs welche nicht als angereichert definiert sind, wurden kompetitive RNA-Protein-Bindingassays durchgeführt. Die RNA *antisense* tRNA^{Ser} (Abbildung 57), wurde zur Verifikation ausgewählt und konnte nachweislich besser durch das Rrp4-Csl4-Exosom gebunden werden, als das 100 bp lange Transkript *tmoA*, welches als nicht am Exosom angereichert definiert war (Abbildung 61). Die tRNA^{Ser} ist nur ein Mal im Genom von *S. solfataricus* codiert. *Antisense* tRNAs sind bereits aus *Buchnera* bekannt [206]. Bezüglich dem Transkriptom von *S. solfataricus* war nun auch von Interesse wie abundant die *antisense* tRNA^{Ser} sind. Dafür wurde Gesamt-RNA isoliert und Northern Blots, mit Sonden gerichtet gegen die tRNA^{Ser} und die *antisense* tRNA^{Ser}, durchgeführt. Einen klaren Nachweis ergab nur der Northern Blot für die tRNA^{Ser}, eine abundante, definierte *antisense* tRNA^{Ser} konnte dagegen nicht in der Gesamt-RNA nachgewiesen werden. Damit ist zu vermuten, dass die *antisense* tRNA^{Ser} nicht sehr abundant im Transkriptom von *S. solfataricus* ist. Jedoch entspricht das Ergebnis den Daten der Transkriptomanalyse, bei welchen höhere *reads* für die tRNA^{Ser} erzielt werden konnten, aber *reads* für die *antisense* tRNA^{Ser} kaum vorhanden waren (Abbildung 59). Die hohen *Readanzahlen* für die *antisense* tRNA^{Ser} bezog sich auf die iCLIP-Sequenzierungsdaten. Somit müsste für den Nachweis der *antisense* tRNA^{Ser} wahrscheinlich zunächst eine Anreicherung der *antisense* tRNA^{Ser} vorgenommen werden, z.B. mittels RIP- (RNA-Immunopräzipitation) Analyse.

Antisense tRNAs sind im Genom von *S. solfataricus* nicht bekannt und der Nachweis im Transkriptom mittels Northern Blot war nicht möglich, jedoch zeigen die iCLIP-Daten, dass die *antisense* tRNAs gehäuft vorkommen. Auch für die tRNA^{Asn} mit einem Crosslink in Position 49 415 konnten *antisense* Transkripte im iCLIP detektiert werden. Für das *antisense* Transkript der tRNA^{Thr} konnten dabei sogar zwei *antisense* Transkripte (Threonin ist zwei Mal im Genom von *S. solfataricus* codiert) detektiert werden, mit Crosslinks in den Positionen 206 348 und in Position 789 728. Für andere tRNA-Gene hingegen sind die iCLIP *reads* auf den Strang vorhanden, in welchem die tRNA codiert liegt. Die Untersuchung bezog sich auf die 8 angereicherten tRNA-Kandidaten aus Tabelle 84.

Der hohe Prozentsatz von gebundenen *antisense* RNAs (> 30%) durch das Exosom könnte auf eine regulatorische Funktion hindeuten. asRNAs sind häufig an der Regulation der Stabilität von mRNA und somit am Level der Translation beteiligt [207]. Folglich wäre es möglich, dass das Exosom eine indirekt regulierende Wirkung auf die Translation ausübt, indem asRNAs degradiert werden. Auch verhältnismäßig hohe Bindung von tRNAs durch das Exosom könnte auf eine regulatorische Funktion hindeuten. Für den iCLIP wurde *S. solfataricus* bis in die stationäre Wachstumsphase angezogen. Innerhalb dieser Phase wird oft weniger Proteinbiosynthese betrieben um Energie zu sparen [208]. Es wäre denkbar, dass dabei auch der Level an tRNAs innerhalb der Zelle verringert wird, da aufgrund geringerer Translation weniger tRNAs benötigt werden. Auch ein Mangel an Aminosäuren in dieser Wachstumsphase wäre möglich. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass aufgrund von Aminosäure-Hunger und in Zusammenhang mit der *stringent response* auch die Stabilität von tRNAs aktiv negativ beeinflusst wird [209].

5 Zusammenfassung / Summary

Die Prozessierung und Degradation von RNA sind essentielle Prozesse in den Zellen aller Domänen des Lebens. Während in Bakterien und Eukaryoten diese Prozesse bereits sehr gut untersucht sind, sind in Archaea vergleichsweise noch viele Fragen ungeklärt.

Das Exosom von *Sulfolobus solfataricus* wurde 2003 entdeckt und ist ein RNA degradierender und polyadenylierender Multiproteinkomplex, bestehend aus einer hexameren Grundstruktur (Rrp41 und Rrp42) mit darauf aufgelagerter trimerer Kappe (Csl4 und Rrp4). DnaG, annotiert als bakterielle Primase, ist eine rein Archaea-spezifische Untereinheit und interagiert über Csl4 mit dem Exosom. Als zusätzlicher, potentieller Interaktionspartner konnte Nop5 zusammen mit dem Exosom über *in vivo* Coimmunopräzipitation identifiziert werden. Nop5 ist als *Scaffold* Protein im Methylierungskomplex in Archaea bekannt. Ein Fokus dieser Arbeit lag darin, die Interaktion von Nop5 mit dem Exosom zu verifizieren und die Funktion von Nop5 im Zusammenhang mit dem Exosom, aufzuklären. In dieser Arbeit konnte Nop5, mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitation und Biacore, als Interaktionspartner des Rrp4-Exosoms bestätigt werden. Durch *Bacterial two Hybrid System Assays* war es zudem möglich die CTD sowie die CC-Domäne von Nop5 als wahrscheinlichste interagierende Domänen mit Rrp4 zu identifizieren. Des Weiteren konnte über Polyadenylierungs- und Degradationsassays, unter Verwendung von poly(A)- und *nuoH* RNA als Substrat, gezeigt werden, dass Nop5 in der Lage ist, die Polyadenylierung, jedoch nicht die Degradation, des Rrp4-Exosoms positiv zu beeinflussen.

Während die Grundstruktur des aus 9-Untereinheiten aufgebauten Exosoms, aufgeklärt ist, ist die räumliche Anordnung von DnaG über Csl4 mit dem Exosom unklar. Ein weiteres Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Struktur des DnaG-Csl4-Exosom mittels SPEM-Analyse (*single particle electron microscopy*) zu untersuchen. Dafür notwendig war zunächst die Etablierung einer Methode über welche das DnaG-Csl4-Exosom *in vivo*, in *E. coli*, überexprimiert und anschließend, mittels Heparinsäule und Größenausschlusschromatographie, aufgereinigt werden konnte. Als Kontrolle wurde parallel dazu das Csl4-Exosom, über oben genannte, Methodik aufgereinigt. Während das Csl4-Exosom im Elektronenmikroskop klare Einzelkomplexe zeigte, konnten für das DnaG-Csl4-Exosom nur Aggregate nachgewiesen werden.

Auch die Substratspezifität des Exosoms sollte in dieser Arbeit tiefer untersucht werden. Zu Projektbeginn war bekannt, dass die Untereinheiten Rrp4 und DnaG des Exosoms eine Präferenz für Adenin-reiche Substrate aufweisen, welche Csl4 nicht besitzt. Die Organisation der Domänen und deren strukturelle Anordnung auf dem Exosom von Csl4 und Rrp4 ist jedoch sehr ähnlich zueinander. Entsprechend war es von Interesse welche Domäne von Rrp4 für die Poly(A)-Präferenz verantwortlich ist. Nachdem sich während der Bachelorarbeit von J. Grützner bereits gezeigt hatte,

dass eine Substitution von einzelnen Aminosäuren zwischen Csl4 und Rrp4 keinen weiteren Aufschluss über die Positionierung der Poly(A) Präferenz geben konnte, sollte jetzt die Substitution der vollständigen S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4 zunächst die Lokalisierung der Poly(A)-Präferenz in der S1-Domäne verifiziert werden. Leider war ein Transfer der Poly(A)-Präferenz von Rrp4 auf Csl4 mittels Substitution der S1-Domäne zwischen Rrp4 und Csl4 nicht möglich, da die Hybridproteine Rrp4S1Csl4 und Csl4S1Rrp4 keine stabile Interaktion mit dem hexameren Ring zeigten.

