

Molekularbiologische Charakterisierung der Argonauten
Proteine AgnA und AgnB innerhalb der RNA vermittelten
Genregulation in *D. discoideum*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Naturwissenschaften
der Universität Kassel

Datum der Disputation

29.10.2012

Vorgelegt von

Benjamin Boesler

Kassel, August 2012

„We are the true believers“

(The Bouncing Souls, „True Believers“, How I Spent My Summer Vacation, Epitaph Records, 2001)

1 Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Genetik an der Universität Kassel unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Nellen angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für seine Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen bedanken. Prof. Dr. Friedrich W. Herberg danke ich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu erstellen.

Ich möchte mich bei Dr. Konrad Förstner und Prof. Dr. Jörg Vogel vom Institut für Molekulare Infektionsforschung der Universität Würzburg für die RNA-Sequenzierung und die bioinformatische Auswertung der Sequenzen bedanken. Mein weiterer Dank geht an Lisa Neuenroth und Prof. Dr. Henning Urlaub aus der Abteilung *Bioanalytical Mass Spectrometry* am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen für die massenspektrometrische Untersuchung von Proteinproben. Bei Dr. Malte Bussiek und Dr. Stephan Wiegand möchte ich mich für die Kooperationen und die Bereitstellungen von Reagenzien zu Teilprojekten dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Genetik für ihre Unterstützung bei den Experimenten und für die Denkanstöße zu dieser Arbeit bedanken. Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Markus Maniak und der Abteilung Zellbiologie für die Bereitstellung der verwendeten Antikörper und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank geht an Doreen Meier, Carsten Boesler und Kathy Moog für die Anregungen und hilfreichen Diskussion zu dieser Arbeit. Das größte Dankeschön geht an meine Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

2 Zusammenfassung

Argonauten Proteine übernehmen vielfältige Funktionen in RNA vermittelten Signalwegen zur Genregulation und sind in eukaryotischen Organismen hoch konserviert. Obwohl das Repertoire an kleinen regulatorischen RNAs in *D. discoideum* schon früh untersucht wurde und dabei sowohl siRNAs als auch miRNAs identifiziert werden konnten, war die Funktion der fünf kodierten Argonauten Proteine zu Beginn meiner Arbeit noch völlig unbekannt. Im Fokus meiner Untersuchung standen die zwei Homologe AgnA und AgnB.

Die molekularbiologische Charakterisierung von AgnA hat gezeigt, dass das Protein eine essentielle Funktion bei der posttranskriptionellen Regulation des Retrotransposons DIRS-1 hat. AgnA wird für die Generierung von über 90 % der DIRS-1 siRNAs benötigt, wobei unklar ist, ob die *Slicer*-Aktivität des Proteins relevant ist oder ob AgnA andere Proteine zur Generierung der kleinen RNAs rekrutiert. Mit Hilfe der *Deep Sequencing* Analyse kleiner RNAs im AgnA KO konnte die Abreicherung der DIRS-1 siRNAs bestätigt werden. Die Anreicherung von DIRS-1 *sense* und *antisense* Transkripten weist deutlich auf eine Deregulation des Retrotransposons bei Abwesenheit von AgnA hin. Der Verlust der AgnA abhängigen Regulationsebene ist nicht nur auf RNA- sondern auch auf DNA-Ebene nachweisbar, da im AgnA *Knockout* einzelsträngige extrachromosomale DIRS-1 Intermediate nachweisbar sind. Die Analyse dieser Strukturen mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopie zeigt, dass die extrachromosomale DNA mit Proteinen assoziiert ist. Das Erscheinungsbild legt die Vermutung nahe, dass es sich um Virus ähnliche Partikel handeln könnte. Die Transposition der DIRS-1 Elemente konnte nicht nachgewiesen werden. Sie schlägt vermutlich fehl, da der zur Integration notwendige DNA-Doppelstrang nicht gebildet wird.

Auch wenn der genaue Mechanismus der AgnA abhängigen DIRS-1 Regulation nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass AgnA nicht nur an der Biogenese der kleinen DIRS-1 siRNAs beteiligt ist, sondern auch weiter *downstream*, vermutlich innerhalb von Effektor-Komplexen, als Regulator aktiv ist.

AgnB ist nicht an der negativen Regulation des DIRS-1 Retrotransposons beteiligt. Im Gegenteil haben Experimente gezeigt, dass das Protein die Transkription des Elementes und die Bildung von DNA-Intermediaten eher positiv beeinflusst.

Im Fall des Retrotransposons Skipper ist unklar, ob die wenigen siRNAs, die identifiziert worden sind, tatsächlich für die Regulation dieses Elementes genutzt werden. Der *Knockout* von AgnA hat eine Anreicherung der Skipper siRNAs zur Folge, wobei diese sehr variabel ist. Es konnten Skipper Transkripte nachgewiesen werden (Hinas et al., 2007), die wahrscheinlich die Vorläufermoleküle der

siRNAs darstellen. Die Menge dieser Transkripte unterscheidet sich allerdings im Wildtyp und den untersuchten *Knockout*-Stämmen nicht.

Bei der Untersuchung der miRNAs zeigte sich eine signifikante Anreicherung dieser regulatorischen RNAs im AgnA *Knockout*. Die Akkumulation kann durch die Expression von rekombinantem AgnA wieder auf Wildtyp Niveau gebracht werden. Die genaue Funktion von AgnA im miRNA Signalweg konnte aber nicht näher spezifiziert werden.

Im Fall der beiden miRNAs konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sie keine 2'-O Methylierung besitzen und fast ausschließlich im Cytoplasma der Zelle vorliegen. Letzteres weist darauf hin, dass die untersuchten miRNAs ihre Zielgene vermutlich posttranskriptionell regulieren.

Die Akkumulation von miRNAs im AgnA KO konnte ebenfalls durch *Deep Sequencing* Analysen verifiziert werden. Weiterhin wurden tRNA Fragmente gefunden, die im AgnA KO wesentlich stärker vertreten sind. *Northern Blot* Analysen haben gezeigt, dass ein zusätzliches Fragment der tRNA Asp akkumuliert, wenn AgnA nicht exprimiert wird. Möglicherweise ist AgnA am Umsatz der tRNA beteiligt. Die biologische Funktion der tRNA Fragmente in *D. discoideum* ist jedoch bisher ungeklärt.

Bei der Suche nach putativen Interaktionspartnern konnte im Fall von AgnA das Protein DDB_G0268914 mittels Massenspektrometrie als putativer Interaktionspartner identifiziert werden. Dieses Protein zeigt Homologien zu MOV10 aus *H. sapiens*, das ebenfalls mit Argonauten Proteinen interagiert (Hock et al., 2007) und die Replikation von Retroviren unterdrückt (Burdick et al., 2010). Die Interaktion zwischen AgnA und dem MOV10 Homolog konnte bisher nicht mit anderen Ansätzen bestätigt werden. Darüber hinaus bleibt zu klären, ob der putative Interaktionspartner ebenfalls an der Regulation des Retrotransposons DIRS-1 beteiligt ist.

3 Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort	3
2	Zusammenfassung.....	4
3	Inhaltsverzeichnis	6
4	Einleitung.....	10
4.1	RNA vermittelte Mechanismen der Genregulation	10
4.2	<i>Small interfering RNAs</i> – Biogenese und Funktion.....	11
4.2.1	Exogene siRNAs in Tieren	12
4.2.2	Endogene siRNAs in Tieren.....	14
4.2.3	Endogene siRNAs in Pflanzen	15
4.3	<i>Micro RNAs</i> – Biogenese und Funktion	17
4.4	<i>Piwi-interacting RNAs</i> – Biogenese und Funktion	21
4.5	Argonauten Proteine.....	23
4.5.1	Funktion der Argonauten Proteine.....	25
4.5.2	Gonadenspezifische Proteine.....	27
4.5.3	Aufbau von Argonauten Proteinen	27
4.6	Modellorganismus <i>Dictyostelium discoideum</i>	29
4.7	RNAi in <i>D. discoideum</i>	31
5	Zielsetzung.....	33
6	Materialien	35
6.1	Geräte.....	35
6.2	Verbrauchsmaterialien.....	36
6.3	Chemikalien.....	37
6.4	Puffer und Lösungen	38
6.5	Kits.....	44
6.6	Enzyme und Enzympuffer.....	45
6.7	Nukleotide	45
6.8	Größenstandards.....	46
6.9	Antikörper	46
6.10	Antibiotika	46
6.11	Nährmedien.....	46
6.12	Bakterienstämme	48
6.13	<i>D. discoideum</i> Stämme.....	48
6.14	Oligonukleotide	49

6.15	Plasmide	51
6.16	Sequenzen	55
7	Methoden	56
7.1	Zellbiologische Methoden	56
7.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	56
7.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	56
7.1.3	Anzucht von <i>D. discoideum</i>	56
7.1.4	Herstellung von <i>Klebsiella aerogenes</i> -Platten	56
7.1.5	Transformation von <i>D. discoideum</i> durch Elektroporation	57
7.1.6	Subklonieren von <i>D. discoideum</i>	57
7.1.7	Herstellen von Sporen	57
7.1.8	Langzeitwachstumsversuch.....	58
7.1.9	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen.....	59
7.1.10	Entwicklungskurs von <i>D. discoideum</i>	59
7.2	Molekularbiologische Methoden	60
7.2.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen	60
7.2.2	Agarosegelelektrophorese	61
7.2.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	63
7.2.4	Gelelution von DNA Fragmenten	63
7.2.5	Ligation von DNA Fragmenten	64
7.2.6	Plasmid-Mini-Präparation	64
7.2.7	Plasmid-Maxi-Präparation.....	65
7.2.8	Präparation von genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i>	65
7.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	65
7.2.10	Quantitative PCR (<i>Real-time</i> PCR)	66
7.2.11	Reverse Transkriptase PCR	67
7.2.12	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	68
7.2.13	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	69
7.2.14	Fällung von Nukleinsäuren	69
7.2.15	RNA-Präparation aus <i>D. discoideum</i>	69
7.2.16	<i>In vitro</i> Transkription	70
7.2.17	<i>End-Labeling</i> von DNA	71
7.2.18	Herstellung von OLB-Sonden.....	71
7.2.19	<i>Northern Blot</i>	72
7.2.20	Hybridisierung von <i>Northern Blots</i>	73
7.2.21	<i>Southern Blot</i>	74
7.2.22	Hybridisierung von <i>Southern Blots</i>	74

7.2.23	Primer Extension	74
7.2.24	β -Eliminierung	75
7.2.25	Trennung vom Cytoplasma und Zellkern.....	75
7.2.26	<i>Run-On</i> Transkription	76
7.2.27	RNA-Isolierung für <i>Deep Sequencing</i> Analysen	77
7.3	Proteinbiochemische Methoden.....	77
7.3.1	SDS-PAGE.....	77
7.3.2	Coomassiefärbung von Proteingelen	78
7.3.3	<i>Western Blot</i>	78
7.3.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	78
7.3.5	Präzipitation von Proteinen.....	79
7.3.6	Protein <i>Pull-Down</i> mit GFP Nanotrap.....	79
7.3.7	Expression von rekombinanten Proteinen	80
7.3.8	Löslichkeitstest	81
7.3.9	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen über <i>His₆-Tag</i>	81
8	Ergebnisse.....	83
8.1	Herstellung von AgnA KO, AgnB KO und AgnA/B KO <i>D. discoideum</i> Stämmen	83
8.1.1	Generierung eines AgnA KO-Stammes	84
8.1.2	Herstellung des AgnB KO-Stammes.....	86
8.1.3	Generierung des AgnA/B KO-Stammes	87
8.1.4	<i>Rescue</i> der AgnA KO- bzw. AgnB KO-Stämme	89
8.2	Lokalisation von AgnA und AgnB in <i>D. discoideum</i>	90
8.3	Expression von rekombinanten Argonauten Proteinen	92
8.3.1	Expression von verkürzten Argonauten Proteinen.....	92
8.4	Untersuchung der Expression von Retrotransposons in Argonauten KO-Stämmen	94
8.4.1	Nachweis von siRNAs und Transkripten des Skipper Retrotransposons	94
8.4.2	Nachweis von DIRS-1 siRNAs.....	96
8.4.3	Nachweis von DIRS-1 Transkripten.....	98
8.4.4	<i>De novo</i> Synthese von DIRS-1 Transkripten	102
8.4.5	Nachweis von zusätzlichen Integrationen von DIRS-1 in <i>D. discoideum</i> Langzeitkulturen	102
8.4.6	Nachweis von extrachromosomaler DIRS-1 DNA	105
8.5	<i>Micro</i> RNAs in Argonauten KO-Stämmen	110
8.5.1	Nachweis und Quantifizierung der miRNAs mica1190 und mica1198 in Argonauten KO-Stämmen	110
8.5.2	Lokalisation und Modifikation der <i>D. discoideum</i> miRNAs	112
8.5.3	Stabilisierung der miRNAs durch ektopische Expression von Argonauten Proteinen	114
8.5.4	<i>Rescues</i> von AgnA KO Phänotypen.....	117

8.6	Identifizierung von Interaktionspartnern der Argonauten Proteine	119
8.7	<i>Deep Sequencing</i> Analyse vom AX2 wt und dem AgnA KO-Stamm	123
8.7.1	Nachweis von Retrotransposons, miRNAs und Class 1 RNAs im AgnA KO-Stamm .	124
8.7.2	Nachweis von tRNAs und tRNA-Fragmenten im AgnA KO-Stamm	126
8.7.3	Nachweis von intergenischen Bereichen und RNAs aus Introns	128
8.8	Test eines RNAi Reportersystems in verschiedenen <i>D. discoideum</i> Stämmen	131
9	Diskussion	136
9.1	Regulation des DIRS-1 Retrotransposons in Abhängigkeit von AgnA	136
9.1.1	AgnA wird für die Biogenese von DIRS-1 siRNAs benötigt	136
9.1.2	Initiiert AgnA die Bildung von sekundären DIRS-1 siRNAs?.....	138
9.1.3	Reguliert die RNAi Maschinerie DIRS-1 transkriptionell oder posttranskriptionell?	139
9.1.4	AgnA unterdrückt die Bildung extrachromosomaler DIRS-1 DNA.....	141
9.1.5	Verstärkt AgnB die Bildung extrachr. DIRS-1 DNA in Abwesenheit von AgnA?	144
9.2	Regulation des Skipper Retrotransposons in <i>D. discoideum</i>	145
9.3	Der Einfluss von Argonauten Proteinen auf das miRNA Level in <i>D. discoideum</i>	148
9.4	Eigenschaften von miRNAs in <i>D. discoideum</i>	150
9.5	Expression von rekombinanten Argonauten Proteine.....	151
9.6	Wird AgnA oder AgnB für die RNA vermittelte Genregulation benötigt?	152
9.7	<i>Deep Sequencing</i> Analyse des AgnA KO-Stammes	153
9.8	Interaktionspartner von AgnA und AgnB.....	156
10	Erklärung.....	161
11	Abkürzungsverzeichnis	162
12	Anhang	165
12.1	Bindepositionen der verwendeten Sonden für das Skipper Retrotransposon	165
12.2	Bindepositionen der verwendeten Sonden für das DIRS-1 Retrotransposon.....	165
12.3	Bindepositionen der Primer für die Quantifizierung von DIRS-1 Transkripten.....	167
13	Summary.....	168
14	Literaturverzeichnis	169

4 Einleitung

4.1 RNA vermittelte Mechanismen der Genregulation

In vielen eukaryotischen Organismen wurden kleine RNAs (21-30 nts) als Schlüsselfaktoren für die Regulation von Genen identifiziert. Sie sind in der Lage, die Genexpression durch verschiedene Mechanismen zu steuern, deren Gesamtheit unter dem Begriff der RNA-Interferenz (RNAi) zusammengefasst wird. Die kleinen RNA-Moleküle werden dabei in Proteinkomplexe inkorporiert und vermitteln eine sequenzspezifische Bindung dieser Komplexe an RNA Transkripte.

Zunächst wurden kleine regulatorische RNAs in prokaryotischen Organismen untersucht. In den frühen 80er Jahren wurden kurze, exogene *antisense* RNAs (asRNAs) in prokaryotische Organismen eingebracht, um durch die Hybridisierung mit einer komplementären *messenger* RNA (mRNA) die Translation des jeweiligen Gens zu verhindern. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden im Jahr 1984 die ersten endogenen asRNAs in *Escherichia coli* (*E. coli*) identifiziert (Mizuno et al., 1984), die die Expression bestimmter Gene regulieren (Coleman et al., 1985). Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde die Vermutung geäußert, dass kleine RNAs auch in Eukaryoten an der Regulation von Genen oder zur Abwehr von Viren mitwirken (Coleman et al., 1985). Den ersten Beweis für diese Vermutung lieferte Anfang der 90er Jahre ein Experiment bei dem ein für die Blütenfarbe wichtiges Gen in Petunien (*Petunia hybridia*) überexprimiert werden sollte, um so die Blütenfarbe zu intensivieren (Napoli et al., 1990). Wider Erwarten wurde ein Verlust der Blütenfarbe beobachtet, da die gesteigerte Transkription des Transgens letztendlich zu einer Suppression der endogenen mRNA führte. Dieser Mechanismus wurde als Co-Suppression bezeichnet. Ein ähnlicher Vorgang konnte in *Neurospora crassa* (*N. crassa*) beobachtet werden, wo die Transformation eines Transgenes die posttranskriptionelle Stilllegung dieses Gens zur Folge hat. Dieser Mechanismus wurde als *Quelling* bezeichnet (Romano und Macino, 1992; Cogoni et al., 1996).

Die Erforschung der RNA vermittelten Genregulation wurde durch die Entdeckung von Fire und Mello revolutioniert, die bei ihren Experimenten mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) zeigen konnten, dass auch doppelsträngige RNAs potente Auslöser der Genstilllegung sind (Fire et al., 1998). Einige Jahre zuvor wurde bereits eine kleine RNA in *C. elegans* identifiziert, die in der Lage ist, eine mRNA durch komplementäre Basenpaarung zu regulieren. Der Verlust dieser kleinen RNA hatte eine verkürzte Lebensdauer des Organismus und eine gravierende Verzögerung der Larvalentwicklung zur Folge (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Die Entdeckung von Fire und Mello hat somit maßgeblich zum Verständnis der entwicklungsabhängigen Genregulation beigetragen.

Es stellte sich heraus, dass die Regulation von Genen durch kleine, nicht-kodierende RNAs ein hoch konservierter und sequenzspezifischer Mechanismus in eukaryotischen Zellen ist. Die kleinen RNAs werden von Proteinkomplexen gebunden und leiten diese Komplexe, die immer ein Protein der Argonauten Familie beinhalten, zu komplementären RNA- oder DNA-Sequenzen. Einerseits kann die Genregulation auf der RNA-Ebene posttranskriptionell durch die Degradation oder durch Inhibierung der Translation erfolgen (Ghildiyal und Zamore, 2009). Andererseits erfolgt die Regulation auf transkriptioneller Ebene, indem die Heterochromatisierung der Ziel-DNA initiiert wird (Lippman et al., 2004). Die Proteine im Effektor-Komplex beeinflussen den Modus der Regulation dabei maßgeblich. Mit Hilfe der kleinen RNAs werden beispielsweise Entwicklungsprozesse gesteuert und die Stabilität des Genoms erhalten. Der RNAi Mechanismus dient darüberhinaus auch der Abwehr exogener doppelsträngiger RNAs, die z.B. durch Retroviren in den Organismus gelangen können (Ghildiyal und Zamore, 2009).

Innerhalb der RNAi unterscheidet man drei Hauptklassen kleiner regulatorischer RNAs: *small interfering RNAs* (siRNAs), *micro RNAs* (miRNAs) und *piwi-interacting RNAs* (piRNAs). Sie werden alle aus längeren doppelsträngigen RNA-Vorläufermolekülen prozessiert und weisen eine Länge von 20-30 nts auf (Ghildiyal und Zamore, 2009). Für die Prozessierung werden verschiedene Schlüsselproteine benötigt: in Abhängigkeit vom Organismus und der jeweiligen Klasse an kleinen regulatorischen RNAs handelt es sich um Homologe der Dicer- (MacRae und Doudna, 2007), der RNA abhängigen RNA Polymerase- (RdRP) (Maida und Masutomi, 2011) und der Argonauten-Proteinfamilien (Czech und Hannon, 2011). Darüber hinaus interagieren Proteine mit Domänen zur Bindung doppelsträngiger RNA (dsRBD Proteine) mit Dicer Homologen.

Nach der Generierung der kleinen RNAs werden diese von Argonauten Proteinen gebunden, die, wie oben beschrieben, im Zentrum von Effektor-Komplexen sitzen. Diese Funktion übernehmen Argonauten Proteine in allen bisher untersuchten Mechanismen zur RNA vermittelten Genregulation. Sie sind deshalb in den Fokus der Forschung zur Aufklärung solcher Signalwege gerückt.