Mittels iCLIP (*individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation*) konnten in dieser Arbeit erstmals natürliche Substrate des Exosoms von *S. solfataricus* bestimmt werden, welche bevorzugt durch das Exosom gebunden und „angereichert“ werden. Durch diese Analyse wurde ein ungewöhnlich hoher Anteil an nicht kartierbaren cDNA *reads* festgestellt, welche einen erhöhten Adenin-Anteil aufweisen und sich durch die Polyadenylierungsfunktion des Exosoms von *S. solfataricus* begründen ließen. Eines der angereicherten Substrate, die *antisense* tRNA^{Ser}, konnte anschließend mittels EMSA-Assays verifiziert werden. Des Weiteren wurden zirkuläre RNAs identifiziert, welche an das Exosom gebunden waren. Darunter waren, neben bereits bekannten zirkulären RNAs, wie der 16S rRNA und der 23S rRNA, auch noch bisher unbekannte zirkuläre RNAs. Zwei dieser unbekannt zirkulären RNAs (die RNA der Transposasen SSO_RS05855 und SSO_RS06560) konnten experimentell, mittels RNase R Verdau und RT-PCR, als zirkuläre RNAs verifiziert werden.

The processing and degradation of RNA are essential processes in the cells of all domains of life. While in bacteria and eukaryotes these processes are already well studied, in Archaea comparatively many questions remain unanswered.

The exosome of *Sulfolobus solfataricus* was discovered in 2003 and is an RNA degrading and polyadenylating multi-protein complex consisting of a hexameric ring (Rrp41 and Rrp42) with a trimeric cap (Csl4 and Rrp4). DnaG, annotated as a bacterial primase, is an archaea-specific subunit and interacts with the exosome via Csl4. As an additional, potential interaction partner, Nop5 could be identified together with the exosome via *in vivo* co-immunoprecipitation. Nop5 is known as a scaffold protein in the methylation complex in Archaea. One focus of this work was to verify the interaction of Nop5 with the exosome and to elucidate the function of Nop5 in the context to the exosome. In this work, Nop5 could be confirmed as an interaction partner of the Rrp4 exosome by *in vitro* co-immunoprecipitation and biacore studies. Bacterial two hybrid system assays also allowed the identification of the Nop5 CTP and the Nop5 CC domain as the most likely interacting domains with Rrp4. Furthermore, polyadenylation and degradation assays, using poly (A) and *nuoH* RNA as the substrate, have shown that Nop5 is able to positively affect the polyadenylation, but not the degradation, of the Rrp4 exosome.

While the basic structure of the 9-subunit exosome has been elucidated, the spatial arrangement of DnaG via Csl4 with the exosome is unclear. Another aim of the present study was to investigate the structure of the DnaG-Csl4 exosome by single particle electron microscopy (SPEM) analysis. Initially, it was necessary to establish a method by which the DnaG-Csl4 exosome could be overexpressed *in vivo*, in *E. coli*, and subsequently purified by means of heparin column and size-exclusion chromatography. As a control, the Csl4 exosome was purified in parallel using the above-mentioned methodology. While the Csl4 exosome showed clear single complexes in the electron microscope, only aggregates could be detected for the DnaG Csl4 exosome.

The substrate specificity of the exosome should also be further investigated in this work. At the beginning of the project, it was known that the subunits Rrp4 and DnaG of the exosome have a preference for adenine-rich substrates that Csl4 does not possess. The organization of the domains and their structural arrangement on the exosome of Csl4 and Rrp4, however, are very similar. Accordingly, it was of interest which domain of Rrp4 is responsible for the poly (A) preference. After it had already been shown during the bachelor thesis of J. Grützner that a substitution of single amino acids between Csl4 and Rrp4 could not provide further information about the positioning of the poly (A) preference, the substitution of the complete S1 domain between Rrp4 and Csl4 should here verify the localization of the poly (A) preference in the S1 domain. Unfortunately, transfer of the

poly (A) preference of Rrp4 to Csl4 was not possible by substitution of the S1 domain between Rrp4 and Csl4, as the hybrid proteins, Rrp4S1Csl4 and Csl4S1Rrp4 showed no stable interaction with the hexameric ring.

By means of iCLIP (individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation) it was possible for the first time to determine natural substrates of the *S. solfataricus* exosome, which are preferentially bound and "enriched" by the exosome. By this analysis, an unusually high proportion of non-mappable cDNA reads were found, which have an increased adenine content and could be justified by the polyadenylation function of the exosome of *S. solfataricus*. One of the enriched substrates, the antisense tRNA^{Ser}, could subsequently be verified by EMSA assays. Furthermore, circular RNAs were identified which were bound to the exosome. In addition to previously known circular RNAs such as 16S rRNA and 23S rRNA, these included previously unknown circular RNAs. Two of these unknown circular RNAs (the RNA of the transposases SSO_RS05855 and SSO_RS06560) could be verified experimentally by means of RNase R digestion and RT-PCR as circular RNAs.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A / C / G / T / U	Adenin / Cytosin / Guanin / Thymin / Uracil
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
Ap ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP / CTP / GTP / TTP / UTP	Adenosintriphosphat / Cytidintriphosphat / Guanosintriphosphat / Thymidintriphosphat / Uridintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
c.p.m.	<i>counts per minute</i>
CC	Coiled-Coil Domäne
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CTD	C-terminale Domäne
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser (Reinstwasser)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds / ss	Doppelstrang / Einzelstrang
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
<i>et al.</i>	und andere
EVK	<i>empty</i> Vektor Kontrolle
f / k / m / n / μ / p	femto / kilo / milli / mikro / nano / pico
FL	<i>full length</i>
g	Gramm
h / min / s	Stunde / Minute / Sekunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
iCLIP	<i>individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	Molekulargewicht
Ni ²⁺ -NTA	Ni ²⁺ -NTA-Agarose
nt	Nukleotide
NTD	N-terminale Domäne
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
P _i	Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minuten (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
snoRNAs	<i>small nucleolar RNAs</i>
snoRNP	<i>Small nucleolar ribonucleoproteins</i>
snRNAs	<i>small nuclear RNAs</i>
SPEM	<i>single particle electron microscopy</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
W	Watt
w/v	Gewichts/Volumen-Verhältnis

7 Literaturverzeichnis

1. **Woese, C.R. and Fox, G.E.**, Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(11): p. 5088-90.
2. **Lewis, R.**, Discovery: Science as a window to the world 2001.
3. **Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L.**, Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(12): p. 4576-9.
4. <http://www.nottingham.ac.uk/~mrzta/Tree-of-life-Aug-2011-2.jpg>.
5. **Madigan M. T., Stahl D.A., Clark D. P., Martinko J. M.**, Brock, Mikrobiologie. Pearson, 2013. 13: p. 44, 291, 33 - 113.
6. **Shin, D.S., et al.**, Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. EMBO J, 2003. 22(17): p. 4566-76.
7. **Nuttall, S.D., et al.**, The ShBle resistance determinant from *Streptoalloteichus hindustanus* is expressed in *Haloferax volcanii* and confers resistance to bleomycin. Biochem J, 2000. 346 Pt 2: p. 251-4.
8. **Hirata, A., Klein, B.J., and Murakami, K.S.**, The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. Nature, 2008. 451(7180): p. 851-4.
9. **van de Vossenberg, J.L., Driessen, A.J., and Konings, W.N.**, The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. Extremophiles, 1998. 2(3): p. 163-70.
10. **Meyer, B.H., and Albers, S.**, Archaeal cell walls eLS. John Wiley & Sons Ltd, 2014.
11. **Phillips, G. and de Crecy-Lagard, V.**, Biosynthesis and function of tRNA modifications in Archaea. Curr Opin Microbiol, 2011. 14(3): p. 335-41.
12. **Gottschalk, G.**, Welt der Bakterien, Archaeen und Viren. Ein einführendes Lehrbuch der Mikrobiologie. Wiley-VCH, 2015.
13. **Swan, B.K., and Valentine, D. L.**, Diversity of Archaea. eLS. John Wiley & Sons Ltd, 2009.
14. **DeLong, E.F. and Pace, N.R.**, Environmental diversity of bacteria and archaea. Syst Biol, 2001. 50(4): p. 470-8.
15. **Brochier-Armanet, C., et al.**, Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. Nat Rev Microbiol, 2008. 6(3): p. 245-52.
16. **Brock, T.D., et al.**, *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch Mikrobiol, 1972. 84(1): p. 54-68.