4.2 *Small interfering RNAs* – Biogenese und Funktion

Auf Grund ihrer Herkunft unterscheidet man zwischen exogenen und endogenen siRNAs. Als exogene siRNAs werden RNA Duplexe bezeichnet, die durch Injektion von doppelsträngigen RNA (dsRNA) Molekülen oder durch Viren in die Zelle gelangen. Endogene siRNAs sind im Genom des Organismus kodiert. Sie stammen meist von *Hairpin*-Sequenzen oder von Hybriden aus komplementären Transkripten ab.

Die erste Prozessierung der doppelsträngigen RNA-Moleküle erfolgt durch ein Dicer Homolog. Das Protein aus der RNase III Familie generiert dabei 21 nts lange siRNA-Duplexe, die ein Monophosphat am 5'-Ende und zwei ungepaarte Nukleotide am 3'-Ende aufweisen (Elbashir et al., 2001; MacRae und Doudna, 2007). Für die Prozessierung der siRNAs interagiert Dicer in der Regel mit einem dsRBD-Protein, welches die Bindung an dem RNA Substrat vermittelt.

In *C. elegans* und Mammalia konnte jeweils nur ein Dicer Homolog identifiziert werden, das neben der Generierung von siRNAs auch die Prozessierung von miRNAs übernimmt (Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) hingegen besitzt zwei Dicer Homologe, DCR-1 und DCR-2, die unabhängige Funktionen in verschiedenen RNA vermittelten Genregulationsmechanismen ausführen: Während DCR-1 die Prozessierung von siRNAs übernimmt, ist DCR-2 für die Produktion von miRNAs verantwortlich (Lee et al., 2004).

Nach der Generierung von siRNA Duplexen werden die beiden Stränge getrennt, um eine sequenz-spezifische Erkennung der Ziel-RNAs zu ermöglichen. Der von dem Argonauten Protein inkorporierte Strang wird als *guide* Strang bezeichnet und identifiziert im Folgenden das Ziel-Transkript, während der komplementäre *passenger* Strang schnell degradiert wird (Schwarz et al., 2003).

In Pflanzen und in *C. elegans* sind RdRPs wichtige Bestandteile von siRNA Signalwegen. Sie sind in der Lage, aus einzelsträngigen RNA-Transkripten dsRNAs zu synthetisieren. Einige RdRPs benötigen dafür primäre siRNAs als Startpunkt für die Synthese, wobei andere RdRPs ohne diesen Startpunkt auskommen (Pak und Fire, 2007; Maida und Masutomi, 2011). RDR6 aus *A. thaliana* kann sowohl Primer un- und primerabhängig arbeiten (Allen et al., 2005; Moissiard et al., 2007). Die entstandenen dsRNAs werden wiederum von Dicer zu siRNAs prozessiert, die als sekundäre siRNAs bezeichnet werden. Durch diesen Mechanismus werden nicht nur die Transkripte degradiert, sondern es kommt auch zu einer Anreicherung von sekundären siRNAs, was zu einer verstärkten posttranskriptionellen Genstilllegung führt.

4.2.1 Exogene siRNAs in Tieren

Während die Biogenese von endogenen und exogenen siRNAs in *C. elegans* und in Mammalia weitestgehend identisch abläuft, sind in *D. melanogaster* unterschiedliche Faktoren an der Entstehung von siRNAs beteiligt.

Zur Produktion von exogenen siRNAs in *D. melanogaster* heterodimerisiert das dsRBD Protein R2D2 mit DCR-2 (vgl. Abb. 1A). Gemeinsam mit einem siRNA Duplex bilden sie den *RISC loading complex* (RLC) (Liu et al., 2003). Der RLC erkennt die thermodynamischen Unterschiede an den 5'-Enden einer Duplex-siRNA und wählt anschließend den *guide* Strang aus (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). R2D2 orientiert die siRNA Duplex so, dass jener Strang mit dem weniger stabil gepaarten

5'-Ende in den späteren Effektorcomplex eingebaut wird. Dazu rekrutiert der RLC das Argonauten-Homolog AGO2 und bildet so den pre-RISC (RNA induced silencing complex) aus (Liu et al., 2003). AGO2 spaltet den *passenger* Strang zwischen jenen Nukleotiden, die mit Nukleotid 10 und 11 des *guide* Strangs gepaart sind (Leuschner et al., 2006). Die Fragmente des *passenger* Strangs werden aus dem pre-RISC entfernt und umgehend abgebaut. Der *guide* Strang hingegen wird

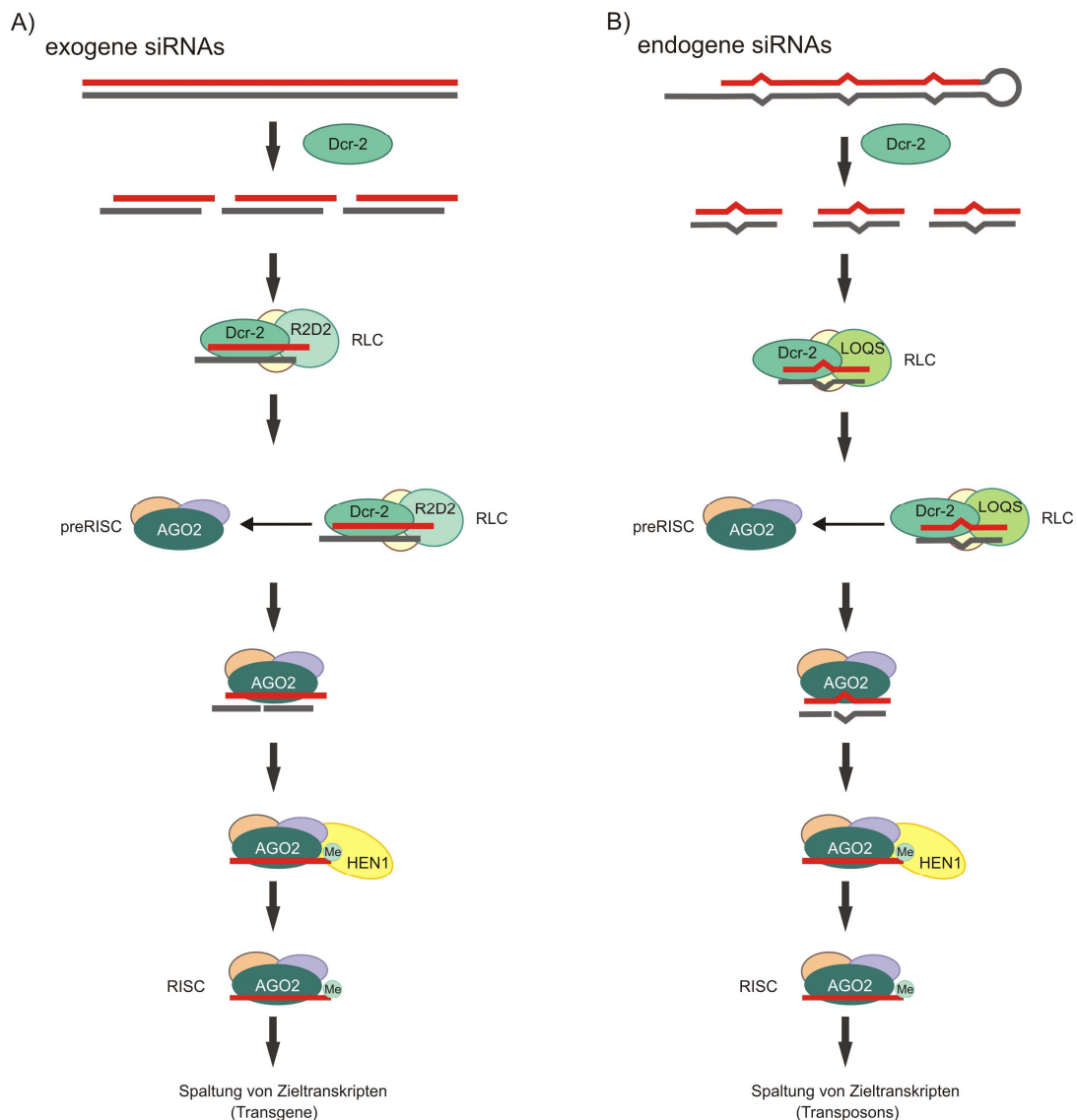


Abb. 1: Biogenese von siRNAs in *D. melanogaster*

(angelehnt an Ghildiyal et al., 2009)

- A) Doppelsträngige Virus-RNA wird von Dcr-2 in siRNA Duplexe gespalten, die im Anschluss von dem RLC Komplex gebunden werden. Der RLC Komplex, der aus Dcr-2 und R2D2 besteht, übergibt den Duplex an den pre-RISC Komplex, wobei dieser von AGO2 gebunden wird. Nach der Spaltung des *passenger* Strangs durch AGO2 wird der *guide* Strang durch HEN1 methyliert. Danach ist die Bildung des maturen RISC abgeschlossen und als Teil dieses vermittelt AGO2 die Spaltung von Zieltranskripten.
- B) Endogene Transkripte, die lange *Hairpin*-Strukturen ausbilden, werden von Dcr-2 in siRNA Duplexe prozessiert. Die Beladung von RISC ist hierbei abhängig von Dcr-2 und LOQs, die in diesem Fall den RLC bilden. Die weiteren Schritten entsprechen der Prozessierung von exogenen siRNAs. Der mature RISC erkennt anhand der gebundenen siRNA Transkripte, u.a. von Transposons, die durch Ago2 endonukleolytisch gespalten werden.

von der Methyltransferase HEN1 am 3'-Ende methyliert (Horwich et al., 2007), um die gebundene siRNA vor der Degradation zu schützen (Pelisson et al., 2007). Nach der Methylierung ist der mature RISC entstanden. Die gebundene *guide* RNA leitet den Komplex zu komplementären Ziel-mRNAs, die von AGO2 durch dessen *Slicer*-Aktivität endonukleolytisch gespalten werden (Matranga et al., 2005). In menschlichen Zellen werden exogene dsRNAs durch einen Proteinkomplex, bestehend aus Dicer und TRBP (*TAR RNA binding protein*), zu 21 nts langen siRNAs prozessiert (Chendrimada et al., 2005). Die gebildeten siRNAs werden von diesem auf die humanen Argonauten Proteine Ago1-4 übertragen, wobei allerdings nur Ago2 eine *Slicer*-Aktivität aufweist (vgl. 4.5).

4.2.2 Endogene siRNAs in Tieren

Auf Grundlage von *Next Generation* Sequenzierungen des Transkriptom von u.a. *C. elegans* (Ambros et al., 2003), *D. melanogaster* (Ghildiyal et al., 2008), *Mus musculus* (*M. musculus*) (Watanabe et al., 2008) und *H. sapiens* (Yang und Kazazian, 2006) konnte eine Vielzahl an kleinen RNAs nachgewiesen werden. Diese kleine RNAs, die ihren Ursprung in Transposons, heterochromatischen Regionen oder hybridisierten Transkripten haben, bilden die Klasse der endogenen siRNAs (endo-siRNAs) und stellen in somatischen Zellen das Gegenstück zu den Gameten-spezifischen piRNAs dar. Endo-siRNAs kommen allerdings auch in Keimbahnzellen vor und ergänzen dort die piRNA vermittelte Genregulation (Tam et al., 2008). Sie initiieren u.a. die Degradation von Transposon-Transkripten und bilden so einen zentralen Bestandteil des Schutzmechanismus gegen mobile genetische Elemente.

Endo-siRNAs in *D. melanogaster* sind 21 nts lang und haben ihren Ursprung zumeist in transposablen Transkripten oder in Transkripten, die lange *Hairpin*-Strukturen ausbilden. Die anfängliche Prozessierung dieser Klasse von regulatorischen RNAs wird, wie auch bei den exo-siRNAs, von Dcr-2 übernommen (Zhou et al., 2008) (vgl. Abb. 1B). Im Gegensatz zur exo-siRNA Biogenese ist hier das dsRBD Protein Loquacious (LOQS) an der Entstehung der endo-siRNAs beteiligt. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn die dsRNA-*Precursor Hairpin*-ähnlich Strukturen ausbilden. LOQS bindet an Dcr-2 und unterstützt diesen bei der Prozessierung der dsRNAs. Auch hier ist der Komplex aus Dicer und seinem dsRBD Protein Partner für die Auswahl des *guide* Strangs und für die Übertragung der siRNA Duplexe auf AGO2 verantwortlich (Zhou et al., 2008). Die weiteren Prozessierungsschritte und die Regulationen der Ziel-RNAs verlaufen wie schon bei den exo-siRNAs beschrieben (siehe oben).

In *M. musculus* konnten endo-siRNAs auch in Oocyten nachgewiesen werden, wobei ihr Transkriptionsursprung sowohl in Transposons als auch in Protein-kodierenden Genen liegt (Watanabe et al., 2008). Dcr-1 übernimmt die Prozessierung der längeren Vorläufermoleküle in 21 nts lange endo-siRNAs, die daraufhin von Ago2 gebunden werden. Ago2 hat *Slicer*-Aktivität und vermittelt die endonukleolytische Spaltung der komplementären Ziel-RNA. Die Stilllegung von

Transposons in Maus Oocyten wird sowohl durch piRNA- als auch endo-siRNA vermittelte Regulationsmechanismen gewährleistet. Interessanterweise konnten bislang in den Testis von *M. musculus* lediglich piRNAs und keine endo-siRNAs nachgewiesen werden (Watanabe et al., 2008).

Eine alternative Funktionsweise des RNAi Mechanismus initiiert in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) die Heterochromatisierung kompletter Genomabschnitte in den pericentromerischen Bereichen von Chromosomen (Lippman et al., 2004). Diese repetitiven Bereiche werden bidirektional transkribiert und können somit eine dsRNA ausbilden, die von Dcr-1 zu siRNAs prozessiert wird. Die prozessierten siRNAs werden daraufhin von Ago1 gebunden und bilden zusammen mit den Proteinen Tas3 und Chp1 den RITS (*RNA-induced transcriptional silencing*) Komplex. Die gebundene kleine siRNA leitet den Komplex zu naszierenden Transkripten der Pericentromere. Nach der Bindung rekrutiert RITS die Histon Methyltransferase Clr4, welche das Lysin an der Position 9 des Histon 3 (H3K9) methyliert. Auf Grund der Methylierung bindet das HP1 Homolog Swi6 an dieses Histon, was zu einer Kompaktierung des Chromatins in dieser Region des Genoms führt. Zusätzlich wird die Rdp1 zu den naszierenden Transkripten geleitet, durch die weitere dsRNAs generiert werden (Lippman et al., 2004). Diese werden daraufhin von Dcr-1 zu sekundären siRNAs prozessiert, die die Kompaktierung der Genomregion weiter verstärken. Auf diese Weise sorgt die RNAi Maschinerie für die Aufrechterhaltung der Centromere (Volpe et al., 2002). Der Verlust einer RNAi Komponente und die fehlende Heterochromatisierung im Bereich der Pericentromere beeinträchtigt die Mitose insbesondere während der Anaphase. Bei der Verteilung der Schwester-Chromatiden auf die Tochterzellen kann man deshalb *lagging* Chromosomen beobachten, die bei der Chromosomenverteilung zurück bleiben (Volpe et al., 2002; Hall et al., 2003).

4.2.3 Endogene siRNAs in Pflanzen

Die ersten endogenen siRNAs in Pflanzen wurden in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) identifiziert (Hamilton et al., 2002). Sie können basierend auf ihrem Wirkungsort in mehrere Klassen, wie z.B. *cis-acting* und *trans-acting* siRNAs, eingeteilt werden.

In Pflanzen haben *cis-acting* siRNAs (casiRNAs) ihren Ursprung in Sequenzen, die von Transposons oder repetitiven DNA-Elementen abstammen. Die casiRNAs stellen den Großteil der endogenen siRNAs dar und vermitteln typischerweise die Heterochromatisierung ihres Transkriptionsursprungs. Für die Bildung dieser kleinen regulatorischen RNAs werden einzelsträngige Transkripte, die von der RNA Polymerase IV synthetisiert werden, durch die RdRP RDR2 zu dsRNAs prozessiert (vgl. Abb. 2A) (Herr et al., 2005). Diese dsRNAs werden daraufhin von dem Dicer Homolog DCL3 in 24 nts lange casiRNAs gespalten (Zilberman et al., 2003). Nach einer Methylierung des 3'-Endes durch HEN1 werden die siRNAs von AGO4 bzw. AGO6 gebunden (Boutet et al., 2003). Dieser RNP-Komplex

erkennt naszierende Transkripte, die von der RNA Polymerase V gebildet werden, und rekrutiert die DNA-Methyltransferasen DRM2 zu dem stillzulegenden Genort. DRM2 methyliert Nukleotide mit einer Cytosinbase in CpG-Inseln der genomischen DNA, was zur Heterochromatisierung und somit zur Inaktivierung des jeweiligen Genortes führt (He et al., 2011).

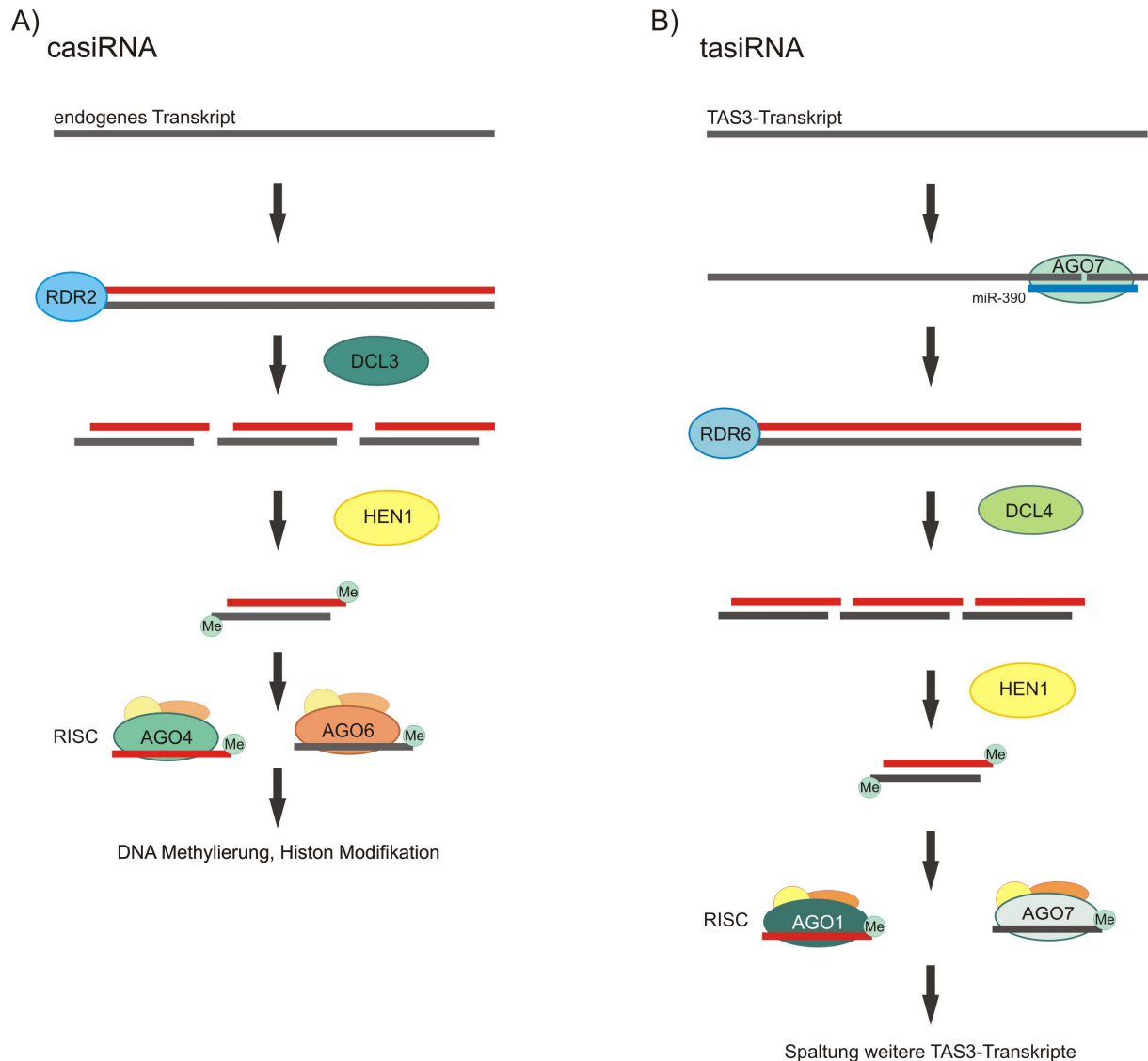


Abb. 2: Biogenese von endogenen siRNAs in Pflanzen

Die Regulation von endogenen Ziel-RNAs in Pflanzen erfolgt durch unterschiedliche kleine RNAs und verschiedene Mechanismen (Abb. angelehnt an Ghildiyal et al., 2009).