17. **Zillig, W., et al.**, The *Sulfolobus*-“*Caldariella*” group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Archives of Microbiology*, 1980. 125.
18. **Moll, R. and Schäfer, G.**, Chemiosmotic H⁺ cycling across the plasma membrane of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Letters*, 1988 232(2): p. 359 - 363.
19. **Lubben, M. and Schafer, G.**, Chemiosmotic energy conversion of the archaebacterial thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*: oxidative phosphorylation and the presence of an F₀-related N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid. *J Bacteriol*, 1989. 171(11): p. 6106-16.
20. **Grogan, D.W.**, Phenotypic characterization of the archaebacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J Bacteriol*, 1989. 171(12): p. 6710-9.
21. **She, Q., et al.**, The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(14): p. 7835-40.
22. **Eberhardt, W., et al.**, Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*, 2007. 114(1): p. 56-73.
23. **Brewer, G., et al.**, Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1. *J Interferon Cytokine Res*, 2003. 23(10): p. 553-64.
24. <http://www.sulfosys.com/sulfolobus-solfataricus.html>.
25. **Seyffert, W.**, *Lehrbuch der Genetik*. Spektrum, 2003. 2: p. 59 - 72.
26. **Belasco, J.G.**, All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(7): p. 467-78.
27. **Arnold, T.E., Yu, J., and Belasco, J.G.**, mRNA stabilization by the *ompA* 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA*, 1998. 4(3): p. 319-30.
28. **Regnier, P. and Arraiano, C.M.**, Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays*, 2000. 22(3): p. 235-44.
29. **Mohanty, B.K. and Kushner, S.R.**, Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(22): p. 11966-71.
30. **August, J.T., Ortiz, P.J., and Hurwitz, J.**, Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation. I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem*, 1962. 237: p. 3786-93.

31. **Yehudai-Resheff, S. and Schuster, G.**, Characterization of the *E.coli* poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence. *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(5): p. 1139-44.
32. **Deutscher, M.P.**, Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(2): p. 659-66.
33. **Mudd, E.A., Krisch, H.M., and Higgins, C.F.**, RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that *rne* and *ams* are the same genetic locus. *Mol Microbiol*, 1990. 4(12): p. 2127-35.
34. **Callaghan, A.J., et al.**, Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature*, 2005. 437(7062): p. 1187-91.
35. **McDowall, K.J., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N.**, A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J Biol Chem*, 1994. 269(14): p. 10790-6.
36. **Bouvet, P. and Belasco, J.G.**, Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature*, 1992. 360(6403): p. 488-91.
37. **Emory, S.A., Bouvet, P., and Belasco, J.G.**, A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 1992. 6(1): p. 135-48.
38. **Hansen, M.J., et al.**, The *ompA* 5' untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1994. 12(5): p. 707-16.
39. **Celesnik, H., Deana, A., and Belasco, J.G.**, Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell*, 2007. 27(1): p. 79-90.
40. **Luciano, D.J., et al.**, A Novel RNA Phosphorylation State Enables 5' End-Dependent Degradation in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, 2017. 67(1): p. 44-54 e6.
41. **Carpousis, A.J.**, The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol*, 2007. 61: p. 71-87.
42. **Lee, K., Bernstein, J.A., and Cohen, S.N.**, RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2002. 43(6): p. 1445-56.
43. **Vincent, H.A. and Deutscher, M.P.**, Insights into how RNase R degrades structured RNA: analysis of the nuclease domain. *J Mol Biol*, 2009. 387(3): p. 570-83.
44. **Py, B., et al.**, A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*, 1996. 381(6578): p. 169-72.
45. **Marujo, P.E., et al.**, RNase II removes the oligo(A) tails that destabilize the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*. *RNA*, 2000. 6(8): p. 1185-93.

46. **Ghosh, S. and Deutscher, M.P.**, Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(8): p. 4372-7.
47. **Shahbadian, K., et al.**, RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*, 2009. 28(22): p. 3523-33.
48. **Durand, S., et al.**, Three essential ribonucleases-RNase Y, J1, and III-control the abundance of a majority of *Bacillus subtilis* mRNAs. *PLoS Genet*, 2012. 8(3): p. e1002520.
49. **Mathy, N., et al.**, 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell*, 2007. 129(4): p. 681-92.
50. **Mathy, N., et al.**, *Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Mol Microbiol*, 2009. 75(2): p. 489-98.
51. **Even, S., et al.**, Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B.subtilis* with functional homology to *E.coli* RNase E. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(7): p. 2141-52.
52. **Richards, J., et al.**, An RNA pyrophosphohydrolase triggers 5'-exonucleolytic degradation of mRNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell*, 2011. 43(6): p. 940-9.
53. **Fang, M., et al.**, Degradation of nanoRNA is performed by multiple redundant RNases in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(15): p. 5114-25.
54. **Li, Z. and Deutscher, M.P.**, The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(15): p. 6883-6.
55. **Deutscher, M.P.**, Promiscuous exoribonucleases of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1993. 175(15): p. 4577-83.
56. **Kelly, K.O., et al.**, RNase PH is essential for tRNA processing and viability in RNase-deficient *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem*, 1992. 267(23): p. 16015-8.
57. **Ishii, R., Nureki, O., and Yokoyama, S.**, Crystal structure of the tRNA processing enzyme RNase PH from *Aquifex aeolicus*. *J Biol Chem*, 2003. 278(34): p. 32397-404.
58. **Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P.**, 3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(6): p. 2856-61.
59. **Carpousis, A.J., et al.**, Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell*, 1994. 76(5): p. 889-900.
60. **Bernstein, J.A., et al.**, Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(9): p. 2758-63.
61. **Ghora, B.K. and Apirion, D.**, Structural analysis and *in vitro* processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an rne mutant of *E. coli*. *Cell*, 1978. 15(3): p. 1055-66.