- A) Die Stilllegung eines Gens kann durch die RdRP RDR2 initiiert werden, indem sie einen zum Transkript komplementären Strang synthetisiert. Der gebildete Doppelstrang wird von DCL3 in 24 nts lange casirNAs gespalten, die im Anschluss von HEN1 methyliert werden. AGO4 bzw. AGO6 binden die casirNAs und rekrutieren Methyltransferasen, die DNA und Histone methylieren und zu einer Heterochromatisierung der entsprechenden Genomregion führen.
- B) Für die Bildung von tasi-RNAs des TAS3 Locus wird AGO7 durch die miRNA miR-390 zu einem TAS3-Transkript geleitet, das sequenzspezifisch gespalten wird. Daraufhin wird RdR6 rekrutiert und synthetisiert den komplementären Strang. Der gebildete Doppelstrang wird von DCL4 in 21 nts lange tasi-Duplexe gespalten. Nach der Methylierung werden die tasiRNAs von AGO1 bzw. AGO7 gebunden, die die Spaltung der weiterer TAS3-Transkripte vermitteln.

Neben *cas*iRNAs konnten in Pflanzen *trans-acting* siRNAs (*tasi*RNA) identifiziert werden, die posttranskriptionell Transkripte des Genortes ihres eigenen Ursprungs regulieren. Die Prozessierung erfolgt durch Komponenten des miRNA- und des siRNA-Signalweges (Vazquez et al., 2004). Ein Beispiel dafür ist der TAS3 Locus in *A. thaliana* (Montgomery et al., 2008). Für die Generierung der *tasi*RNAs bindet AGO7 die miRNA miR-390, die den RNP-Komplex zu dem primären Transkript des TAS3 Locus leitet, welches daraufhin von dem Argonauten Protein gespalten wird (vgl. Abb. 2B). Daraufhin spaltet das Argonauten-Protein das identifizierte Transkript. Anschließend bindet die RdRP RdR6 eines der Transkript-Fragmente und synthetisiert den komplementären Strang (Peragine et al., 2004). Dieser Doppelstrang wird von DLC4 in 21 nts lange *tasi*RNA Duplexe prozessiert. Nach ihrer Methylierung durch HEN1 wird einer der Duplex-Stränge von AGO 1 bzw. AGO7 gebunden und in den RISC Komplex inkorporiert. Durch die gebundene *tasi*RNA wird der RISC Komplex zu weiteren TAS3-Transkripten dirigiert, die von den Argonauten-Proteinen gespalten werden. Die Stilllegung wird weiterhin verstärkt, indem die geschnittenen Transkripte zur Generierung neuer *tasi*RNAs genutzt werden (Axtell et al., 2006).

4.3 *Micro* RNAs – Biogenese und Funktion

Micro RNAs sind ubiquitär vorkommende ~22 nts lange regulatorische RNAs, welche von kurzen endogenen *Hairpin*-Transkripten abstammen und für die Steuerung von Entwicklungsprozessen und physiologischen Prozessen in vielen Eukaryoten verantwortlich sind. In der Regel werden die Vorläufermoleküle von einem Protein der RNase III Familie zu muren miRNAs prozessiert, die anschließend von einem Protein der Argonauten Unterfamilie gebunden werden. Die gebundenen miRNAs identifizieren die Ziel-RNAs durch komplementäre Basenpaarung, wodurch es zur Inhibierung der Translation oder der Destabilisierung der betreffenden mRNA kommt.

Bei der Untersuchung von entwicklungsabhängigen Genen in *C. elegans* wurde eine kurze endogene RNA identifiziert, die die Expression bestimmter Gene dieser Klasse reguliert. Diese RNA, *lin-4*, war die erste identifizierte miRNA (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). MiRNAs werden als *Precursor*-Moleküle (*pri*-miRNA) meist von der RNA Polymerase II transkribiert (Lee et al., 2004) und erhalten erst durch eine sequentielle Prozessierung ihre funktionelle Form (Cai et al., 2004) (vgl. Abb. 3A). Für diese Prozessierung wird in *D. melanogaster* das Protein Pasha und in *H. sapiens* das Protein DGCR8 benötigt, die jeweils durch eine dsRNA Bindedomäne (dsRBD) charakterisiert sind (Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004). DGCR8 sowie Pasha binden die *pri*-miRNA und dirigieren Drosha, ein Protein der RNase III-Familie, zu dem doppelsträngigen Bereich des *Precursor*-Moleküls. Daraufhin erfolgt bereits im Nukleus eine erste Spaltung der *pri*-miRNA durch Drosha, wodurch die etwa 60-70 nts lange *pre*-miRNA generiert wird (Lee et al., 2003; Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). Diese

weitere Zwischenstufe der miRNA Synthese ist durch eine Haarnadel-Struktur charakterisiert, deren 5'-Ende ein Monophosphat trägt und am 3'-Ende zwei ungepaarte Nucleotide aufweist. In dieser Form wird die pre-miRNA von Ran gebunden und durch Exportin5 in das Cytoplasma transportiert, um dort eine finale Prozessierung der miRNA zu ermöglichen (Yi et al., 2003; Lund et al., 2004).

In *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus* und *H. sapiens* können pre-miRNAs darüberhinaus auch in einem Drosha-unabhängigen Prozessierungsmechanismus entstehen. Bei diesem alternativen

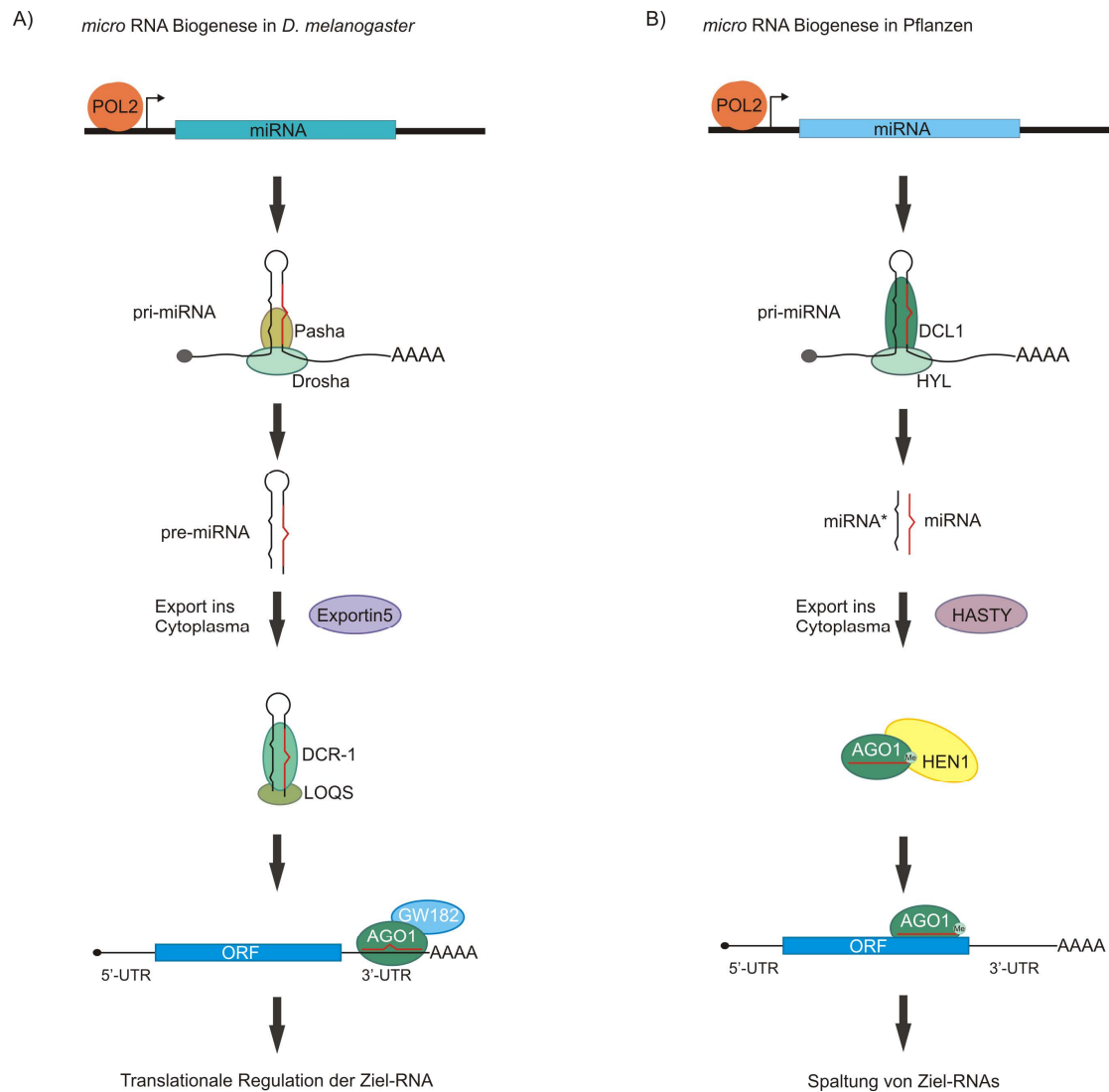


Abb. 3: Bildung von miRNAs und Regulierung der Ziel-RNAs in *D. melanogaster* und Pflanzen

Abbildung angelehnt an Ghidiyal et al., 2009.

- A) In *D. melanogaster* werden die Vorläufertranskripte von RNA POL2 transkribiert und durch einen Komplex bestehend aus Drosha und Pasha zu pre-miRNAs prozessiert. Die pre-miRNAs werden für den zweiten Prozessierungsschritt, der von DCR-1 und LOQS katalysiert wird, in das Cytoplasma transportiert. AGO1 bindet die mature miRNA und vermittelt die posttranskriptionale Regulation der Ziel-mRNA.
- B) Die Prozessierung von miRNAs in Pflanzen findet hauptsächlich im Nucleus statt. DCL1 prozessiert die *pri*-miRNAs zu dem miRNA Duplex, der durch HASTY in das Cytoplasma transportiert wird. Die mature miRNA wird von AGO1 gebunden und durch HEN1 am 3'-Ende 2'-O methyliert. Die miRNA vermittelt die Ziel-Erkennung und AGO1 spaltet die Ziel-mRNA endonukleolytisch.