62. **Ow, M.C. and Kushner, S.R.**, Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes Dev*, 2002. 16(9): p. 1102-15.
63. **Kaberlin, V.R., et al.**, The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis sp.* and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(20): p. 11637-42.
64. **Khemici, V., et al.**, The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol*, 2008. 70(4): p. 799-813.
65. **Strahl, H., et al.**, Membrane recognition and dynamics of the RNA degradosome. *PLoS Genet*, 2015. 11(2): p. e1004961.
66. http://iao.sinica.edu.tw/About_Direct.htm.
67. **Coburn, G.A., et al.**, Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev*, 1999. 13(19): p. 2594-603.
68. **Shi, Z., et al.**, Crystal structure of *Escherichia coli* PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *RNA*, 2008. 14(11): p. 2361-71.
69. **Liou, G.G., et al.**, DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *J Biol Chem*, 2002. 277(43): p. 41157-62.
70. **Regnier, P. and Hajsndorf, E.**, Poly(A)-assisted RNA decay and modulators of RNA stability. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2009. 85: p. 137-85.
71. **Mohanty, B.K. and Kushner, S.R.**, Polynucleotide phosphorylase, RNase II and RNase E play different roles in the *in vivo* modulation of polyadenylation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2000. 36(4): p. 982-94.
72. **Mohanty, B.K. and Kushner, S.R.**, Bacterial/archaeal/organelar polyadenylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011. 2(2): p. 256-76.
73. **Soreq, H. and Littauer, U.Z.**, Purification and characterization of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. Probe for the analysis of 3' sequences of RNA. *J Biol Chem*, 1977. 252(19): p. 6885-8.
74. **Symmons, M.F., Jones, G.H., and Luisi, B.F.**, A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure*, 2000. 8(11): p. 1215-26.
75. **Neidhardt**, ed. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Kapitel Glycolysis (Fraenkel, DG). ASM Press; Washington DC. 1996. 189-198

76. **Morita, T., et al.**, Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2004. 54(4): p. 1063-75.
77. **Bruce, H.A., et al.**, Analysis of the natively unstructured RNA/protein-recognition core in the *Escherichia coli* RNA degradosome and its interactions with regulatory RNA/Hfq complexes. *Nucleic Acids Res*, 2017. 46(1): p. 387-402.
78. **Blum, E., et al.**, Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol*, 1997. 26(2): p. 387-98.
79. **Miczak, A., et al.**, Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(9): p. 3865-9.
80. **Lu, F. and Taghbalout, A.**, The *Escherichia coli* major exoribonuclease RNase II is a component of the RNA degradosome. *Biosci Rep*, 2014. 34(6): p. e00166.
81. **Prud'homme-Genereux, A., et al.**, Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol*, 2004. 54(5): p. 1409-21.
82. **Cho, K.H.**, The Structure and Function of the Gram-Positive Bacterial RNA Degradosome. *Front Microbiol*, 2017. 8: p. 154.
83. **Viegas, S.C., et al.**, Surprises in the 3'-end: 'U' can decide, too! *FEBS* 2015. 282(18): p. 3489-3499.
84. **Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R.**, Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast *MFA2* gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev*, 1994. 8(7): p. 855-66.
85. **Decker, C.J. and Parker, R.**, A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev*, 1993. 7(8): p. 1632-43.
86. **Wahle, E. and Winkler, G.S.**, RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1829(6-7): p. 561-70.
87. **Godwin, A.R., et al.**, Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1829(6-7): p. 571-9.
88. **Mitchell, P., et al.**, The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*, 1997. 91(4): p. 457-66.
89. **Anderson, J.S. and Parker, R.P.**, The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J*, 1998. 17(5): p. 1497-506.
90. **Beelman, C.A., et al.**, An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature*, 1996. 382(6592): p. 642-6.

91. **Tharun, S.**, Lsm1-7-Pat1 complex: a link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA Biol*, 2009. 6(3): p. 228-32.
92. **Hsu, C.L. and Stevens, A.**, Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Mol Cell Biol*, 1993. 13(8): p. 4826-35.
93. **Liu, H., et al.**, The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J*, 2002. 21(17): p. 4699-708.
94. **Wang, Z. and Kiledjian, M.**, Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell*, 2001. 107(6): p. 751-62.
95. **Martin, G. and Keller, W.**, RNA-specific ribonucleotidyl transferases. *RNA*, 2007. 13(11): p. 1834-49.
96. **Rissland, O.S. and Norbury, C.J.**, Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. 16(6): p. 616-23.
97. **Malecki, M., et al.**, The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *EMBO J*, 2013. 32(13): p. 1842-54.
98. **Agrawal, N., et al.**, RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003. 67(4): p. 657-85.
99. **Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D.**, Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*, 2006. 127(6): p. 1223-37.
100. **Dziembowski, A., et al.**, A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. 14(1): p. 15-22.
101. **Schneider, C., et al.**, The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(4): p. 1127-40.
102. **Wasmuth, E.V. and Lima, C.D.**, Exo- and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear RNA exosomes are dependent on the noncatalytic core and central channel. *Mol Cell*, 2012. 48(1): p. 133-44.
103. **Wasmuth, E.V., Januszyk, K., and Lima, C.D.**, Structure of an Rrp6-RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. *Nature*, 2014. 511(7510): p. 435-9.
104. **Bonneau, F., et al.**, The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell*, 2009. 139(3): p. 547-59.
105. **Makino, D.L., Baumgartner, M., and Conti, E.**, Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature*, 2013. 495(7439): p. 70-5.

106. **Stead, J.A., et al.**, The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(16): p. 5556-67.
107. **Araki, Y., et al.**, Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J*, 2001. 20(17): p. 4684-93.
108. **Halbach, F., et al.**, The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell*, 2013. 154(4): p. 814-26.
109. **Wyers, F., et al.**, Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell*, 2005. 121(5): p. 725-37.
110. **Tomecki, R., et al.**, The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J*, 2010. 29(14): p. 2342-57.
111. **Goldenberg, D., Azar, I., and Oppenheim, A.B.**, Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1996. 19(2): p. 241-8.
112. **Selinger, D.W., et al.**, Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res*, 2003. 13(2): p. 216-23.
113. **Geisberg, J.V., et al.**, Global analysis of mRNA isoform half-lives reveals stabilizing and destabilizing elements in yeast. *Cell*, 2014. 156(4): p. 812-24.
114. **Sharova, L.V., et al.**, Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res*, 2009. 16(1): p. 45-58.
115. **Hundt, S., et al.**, Global analysis of mRNA decay in *Halobacterium salinarum* NRC-1 at single-gene resolution using DNA microarrays. *J Bacteriol*, 2007. 189(19): p. 6936-44.
116. **Andersson, A.F., et al.**, Global analysis of mRNA stability in the archaeon *Sulfolobus*. *Genome Biol*, 2006. 7(10): p. R99.
117. **Clouet-d'Orval, B.**, RNA Metabolism and Gene Expression in Archaea, An Overview of ribonuclease repertoire and rna processing pathways in Archaea. Springer, 2017: p. 93.
118. **Kjems, J. and Garrett, R.A.**, An intron in the 23S ribosomal gene of the archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *Nature*, 1985. 318(6047): p. 675-7.
119. **Watanabe, Y., et al.**, Introns in protein-coding genes in Archaea. *FEBS Lett*, 2002. 510(1-2): p. 27-30.
120. **Portnoy, V., et al.**, RNA polyadenylation in Archaea: not observed in *Haloferax* while the exosome polynucleotidylates RNA in *Sulfolobus*. *EMBO Rep*, 2005. 6(12): p. 1188-93.
121. **Portnoy, V. and Schuster, G.**, RNA polyadenylation and degradation in different Archaea; roles of the exosome and RNase R. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(20): p. 5923-31.

122. **Blum, E., Carpousis, A.J., and Higgins, C.F.**, Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the *Escherichia coli* mRNA degradosome *in vitro*. *J Biol Chem*, 1999. 274(7): p. 4009-16.
123. **Roppelt, V., Klug, G., and Evguenieva-Hackenberg, E.**, The evolutionarily conserved subunits Rrp4 and Csl4 confer different substrate specificities to the archaeal exosome. *FEBS Lett*, 2010. 584(13): p. 2931-6.
124. **Hou, L., Klug, G., and Evguenieva-Hackenberg, E.**, Archaeal DnaG contains a conserved N-terminal RNA-binding domain and enables tailing of rRNA by the exosome. *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(20): p. 12691-706.
125. **Hasenohrl, D., Konrat, R., and Blasi, U.**, Identification of an RNase J ortholog in *Sulfolobus solfataricus*: implications for 5'-to-3' directional decay and 5'-end protection of mRNA in Crenarchaeota. *RNA*, 2010. 17(1): p. 99-107.
126. **Clouet-d'Orval, B., et al.**, Insights into RNA-processing pathways and associated RNA-degrading enzymes in Archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 2018. 42(5): p. 579-613.
127. **Hasenohrl, D., et al.**, Translation initiation factor a/eIF2(-gamma) counteracts 5' to 3' mRNA decay in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(6): p. 2146-50.
128. **Lorentzen, E. and Conti, E.**, Structural basis of 3' end RNA recognition and exoribonucleolytic cleavage by an exosome RNase PH core. *Mol Cell*, 2005. 20(3): p. 473-81.
129. **Koonin, E.V., Wolf, Y.I., and Aravind, L.**, Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. *Genome Res*, 2001. 11(2): p. 240-52.
130. **Walter, P., et al.**, Characterization of native and reconstituted exosome complexes from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol*, 2006. 62(4): p. 1076-89.
131. **Evguenieva-Hackenberg, E., et al.**, An exosome-like complex in *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO Rep*, 2003. 4(9): p. 889-93.
132. **Witharana, C., et al.**, Heterogeneous complexes of the RNA exosome in *Sulfolobus solfataricus*. *Biochimie*, 2012. 94(7): p. 1578-87.
133. **Oddone, A., et al.**, Structural and biochemical characterization of the yeast exosome component Rrp40. *EMBO Rep*, 2007. 8(1): p. 63-9.
134. **Hou, L., Klug, G., and Evguenieva-Hackenberg, E.**, The archaeal DnaG protein needs Csl4 for binding to the exosome and enhances its interaction with adenine-rich RNAs. *RNA Biol*, 2013. 10(3): p. 415-24.
135. **Lorentzen, E. and Conti, E.**, Crystal structure of a 9-subunit archaeal exosome in pre-catalytic states of the phosphorolytic reaction. *Archaea*, 2013. 2012: p. 721869.

136. **Evguenieva-Hackenberg, E., et al.**, Rrp4 and Csl4 are needed for efficient degradation but not for polyadenylation of synthetic and natural RNA by the archaeal exosome. *Biochemistry*, 2008. 47(50): p. 13158-68.
137. **Audin, M.J., et al.**, The oligomeric architecture of the archaeal exosome is important for processive and efficient RNA degradation. *Nucleic Acids Res*, 2016. 44(6): p. 2962-73.
138. **Roppelt, V., et al.**, The archaeal exosome localizes to the membrane. *FEBS Lett*, 2010. 584(13): p. 2791-5.
139. **Aravind, L., Leipe, D.D., and Koonin, E.V.**, Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res*, 1998. 26(18): p. 4205-13.
140. **Lorentzen, E., et al.**, RNA channelling by the archaeal exosome. *EMBO Rep*, 2007. 8(5): p. 470-6.
141. **Lorentzen, E., et al.**, The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. 12(7): p. 575-81.
142. **Buttner, K., Wenig, K., and Hopfner, K.P.**, Structural framework for the mechanism of archaeal exosomes in RNA processing. *Mol Cell*, 2005. 20(3): p. 461-71.
143. **Zuo, Z., et al.**, Characterization of a functional DnaG-type primase in archaea: implications for a dual-primase system. *J Mol Biol*, 2010. 397(3): p. 664-76.
144. **Bauer, R.J., Graham, B.W., and Trakselis, M.A.**, Novel interaction of the bacterial-like DnaG primase with the MCM helicase in archaea. *J Mol Biol*, 2013. 425(8): p. 1259-73.
145. **Witharana, C.**, The heterogeneity of the RNA degradation exosome in *Sulfolobus solfataricus*. Dissertation, 2013.
146. **Ramos, C.R., et al.**, The *Pyrococcus* exosome complex: structural and functional characterization. *J Biol Chem*, 2006. 281(10): p. 6751-9.
147. **Yehudai-Resheff, S., et al.**, Domain analysis of the chloroplast polynucleotide phosphorylase reveals discrete functions in RNA degradation, polyadenylation, and sequence homology with exosome proteins. *Plant Cell*, 2003. 15(9): p. 2003-19.
148. **Lassek, C.**, Wachstumsphasen-anhängiges Sedimentationsverhalten und Zusammensetzung des Exosoms aus *Sulfolobus solfataricus*. Masterarbeit, 2010.
149. **Decatur, W.A. and Fournier, M.J.**, rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(7): p. 344-51.
150. **Omer, A.D., et al.**, *In vitro* reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(8): p. 5289-94.
151. **Omer, A.D., et al.**, Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science*, 2000. 288(5465): p. 517-22.

152. **Cavaille, J., Nicoloso, M., and Bachelier, J.P.**, Targeted ribose methylation of RNA *in vivo* directed by tailored antisense RNA guides. *Nature*, 1996. 383(6602): p. 732-5.
153. **Ziesche, S.M., Omer, A.D., and Dennis, P.P.**, RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and non-ribosomal RNAs in Archaea. *Mol Microbiol*, 2004. 54(4): p. 980-93.
154. **Ye, K., et al.**, Structural organization of box C/D RNA-guided RNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(33): p. 13808-13.
155. **Lin, J., et al.**, Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes. *Nature*, 2011. 469(7331): p. 559-63.
156. **Aittaleb, M., et al.**, Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins. *Nat Struct Biol*, 2003. 10(4): p. 256-63.
157. **Lapinaite, A., et al.**, The structure of the box C/D enzyme reveals regulation of RNA methylation. *Nature*, 2013. 502(7472): p. 519-23.
158. **Gauernack, A.S., et al.**, Nop5 interacts with the archaeal RNA exosome. *FEBS Lett*, 2017. 591(24): p. 4039-4048.
159. **Hanahan, D.**, DNA cloning. IRL Press, 1985. 1: p. 109.
160. **Grützner, J.**, Untersuchungen zur Poly(A)-Präferenz des Rrp4-Exosoms von *Sulfolobus solfataricus*. Bachelorarbeit, 2015.
161. <http://tcoffee.crg.cat/>.
162. bioViz.org.
163. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
164. https://web.expasy.org/compute_pi/.
165. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.
166. <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>.
167. **Birnboim, H.C. and Doly, J.**, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979. 7(6): p. 1513-23.
168. **Laemmli, U.K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
169. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/T4455?lang=de®ion=DE&gclid=EAlalQobChMlvPDG__f93AIVAqaaCh0z9gkwEAAAYASAAEgKdOPD_BwE.
170. <http://www.biozym.com/DesktopModules/>Webshop/shopdisplayproducts.aspx?tabID=0&productid=15062&Lang=de-DE>.
171. **Rath, A., et al.**, Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(6): p. 1760-5.
172. **Walter, P.**, RNA-Prozessierung in Archaea: Das Exosom von *Sulfolobus solfataricus*. Diplomarbeit, 2003.