Mechanismus katalysiert das Spleißosom die initiale Spaltung der pre-miRNA. Diese Vorläufermoleküle werden vom Spleißosom aus pre-miRNA-ähnlichen Introns einer *messenger* RNA herausgespleißt und deshalb als Mirtrons bezeichnet (Okamura et al., 2007). Sie liegen anschließend in Form von Lariaten im Nukleus vor. Für die weitere Prozessierung wird die 5'-2' Phosphodiesterbindung des Lariats durch *Debranching* Enzyme gespalten und die pre-miRNA-ähnlichen RNAs ins Cytoplasma transportiert, um dort in den weiteren Prozessierungsprozess eingeschleust zu werden (Ruby et al., 2007).

Im Cytoplasma generiert Dicer aus dem doppelsträngigen Bereich der pre-miRNA 21-23 nts lange miRNA Duplexe (Bernstein et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Der Strang mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende wird als miRNA bezeichnet, wobei der komplementäre Strang miRNA* genannt wird. In Mammalia interagiert Dicer bei diesem Schritt mit dem dsRBD Protein TRBP (Chendrimada et al., 2005). Der Komplex aus beiden Proteinen ist an der Beladung des Effektor-Komplexes mit der miRNA Duplex beteiligt. In *D. melanogaster* interagiert DCR-1 mit dem dsRBD-Protein LOQS, das die pre-miRNA bindet und DCR-1 so bei der Prozessierung unterstützt. Auch hier übernimmt der Komplex aus dem Dicer Homolog und dem dsRBD Protein die Beladung des Effektors mit einem Argonauten Protein im Zentrum (Eichinger et al., 2005) (vgl. Abb. 3A). Um den muren miRISC Komplex zu erhalten, muss die miRNA* entfernt werden. Sofern das Argonauten Protein *Slicer*-Aktivität besitzt, kann es die miRNA* in einigen Fällen endonukleolytisch spalten. Besitzt es keine *Slicer*-Aktivität, so vermittelt wahrscheinlich eine RNA-Helikase die Entwindung der miRNA* (Miyoshi et al., 2005; Leuschner et al., 2006). Neben dem GW182 Homolog stellt der miRNA Argonauten-Komplex den Hauptbestandteil des miRISC Komplexes dar. Die inkorporierte miRNA identifiziert das Ziel-Transkript, das von dem Argonauten Protein endonukleolytisch gespalten werden kann (Llave et al., 2002). Die Fragmente der mRNA werden anschließend durch das Exosom, einem Proteinkomplex mit 3'-5' exonukleolytischer Aktivität, und der 5'-3'-Exonuklease Xrn4 abgebaut.

In *N. crassa* konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Argonauten Protein QDE-2 neben dem Dicer Homolog essentiell für die Prozessierung einiger miRNAs ist (Lee et al., 2010). Das Argonauten Protein leitet die Exonuklease QIP sowie das Exosom zur pre-miRNA, die daraufhin die weiteren Schritte der miRNA-Prozessierung übernehmen (Xue et al., 2012).

In *A. thaliana* werden beide Spaltreaktionen der miRNA-Prozessierung bereits im Zellkern katalysiert (Reinhart et al., 2002). Nach der Transkription des miRNA *Precursors* bindet zunächst das dsRBD-Protein HYL1 an das Transkript und dirigiert das Dicer Homolog DCL1 an den doppelsträngigen Bereich des Vorläufermoleküls (Vazquez et al., 2004) (vgl. Abb. 3B). Anschließend spaltet DCL1 den *Precursor* und der miRNA-Duplex wird durch das Exportin5 Homolog HASTY in das Cytoplasma

transportiert (Park et al., 2005). Nach einer Methylierung des 3'-Endes durch HEN1 wird die mature miRNA auf ein Argonauten Protein übertragen, während der komplementäre miRNA* Strang umgehend degradiert wird (Schwarz et al., 2003; Yang und Kazazian, 2006).

Pflanzliche miRNAs binden meist im kodierenden Bereich von mRNAs und sind dabei vollständig komplementär zu den Erkennungssequenzen ihrer Ziel-mRNA. Im Gegensatz dazu weisen tierische miRNAs meist nur eine unvollständige Komplementarität zu der jeweiligen Ziel-mRNA auf und binden meist präferenziell an den 3'-untranslatierten Bereichen der mRNAs (Lewis et al., 2003). Die Sequenzspezifität von tierischen miRNAs wird dabei durch die *Seed*-Sequenz definiert, die die Nukleotide 2-8 am 5'-Ende der miRNA umfassen (Brennecke et al., 2005). Die Nukleotide 9-12 der miRNA paaren nicht mit der Ziel-RNA und bilden somit *mismatches* aus. Dieser ungepaarte Bereich verhindert, dass die mRNA endonukleolytisch an dieser Stelle gespalten wird. Die weiteren Basen der miRNA können die Ziel-RNA binden, wobei diese Bindung keinen Einfluss auf die Identifizierung des Ziel-Transkripts hat. Auf Grund des geringen Komplementaritätsbereichs der *Seed*-Sequenz kann eine einzelne miRNA verschiedenen mRNAs binden und deren Expression inhibieren (Selbach et al., 2008). Anfängliche Untersuchungen der Wirkungsweise von tierischen miRNAs anhand der lin-4 miRNA aus *C. elegans* zeigten, dass die regulierten Proteine Lin-14 und Lin-28 nicht translatiert werden, deren mRNA aber intakt in der Zelle vorliegt. Detaillierte Analysen dieser Art der Regulation zeigten daraufhin, dass die translationale Inhibierung durch den miRISC bereits bei der Initiation der Translation erfolgt (Huntzinger und Izaurralde, 2011).

Die Translation einer eukaryotischen mRNA wird durch die Interaktion verschiedener Proteinfaktoren mit dem charakteristischen 5'-CAP oder dem 3'-Poly(A)-Schwanz initiiert (vgl. Abb. 4): Zunächst bindet der Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E) das 5'-CAP und rekrutiert daraufhin eIF4G. Die Interaktion von eIF4G mit PABPC, das mit dem 3'-Poly(A)-Schwanz assoziiert ist, führt zu einer Zirkulation der mRNA. Die kleine Untereinheit eines Ribosoms assembliert an der zirkulären mRNA und wandert an der RNA-Sequenz entlang, bis die Translation am Initiationskodon eingeleitet wird (Jackson et al., 2010). Gleichzeitig schützt die Zirkularisierung die mRNA vor der enzymatischen Degradation. Wenn jedoch eine miRNA den RISC-Komplex zur CAP-Struktur einer mRNA dirigiert, wird die Bindung des eIF4F-Komplexes verhindert und die Zirkularisierung der mRNA sowie ihre Translation werden infolgedessen unterbunden (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005).

Alternativ zur Blockierung der Translation kann der miRISC Komplex auch die Destabilisierung einer mRNA durch die Initiation der Deadenylierung und des *Decappings* hervorrufen (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2007). Hierbei rekrutiert der miRISC Komplex den CAF1-CCR4-NOT Deadenylierungskomplex zur Ziel-mRNA, wodurch zunächst der Poly(A)-Schwanz abgebaut wird.

Anschließend wird das 5'-CAP von dem Holoenzym DCP1/DCP2 abgebaut und die mRNA wird umgehend von der 5'-3' Exonuklease Xrn1 degradiert (Behm-Ansmant et al., 2006; Piao et al., 2010).

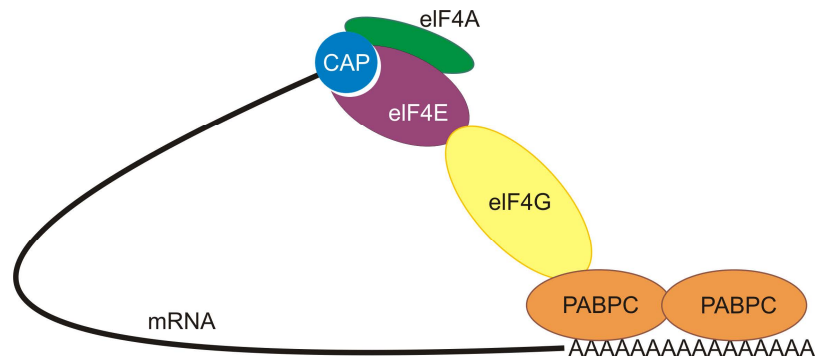


Abb. 4: Rolle der CAP-Struktur und des Poly(A)-Schwanz für die Translation

In eukaryotischen Organismen werden mRNAs zirkularisiert, um deren effektive Translation zu gewährleisten. Dazu wird die CAP-Struktur von eIF4E, welches von eIF4A unterstützt wird, gebunden, wohingegen der Poly(A)-Schwanz von PABPC gebunden wird. Die Zirkulation der mRNA erfolgt schließlich durch die Interaktion von eIF4G mit eIF4E und PABPC. Bei der translationalen Kontrolle bindet der miRISC vermittelt durch das Argonauten Protein an diese Struktur und verhindert unter anderem die Zirkulierung der mRNA.

In den darauffolgenden Jahren wurden neben der Inhibition der Translation und der Destabilisierung der mRNA weitere Mechanismen identifiziert, in denen miRNAs die Expression spezifischer Zielgene regulieren (Bartel, 2009). So führt ein alternativer Mechanismus in *D. melanogaster* und in Säugetieren beispielsweise zur miRNA vermittelten Degradation von mRNAs. In diesem Fall besteht eine fast vollständige Komplementarität zwischen der miRNA und dem Ziel-Transkript, was zu der endonukleolytischen Spaltung der RNA durch das Argonauten Protein führt (Yekta et al., 2004; Davis et al., 2005).

4.4 *Piwi-interacting* RNAs – Biogenese und Funktion

In *D. melanogaster*, *M. musculus* und in menschlichen Zelllinien konnte die Existenz einer weiteren Klasse von kleinen, regulatorischen RNAs nachgewiesen werden, die ihren Ursprung in repetitiven intergenischen Bereichen, insbesondere in Transposons haben (Aravin et al., 2001; Vagin et al., 2006). Charakteristisch für diese Klasse kleiner RNAs ist, dass sie ausschließlich mit Piwi-Proteinen, einer Unterfamilie der Argonauten Proteine, assoziiert sind. Aus diesem Grund werden die 23-30 nts langen RNAs als *piwi-interacting* RNAs (piRNAs) bezeichnet. Sie werden insbesondere für die Stilllegung von Transposons in der Keimbahn benötigt (vgl. 4.5.2). In *D. melanogaster* konnten bis zu 1,5 Millionen individuelle piRNAs nachgewiesen werden, während nur etwa 170 miRNAs in dem Organismus bekannt sind. Trotz der hohen Anzahl an piRNAs können ihre Ursprungsloci einigen wenigen Hundert Regionen im Genom zugeordnet werden, die als piRNA Cluster bezeichnet werden. Diese Cluster sind hauptsächlich in pericentromerischen und subtelomerischen Bereichen mit hohem

Heterochromatingehalt lokalisiert (Saito et al., 2006). Die Transkription der piRNA-Vorläufermoleküle findet in diesen Clustern statt, wobei zwischen zwei Arten von Clustern unterschieden wird. Die erste Cluster-Gruppe ist dadurch gekennzeichnet, dass sowohl *sense* als auch *antisense* Transkripte gebildet werden. Ein Beispiel dafür ist das Cluster 42AB auf dem Chromosom 2 (Klattenhoff et al., 2009). Von der zweiten Cluster Gruppe entsteht hingegen nur ein Transkript, was z.B. auf den *flamenco (flam)* Locus auf dem X-Chromosom von *D. melanogaster* zutrifft (Prud'homme et al., 1995). Der *flam* Locus wurde zunächst als Regulator der retroviralen *gypsy*, *idexif* und *ZAM* Elemente identifiziert (Mével-Ninio et al., 2007). Einige Kopien dieser Retroelemente liegen im *flam* Locus vor und dienen der Generierung von piRNAs, die in *antisense* Orientierung zu den retroviralen Transkript liegen.

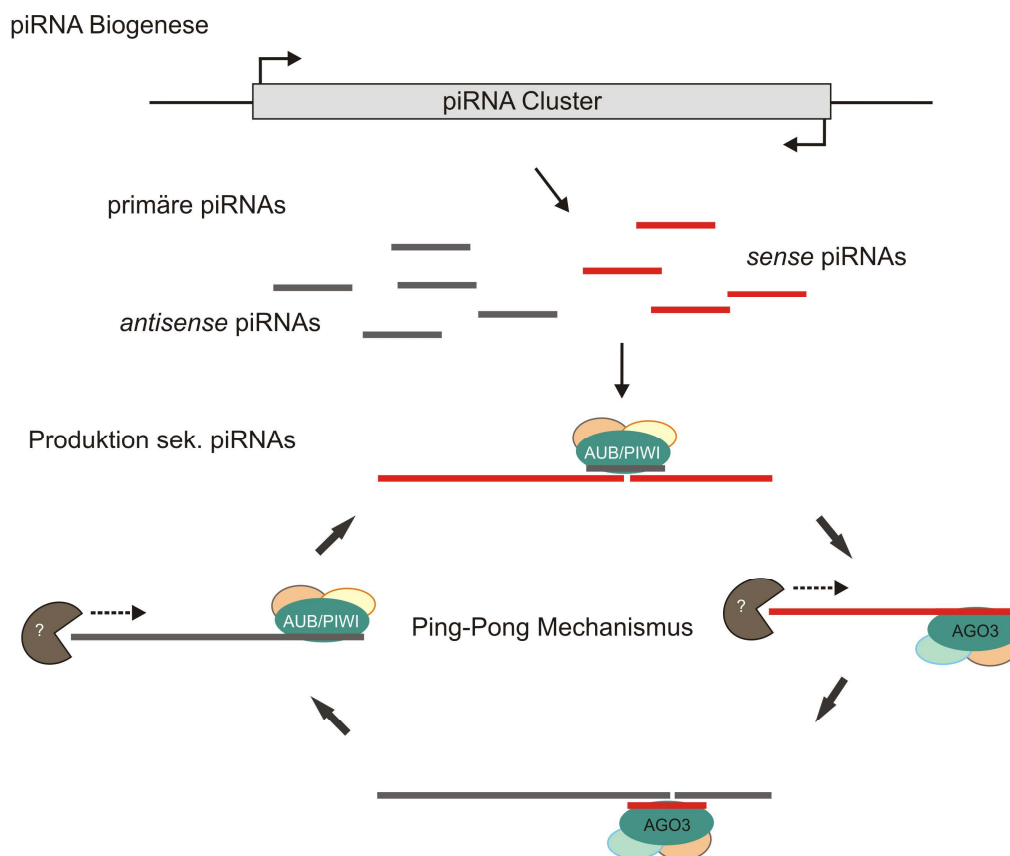


Abb. 5: Amplifikationsmechanismus von sekundärer piRNAs in *D. melanogaster*

Zunächst erfolgt die Synthese von primären *sense* und *antisense* piRNA Transkripten von piRNA Clustern. Die PIWI-Proteine AUB und PIWI binden *antisense* piRNAs und katalysieren daraufhin die Spaltung von längeren *sense* piRNA-Transkripten.

AGO3 hingegen bindet kurze *sense* piRNAs und schneidet seinerseits längere *antisense* Transkripte. Durch die Spaltung der Transkripte werden die 5'-Enden der sekundären piRNAs generiert. Die Faktoren, die für die Prozessierung des 3'-Endes benötigt werden, sind noch nicht bekannt.

Nach der Bildung der Transkripte und der Generierung von primären piRNAs binden die Piwi Proteine PIWI und AUB bevorzugt piRNAs, die *antisense* Orientierung zu aktiven Transposonen besitzen (vgl. Abb. 5). AGO3 hingegen bindet meist piRNAs, die dem *sense* Transkript der Transposons zugeordnet werden können (Brennecke et al., 2007). Die beteiligten Piwi Proteine weisen nicht nur eine Präferenz für *sense* bzw. *antisense* piRNAs auf, sondern binden piRNAs mit bestimmten Sequenzeigenschaften. So sind die von AUB gebundenen piRNAs häufig zu den ersten zehn Nukleotiden der von AGO3 gebundenen piRNAs komplementär (Gunawardane et al., 2007). Piwi Proteine, die endonukleolytisch aktiv sind, sind an der Generierung von sekundären piRNAs beteiligt. Dabei handelt es sich um einen Dicer unabhängigen Amplifikationsmechanismus, der als *Ping-Pong Cycle* bezeichnet wird (vgl. Abb. 5). Im ersten Schritt schneiden PIWI und AUB *sense* Transkripte, die von Transposons stammen, und generieren auf diese Weise 5'-Enden von sekundären *sense* piRNAs. Diese Spaltprodukte werden von AGO3 gebunden und es erfolgt die Prozessierung des 3'-Endes (vgl. Abb. 5). Die Faktoren, die die 3'-Enden der geschnittenen Transkripte prozessieren, konnten noch nicht identifiziert werden. AGO3 schneidet seinerseits *antisense* Transkripte, die anschließend von AUB bzw. PIWI gebunden werden. Alle drei Piwi Proteine schneiden ihre Zieltranskripte zwischen den Basen 10 und 11 der gebundenen piRNA (Gunawardane et al., 2007). Es erfolgt erneut der Abbau des 3'-Endes und die gebundene piRNA leitet die Proteine zu weiteren *sense* Transkripten. Dieser Mechanismus dient neben der Amplifikation von piRNAs zur Degradation von Transposontranskripten und somit zum Schutz vor diesen. Die piRNAs vom *flam* Locus werden allerdings nur von PIWI gebunden und deren Amplifikation ist unabhängig vom Ping-Pong Mechanismus (Aravin et al., 2007).

4.5 Argonauten Proteine

Argonauten Proteine sind ein essentieller Bestandteil aller bisher identifizierten RNA vermittelten Genregulationsmechanismen. Diese Proteinfamilie ist dabei nicht nur an der Biogenese kleiner regulatorischer RNAs beteiligt, sondern übernimmt auch wichtige katalytische Funktionen in diversen RNA abhängigen Regulationsmechanismen.

In *A. thaliana* wurde das erste Argonauten Homolog (AGO 1) bei einem *Screening* nach Genen, die die Blattentwicklung beeinflussen, entdeckt. Die Deletionsmutanten von *ago1* zeigen eine stark veränderte Blattmorphologie, die der Form eines Tintenfisches ähnelt. Deshalb erhielt das Protein den Namen Argonaut (Bohmert et al., 1998). Anschließend konnte in einer Vielzahl von weiteren Organismen die Existenz von Argonauten Homologen nachgewiesen werden. Argonauten Proteine sind, was die Schlüsselproteine RNA vermittelter Regulationsmechanismen betrifft, am stärksten konserviert (vgl. Abb. 6).