173. **Omer, A.D., et al.**, Probing the structure and function of an archaeal C/D-box methylation guide sRNA. *RNA*, 2006. 12(9): p. 1708-20.
174. *Biacore Assay HandBook - Kinetics and affinity analysis, System specific evaluation* GE Healthcare Biosciences AB 2012. 28: p. 9.
175. <https://www.genscript.com/bacterial-soluble-protein-expression-MBP-tag.html>.
176. https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool.
177. **Hartmann, F.**, Untersuchungen der potentiellen Interaktion des Genprodukts von *SSO_RS01100* mit dem archaealen Exosom aus *Sulfolobus solfataricus*. Bachelorarbeit, 2017.
178. <https://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0002500/IM0002567.ashx>.
179. **Tal, M., Silberstein, A., and Nusser, E.**, Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J Biol Chem*, 1985. 260(18): p. 9976-80.
180. <https://www.promega.de/resources/product-guides-and-selectors/restriction-enzyme-resource/applications-and-reaction-conditions-for-restriction-enzymes/>.
181. <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89902>.
182. **Stavros, K.**, HPLC richtig optimiert: ein Handbuch für Praktiker. Wiley-VCH, 2012.
183. **Tang, T.H., et al.**, RNomics in Archaea reveals a further link between splicing of archaeal introns and rRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(4): p. 921-30.
184. **Danan, M., et al.**, Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res*, 2011. 40(7): p. 3131-42.
185. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
186. **Van Regenmortel, M.**, Structure of Antigens. 1992. 2: p. 196.
187. **Dong, G., et al.**, Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *EMBO J*, 2004. 23(5): p. 1000-7.
188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?showseq=1&mmdbid=82935&buidx=1>.
189. **Bayer, T.S., et al.**, Arginine-rich motifs present multiple interfaces for specific binding by RNA. *RNA*, 2005. 11(12): p. 1848-57.
190. **Chen, Y. and Varani, G.**, Protein families and RNA recognition. *FEBS J*, 2005. 272(9): p. 2088-97.
191. **Audin, M.J., et al.**, The archaeal exosome: identification and quantification of site-specific motions that correlate with cap and RNA binding. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013. 52(32): p. 8312-6.

192. **Ahrens, K.A., et al.**, Antiherpetic medication use and the risk of gastroschisis: findings from the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2007. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 27(4): p. 340-5.
193. **Martens, B., et al.**, The SmAP1/2 proteins of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* interact with the exosome and stimulate A-rich tailing of transcripts. *Nucleic Acids Res*, 2017. 45(13): p. 7938-7949.
194. **Milligan, J.F., et al.**, Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*, 1987. 15: p. 8783-8798.
195. <https://www.agilent.com/cs/library-/primers/Public/5991-3651DEE.pdf>.
196. **Bleichert, F. and Baserga, S.J.**, Dissecting the role of conserved box C/D sRNA sequences in di-sRNP assembly and function. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(22): p. 8295-305.
197. **Puckelwald, O.**, Untersuchungen zu potentiellen Interaktionspartnern des archaealen Exosoms in *Sulfolobus solfataricus*. Bachelorarbeit, 2017.
198. <https://pdbj.org/emnavi/quick.php?id=2012>.
199. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1154113/pdf/biochemj00359-0177.pdf>.
200. **Suzuki, H., et al.**, Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(8): p. e63.
201. **Singh, S.K., et al.**, Sequential 2'-O-methylation of archaeal pre-tRNA^{Trp} nucleotides is guided by the intron-encoded but trans-acting box C/D ribonucleoprotein of pre-tRNA. *J Biol Chem*, 2004. 279(46): p. 47661-71.
202. **Clouet d'Orval, B., et al.**, Box C/D RNA guides for the ribose methylation of archaeal tRNAs. The tRNA^{Trp} intron guides the formation of two ribose-methylated nucleosides in the mature tRNA^{Trp}. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(22): p. 4518-29.
203. **Kiss, T.**, Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J*, 2001. 20(14): p. 3617-22.
204. **Starostina, N.G., et al.**, Circular box C/D RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(39): p. 14097-101.
205. **Tang, T.H., et al.**, Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol*, 2005. 55(2): p. 469-81.
206. **Hansen, A.K. and Moran, N.A.**, Altered tRNA characteristics and 3' maturation in bacterial symbionts with reduced genomes. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(16): p. 7870-84.
207. **Brantl, S.**, Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol*, 2007. 10(2): p. 102-9.
208. **Lengeler, J.W., Drews, G., and Schlegel, H.G.**, *Biology of the Prokaryotes*. 1999.

209. **Svenningsen, S.L., et al.**, Transfer RNA is highly unstable during early amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2016. 45(2): p. 793-804.

8 Anhang

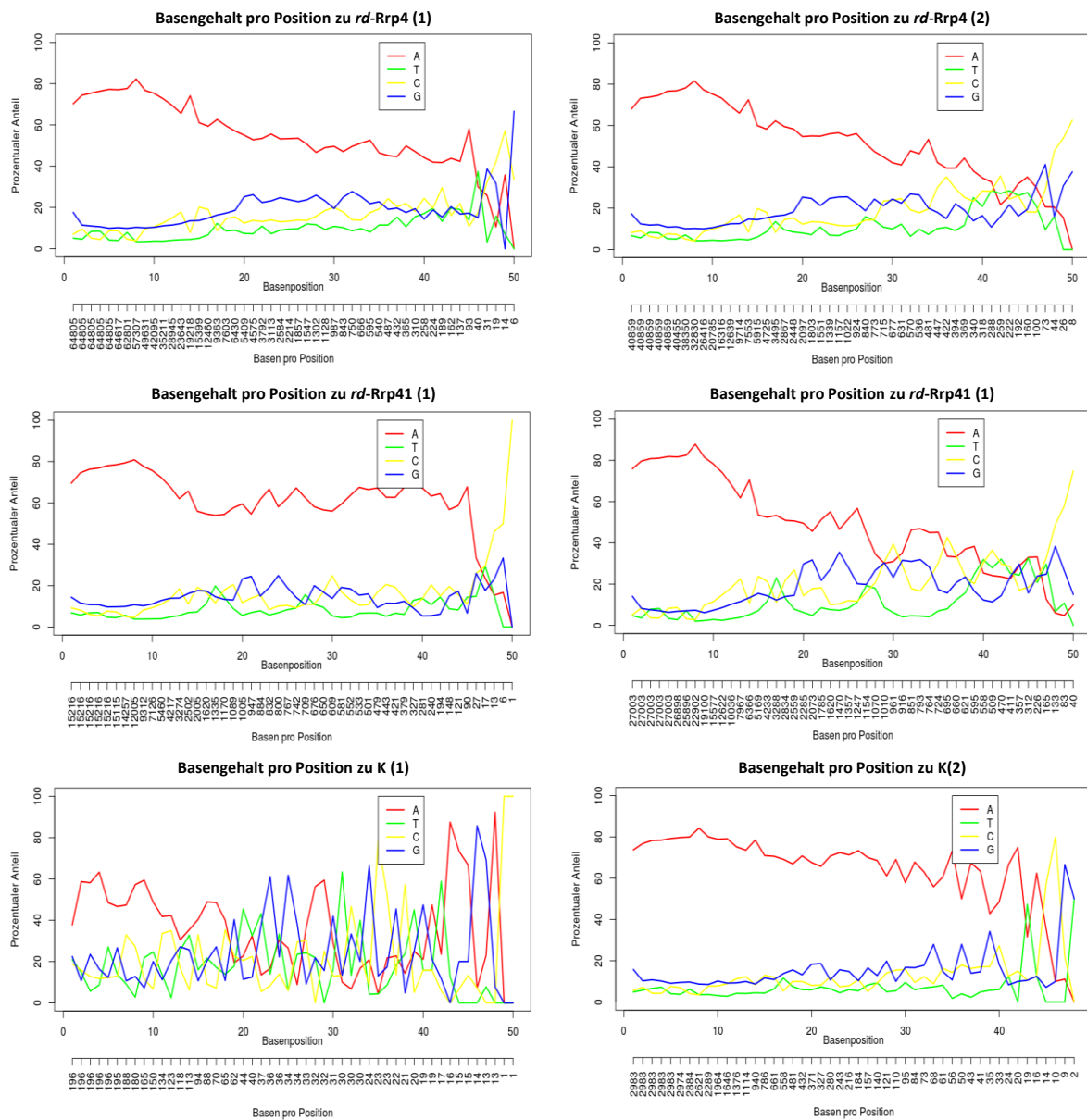


Abbildung S1: Darstellung der Nukleotidverteilung bezogen auf die Basenposition im 3' Anhang der RNA. Die Gesamtsumme der gemappten Nukleotide pro Position ist in Zahlen als zweite X-Achse angegeben. Die Basenposition ist entsprechend der ersten X-Achse zu entnehmen, der prozentuale Anteil des Nukleotides an entsprechender Position der Y-Achse. Je länger der 3' Anhang der RNA ist, umso weniger Nukleotide können an entsprechender Position gemappt werden, und die Gleichverteilung der Nukleotide zwischen den vier Basen steigt an. Den Graphiken ist zu entnehmen, dass unter den ersten 15 Nukleotiden eine Präferenz der Proben *rd-Rrp4* (1), *rd-Rrp4* (2), *rd-Rrp41* (1), *rd-Rrp4* (2) und K (2) für Adenin (A) zu finden ist, gefolgt von Guanin (G). Bei längeren Reads als 15 bp nimmt die sinkt der Adeninanteil und der Anteil der restlichen Nukleotide steigt an. K (2) zeigt eine insgesamt höhere Gleichverteilung der Nukleotide, während auch in K (1) die Präferenz für Adenin vorliegt. Es wurden nur Anhänge berücksichtigt, welche mindestens 5 Basenpaare Länge aufwiesen. *rd-Rrp4* (1), Rrp4-Antikörper, *reads* Replik 1; *rd-Rrp4* (2), Rrp4-Antikörper, *reads* Replik 2; *rd-Rrp41* (1), Rrp41-Antikörper, *reads* Replik 1; *rd-Rrp41* (2), Rrp41-Antikörper, *reads* Replik 2; K (1), *trx*-Antikörper,

reads Replikat 1; K (2), trx-Antikörper, *reads* Replikat 2. Antikörper wurden im Schritt der Co-Immunopräzipitation während des Protokolls des iCLIPs verwendet. Die Auswertung der bioinformatischen Daten sowie Graphikerstellung erfolgte durch Jochen Bathke.

Tabelle S2. Zirkuläre RNAs, welche in den iCLIP-Sequenzierungsdaten identifiziert werden konnten. Angegeben sind Start- und Endpositionen von bekannten zirkulären RNAs und potentiellen zirkulären RNA-Kandidaten. Zudem ist die Anzahl der *reads* angegeben. Die identifizierten zirkulären RNAs wurden nach Position auf plus (+) oder minus (-) Strang aufgesplittet. In der Tabelle handelt es sich hier um die Rohdaten, welche später für Tabelle 83 zusammengefasst wurden. Rohdaten wurden durch Dr. Jochen Bathke zur Verfügung gestellt.

Zirkuläre RNA	Start	Ende	<i>reads</i>
<i>Rd-Rrp4 (1) (+)-Strang ohne PCR Duplikate</i>			
16S rRNA	871659	873217	7000
Neuer Kandidat - Überlappender Bereich des Endes der 16S rRNA und dem Anfang der 23S rRNA; unscharfe Peaks	872274	873710	100 (Anfang des Transkriptes) 300 (Ende des Transkriptes)
23S rRNA	873335	876430	140
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	873492	873710	100 (Anfang des Transkriptes) 300 (Ende des Transkriptes)
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	874180	874277	ca. 30
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS05855, Scharfe Peaks	1030271	1030386	ca. 50
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS06560, Scharfe Peaks	1177035	1177149	ca. 30
<i>Rd-Rrp41 (1) (-)-Strang ohne PCR Duplikate</i>			
Intron der tRNA ^{Trp}	72769	72833	15
Neuer Kandidat - FAD-binding Oxidoreduktase, nur wenig <i>reads</i>	1987559	1988310	5
<i>Rd-Rrp4 (1) (+)-Strang ohne PCR Duplikate</i>			
16S rRNA	871659	873217	15000
23S rRNA	873332	876427	40
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	873489	873710	30 (Anfang des Transkriptes)

85 (Ende des
Transkriptes)

Rd-Rrp41 (1) (-)-Strang ohne PCR Duplikate

Zu wenig *reads* für sinnvolle Kandidaten

Rd-Rrp4 (2) (+)-Strang ohne PCR Duplikate

16S rRNA	871659	873217	3200
23S rRNA	873335	876430	42
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS05855, Scharfe Peaks	1030270	1030384	ca. 90
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS06560, Scharfe Peaks	1177034	1177149	14
Neuer Kandidat der 23S rRNA, unscharfe Peaks	875529	875746	11 (Anfang des Transkriptes) 15 (Ende des Transkriptes)

Rd-Rrp4 (2) (-)-Strang ohne PCR Duplikate

Neuer Kandidat - S-Methyl-5-Thioribose-1-Phosphate Isomerase, nur wenig <i>reads</i>	2721567	2721446	5
--	---------	---------	---

Rd-Rrp41 (2) (+)-Strang ohne PCR Duplikate

16S rRNA	871659	873217	3350
Neuer Kandidat - Überlappender Bereich des Endes der 16S rRNA und dem Anfang der 23S rRNA; unscharfe Peaks	872273	873706	60 (Anfang des Transkriptes) 90 (Ende des Transkriptes)
23S rRNA	873335	876430	70
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	873492	873710	ca. 250
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS05855, Scharfe Peaks	1030270	1030385	25
Neuer Kandidat - Transposase SSO_RS06560, Scharfe Peaks	1177035	1177149	20
Neuer Kandidat der 23S rRNA, Unscharfe Peaks	874005	874275	15 (Anfang des Transkriptes) 26 (Ende des Transkriptes)

Rd-Rrp41 (2) (-)-Strang ohne PCR Duplikate

Intron der tRNA ^{Trp}	72766	72830	20
--------------------------------	-------	-------	----

K (2) (+)-Strang ohne PCR Duplikate

16S rRNA	871659	873217	600
23S rRNA	873335	876430	5

*K (2) (-)-Strang ohne PCR Duplikate*Keine doppelten *reads* an identischen Positionen

Tabelle S3. Rohdaten zur Tabelle 84, vor Sortierung. Readanzahl von angereicherten Transkripten von *S. solfataricus*. Aufgelistet sind die erzielten *reads* in der RNA-Sequenzierung der vom Exosom angereicherten Transkripten aus dem Genom von *S. solfataricus*. Aufgelistet ist die Nukleotidposition von Crosslinks. Die Peakhöhe in der angegebenen Nukleotidposition ist dabei höher im iCLIP als an korrespondierender Position in der Transkriptomanalyse. Rohdaten wurden durch Dr. Jochen Bathke zur Verfügung gestellt.

Position im Genom	iCLIP <i>Peak</i> -Höhe	RNA-Seq. Höhe
871581	1962	2721
2369474	1563	422
2369475	1439	455
285705	1205	275
732929	1165	328
871578	1089	1138
774002	998	304
789721	958	1052
789728	918	384
285704	868	198
2369473	832	414
333505	736	65
2154611	701	145
1830355	675	561
1830358	628	559
2369477	625	466
732923	617	307
285706	536	299
1128676	499	145
1075110	435	358
1350108	395	491
2251322	393	272
2836279	367	514
2836258	353	464
1727192	350	249
333504	339	51
915785	325	229

1128677	325	213
2836278	323	516
1128675	320	24
1075157	310	619
185179	306	34
789725	302	472
789727	289	406
2369472	279	450
1105030	265	158
1333017	264	144
362357	258	73
1495437	255	155
4613	253	100
2641679	253	358
454292	252	133
1944252	250	136
732953	246	282
722440	244	42
732952	243	290
2251321	242	279
117275	238	137
4610	235	101
915812	231	324
2783182	231	152
2154610	225	136
1128674	224	5
2836245	220	429
729482	216	120
285726	215	354
285732	204	377
732901	204	250
732928	196	325
1350106	191	178
876691	190	20
2729168	188	368
1075109	187	268
1339927	187	86
28817	184	32
49415	182	45
2154613	182	147
312185	181	12
2783205	181	120
732893	179	209
2175961	179	43
2175963	179	47
1661866	178	67
1023515	177	138
1509523	177	111
573973	176	43
1722496	176	344
2775173	174	24
732900	172	240
2775175	172	40
789994	169	24

1661864	169	59
1333040	168	119
1495436	168	156
1339925	167	81
1333016	165	145
2775177	165	48
1495460	163	125
1944275	162	108
185173	161	33
2175959	160	22
1944251	158	137
454291	157	133
646881	157	170
454315	156	129
470877	156	37
2783179	156	154
732951	155	290
1105029	154	158
117274	152	137
915786	152	237
1339923	152	58
1147606	150	93
117298	147	111
573972	147	32
1289430	147	130
1661862	145	32
1040443	144	84
1105053	144	134
2783181	144	154
671595	141	60
1105027	140	158
1724582	139	0
732899	137	232
1269704	135	59
1509501	135	11
1339897	133	10
1333014	130	145
1944249	129	137
469194	127	9
2310037	127	56
117272	126	140
637163	126	29
1132191	126	22
915782	125	207
454290	123	134
1495434	123	156
2783180	122	154
454289	121	133
1105028	121	160
2605607	121	68
1333015	119	145
1944250	119	138
1128673	117	0
1147603	117	96

732976	116	149
117273	114	139
1537007	114	118
386940	113	34
1147605	112	96
729476	111	144
2590596	109	53
1326577	108	52
185174	106	32
1495435	106	156
2154608	104	124
646882	102	178
1023512	102	133
1352511	102	136
4611	101	100
466300	101	27
1147604	100	96
1899338	100	77
1147629	99	71
163977	98	62
1202490	96	55
563238	94	36
573999	94	96
1262996	94	60
722438	93	43
1722468	93	74
4612	86	101
1661865	85	63
851272	84	91
1269703	84	54
2729140	84	69
1128672	83	0
756390	81	130
1495459	81	126
2154600	81	128
2775174	81	30
2783204	81	120
876497	80	115
1023517	80	139
1262995	80	56
1333039	80	121
1339924	80	65
2605606	80	63
1661863	79	46
222782	78	87
469197	78	12
574009	78	101
876487	78	126
1899337	78	68
117297	77	111
246989	77	26
722448	77	43
1075108	77	87
1105052	77	135

362358	76	74
1040442	76	85
2100485	75	69
2310036	75	54
729481	74	116
876489	74	126
2596113	74	89
2765379	74	82
482061	72	88
1040440	72	83
1132190	72	17
1944274	72	108
2175960	72	26
2175964	72	49
163953	71	25
671594	71	52
454314	70	129
1202489	70	51
2903694	70	88
573986	69	93
769550	69	117
2672867	69	25
1536985	68	4
2802803	68	2
117303	67	125
470874	67	35
769557	67	105
837103	67	71
891643	67	119
41493	64	63
206348	64	11
1607721	64	11
1972702	64	87
573998	63	96
1289408	63	1
1339926	63	86
2175962	63	47
1418905	62	102
876496	61	117
876509	61	87
1202487	61	51
2571408	61	54
973744	60	63
1418904	60	102
1899340	60	84
2765378	60	86
1200812	59	55
1339928	59	89
1661868	59	70
574010	58	101
823321	58	23
876483	58	104
1269713	58	61
2310039	58	59

206380	57	13
1262993	57	56
1326576	57	45
1326579	57	57
2310046	57	61
2802804	57	2
22088	56	12
722437	56	42
769556	56	106
1370079	56	10
1899342	56	83
2328956	56	0
362288	55	37
466299	55	20
1269706	55	60
1504318	55	32
1537006	55	108
2605609	55	71
2775178	55	51
2903691	55	90
1075346	54	44
1661873	54	108
637248	53	30
655354	53	15
1124552	53	9
1202494	53	59
1326578	53	53
1363967	53	40
331784	52	26
470879	52	38
876517	52	80
1262998	52	58
1577058	52	8
2605604	52	61
671604	51	64
876486	51	102
1132188	51	17
2542273	51	16

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Erstgutachterin und Betreuerin *Prof. Dr. Gabriele Klug* bedanken, welche mich während der letzten Jahre intensiv unterstützt und betreut hat. Dafür, dass sie jederzeit erreichbar und stets bereit für wissenschaftlichen Input war.

Zudem möchte ich *Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg* danken, mit welcher ich über die gesamte Zeit meiner Dissertation sehr eng zusammen arbeiten, zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen führen durfte und Welche jederzeit nützliche Hinweise für mich hatte.

Prof. Dr. Kai Thormann möchte ich dafür danken, dass er bereitwillig die Zweitkorrektur meiner Arbeit und zusammen mit *Prof. Dr. Sylvia Schnell* und *Prof. Dr. Reinhard Dammann* die Prüfungskommission übernahm.

Einige meiner Experimente wären durch die wissenschaftliche Hilfe und enge Zusammenarbeit nur sehr schwer und langwieriger durchführbar gewesen, weswegen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte bei:

Prof. Dr. Albrecht Bindereif, und speziell *Dr. Oliver Rossbach*, *Dr. Christian Preußner* und *Dr. Hendrik Koch* für die Kooperation im iCLIP, welche alle Arbeitsschritte ab der RNA-Extraktion bis zur Probenvorbereitung für die Sequenzierung übernommen haben und von welchen ich auch von ihrer jahrelangen Erfahrung im iCLIP profitieren durfte.

Prof. Dr. Alexander Goesmann und speziell *Dr. Jochen Bathke* für die bioinformatische Auswertung der iCLIP Sequenzierungsdaten.

Dr. Lennart Weber für die enge Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung des iCLIP.

Dr. Tim Schneider für seine Zeit mir das Protokoll des RNase R Verdaus geduldig näher zu bringen.

Bei *Dr. Florian Rossmann*, welcher mich mit dem BACTH-Assay vertraut gemacht hat.

Bei *Dr. Julia Hahn*, (ehemals Dzieciolowski), welche für mich sehr schnell und erfolgreich den Biacore-Assay durchgeführt hat.

Vielen Dank an *Dr. Susann Kaltwasser* und *Prof. Dr. Janet Vonck* für die Bereitschaft zur Untersuchung des DnaG-Csl4-Komplexes sowie des Csl4-Exosoms mittels Elektronenmikroskopie.

Bei *Julian Grützner*, *Franziska Hartmann* und *Oliver Puckelwald*, mit welchen ich im Projekt eng zusammen arbeiten durfte und welche mit ihren Bachelorarbeiten mir Richtung und Orientierung für meine weitere Arbeit lieferten.

Und natürlich auch *Linlin Hou* bei welcher ich in meinen ersten Wochen alle Methoden erlernen durfte, die für die Bearbeitung dieser Dissertation essentiell waren.

Und auch ein besonderen Dank an *Kerstin Haberzettl*, *Andrea Balzer*, *Andrea Weisert*, *Carmen Haas*, *Andreas Jäger* und *Niklas Plag*, welche das Leben im Laboralltag durch das Herbeizaubern von Medien, Materialien und Klonierungsschritten wesentlich erleichtert haben.

Und natürlich danke ich allen meinen Freunden, die ich an dieser Stelle leider nicht alle persönlich benennen kann, aber hoffe, dass jeder Einzelne von Ihnen weiß, was er mir bedeutet. Ich möchte euch allen für die vielen schönen und fröhlichen Zeitpunkte danken, für die viele Unterstützung und auch die zahlreichen Apfelweine in den Biergärten von Gießen!

Eine Ausnahme möchte ich allerdings machen: Ich danke *Julia Weber*, welche viel Zeit und Geduld investiert hat, meine Arbeit auf Rechtschreibung zu kontrollieren ... Ich wusste bis dahin nicht, wie viele Leerzeichen man zu viel setzen kann! Vielen Dank dir dafür!

Ganz zum Schluss möchte ich noch meiner Familie danken, welche mich immer unterstützt hat und jederzeit für mich da gewesen ist. Ohne sie wäre die Arbeit, denke ich, nicht möglich gewesen.