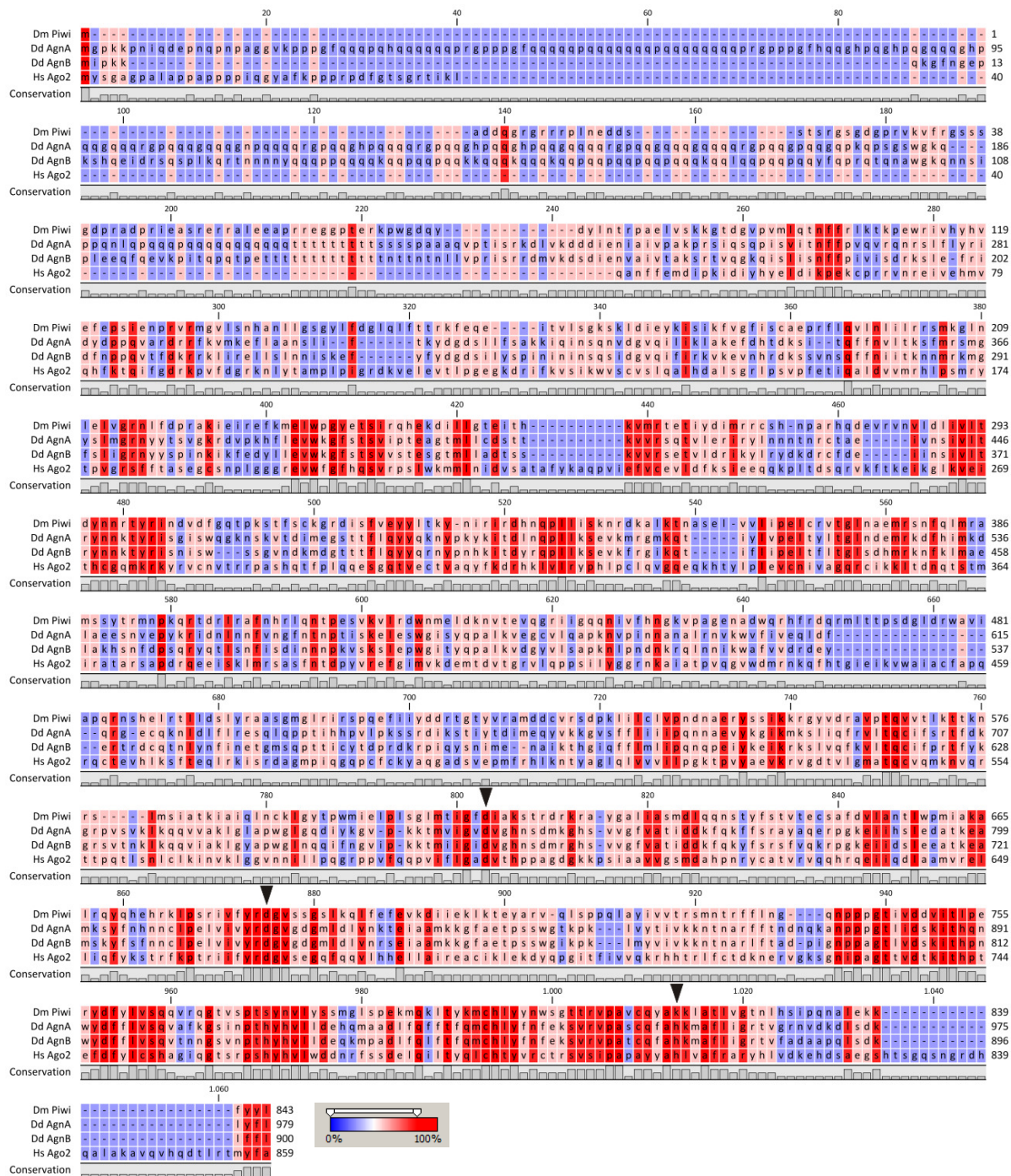


Abb. 6: Alignment verschiedener Argonauten Proteine

Vergleich der Aminosäuresequenzen der Proteine PIWI (NP_476875.1), AgnA (XP_643218.1), AgnB (XP_635708) und Ago2 (Q9UKV.3). In rot sind Aminosäuren dargestellt, die entweder identisch sind oder die gleichen chemischen Eigenschaften besitzen. Aminosäuren, die nicht konserviert in den verglichenen Proteinen sind, sind blau markiert. Mit schwarzen Dreiecken sind die Aminosäuren der katalytischen Triade DDH der PIWI-Domäne gekennzeichnet. Im Protein Piwi setzt sich die Triade aus dem Motiv DDK zusammen. Dd = *D. discoideum*, Dm = *D. melanogaster*, Hs = *H. sapiens*.

Die Anzahl der Argonauten Homologe variiert in verschiedenen eukaryotischen Organismen jedoch sehr stark (vgl. Tab. 1). So exprimiert *S. pombe* nur ein Argonauten Protein, wohingegen das Genom

von *C. elegans* für 25 Homologe dieser Proteinfamilie kodiert (Wei et al., 2012). Die Argonauten Proteine werden dabei abhängig von ihrer Lokalisation und Funktion in drei Unterfamilien eingeteilt: die Ago Unterfamilie wird in vielen Organismen ubiquitär exprimiert, wohingegen Proteine der WAGO Unterfamilie ausschließlich in Würmern exprimiert werden und zumeist sekundäre siRNAs binden (Yigit et al., 2006). In somatischen Zellen liegen Argonauten Proteine dieser beiden Klassen angereichert in den cytoplasmatischen *Processing bodies (P-bodies)* vor (Fenger-Gron et al., 2005). Die *P-bodies* sind hochdynamische und morphologisch sehr variable Aggregate, die sich aus Komplexen von mRNAs und Proteinen der mRNA-Degradation zusammensetzen.

Zur dritte Unterfamilie zählen die Piwi Proteine, welche nur in der Keimbahn exprimiert werden. Proteine dieser Klasse sind hochkonserviert und konnten in allen untersuchten tierischen Organismen nachgewiesen werden. In Pflanzen konnten bislang keine Piwi Proteine identifiziert wurden.

Tab. 1: Argonauten Proteine in verschiedenen Organismen

Organismus	Gesamtzahl der Argonauten Proteine	Ago Unterfamilie	Piwi Unterfamilie	WAGO Unterfamilie	Sonstige*
<i>A. thaliana</i>	10	10	-	-	-
<i>S. pombe</i>	1	1	-	-	-
<i>D. discoideum</i>	5	-	5	-	-
<i>C. elegans</i>	25	2	2	16	5
<i>D. melanogaster</i>	5	2	3	-	-
<i>M. musculus</i>	8	5	3	-	-
<i>H. sapiens</i>	8	4	4	-	-

* keiner Unterfamilie zugehörig.

4.5.1 Funktion der Argonauten Proteine

Abhängig von dem Organismus und dem jeweiligen Homolog übernehmen Argonauten Proteine Funktionen in unterschiedlichen Regulationsmechanismen des mRNA-Abbaus und der Translationskontrolle.

In *A. thaliana* binden die beiden Homologe AGO4 und AGO6 casRNAs und übernehmen Aufgaben in der Ausbildung von Heterochromatin und der transkriptionellen Stilllegung bestimmter Genorte (Zheng et al., 2007) (vgl. Abb. 2A). Für die Biogenese von *trans-acting* RNAs und die tasiRNA vermittelte Degradation von Ziel-RNAs werden die beiden Homologe AGO1 und AGO7 benötigt, die eine endonukleolytische Spaltung der Ziel-RNA katalysieren (Montgomery et al., 2008) (vgl. Abb. 2B). Darüber hinaus stellen diese beiden Homologe wichtige Komponenten der antiviralen Abwehr in der Pflanze dar (Qu et al., 2008).

In *A. thaliana* steuern AGO1 und AGO10 (Zwille) unterschiedliche Prozesse in der Entwicklung der Pflanze. Sie sind für miRNA bzw. siRNA Regulationsmechanismen essentiell, indem sie u.a. die Spaltung der Ziel-RNA übernehmen können (Mallory et al., 2009).

Das Argonauten Homolog AGO aus *S. pombe* bildet einen Schlüsselfaktor für die transkriptionelle Stilllegung spezifischer Genloci. AGO ist dabei essentieller Bestandteil des RITS-Komplexes, der durch die Rekrutierung von Methyltransferasen die Heterochromatisierung bestimmter genomischer Bereiche initiiert (Sigova et al., 2004) (vgl. 4.2.2). Darüber hinaus konnten für AGO auch Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation identifiziert werden, bei der das Protein die Degradation von mRNA vermittelt (Sigova et al., 2004).

In *C. elegans* übernimmt das Argonauten Homolog Rde-1 eine alternative Funktion, indem es den *passenger* Strang des siRNA Duplex schneidet (Steiner et al., 2009). Der einzelsträngige *guide* Strang wird von Rde-1 gebunden und identifiziert im Anschluss die Ziel-mRNA, die kooperativ durch die Funktionen der RdRP und Dicer degradiert wird (Steiner et al., 2009). Für die Steuerung der Entwicklung sowie den miRNA-abhängigen Regulationsmechanismen in dem Wurm sind die beiden Argonauten-Proteine Alg1 und Alg2 essentiell. Alg1 und Alg2 binden miRNAs und identifizieren mit ihrer Hilfe mRNAs, deren Translation daraufhin inhibiert wird. Sie sind unter anderem an der Steuerung der Muskelentwicklung und des epidermalen Cytoskelettes während der Larvenentwicklung beteiligt (Vasquez-Rifo et al., 2012).

In *D. melanogaster* weisen beide Argonauten Homologe *Slicer*-Aktivität auf, wobei AGO1 als Teil des miRISC die miRNA vermittelte Inhibierung von Ziel-mRNAs übernimmt. Ebenso ist das Protein für die Biogenese der miRNAs in *D. melanogaster* wichtig, da es die pre-miRNAs bei der Prozessierung durch Dcr-1 stabilisiert (Okamura et al., 2004). AGO2 bildet die katalytische Komponente des RISC-Komplexes. Dieses Homolog bindet endogene siRNAs und katalysiert die Spaltung von komplementären mRNAs (Kawamura et al., 2008) (vgl. Abb. 1).

Ago1 aus *H. sapiens* ist für den miRNA Signalweg ausschlaggebend. Es assoziiert mit miRNAs und vermittelt durch diese die Erkennung der Ziel-mRNA. Durch die Bindung des RNP-Komplexes kommt es zur Inhibierung der Translation der mRNA (Janowski et al., 2006). Ago2 ist für den siRNA Regulationsmechanismus verantwortlich und übernimmt hier die Bindung von siRNAs. Sie leiten das Argonauten Protein zur Ziel-mRNA, die von diesem endonukleolytisch gespalten wird (Meister et al., 2004). Weiterhin prozessiert Ago2 pre-miRNAs zu einer kürzeren Zwischenstufe auf deren Weg zu muren miRNAs (Diederichs und Haber, 2007).

4.5.2 Gonadenspezifische Proteine

Proteine der Piwi Unterfamilie werden in den Gonaden von tierischen Organismen exprimiert und sind dort an der Biogenese und der Funktion von piRNAs beteiligt. So sind Piwi Proteine und ihre assoziierten kleinen RNAs für die Keimbahnentwicklung und die Gametogenese essentiell (Thomson und Lin, 2009). Die piRNA-Proteinkomplexe liegen meist in abgegrenzten Zellstrukturen vor, die in *D. melanogaster* als *nuage* (Nagao et al., 2011) und in menschlichen Gonaden als *Chromatid bodies* bezeichnet werden (Kotaja und Sassone-Corsi, 2007).

In *D. melanogaster* ist PIWI für den Erhalt der keimbahnspezifischen Stammzellen verantwortlich, indem es deren Teilung fördert. Alle drei Piwi Proteine aus *D. melanogaster* sind für die Spaltung von piRNA Vorläufermolekülen notwendig und steuern zusammen den Amplifikationszyklus der sekundären piRNAs (vgl. 4.4). AUB wird für die Stilllegung des repetitiven *Stellate* Locus benötigt: Wenn die Expression von *Stellate* nicht mehr unterdrückt wird, hat das die Sterilität der Männchen zur Folge (Aravin et al., 2004).

In *M. musculus* sind die Piwi Homologe MIWI, MIWI2 und MILI, in der Spermatogenese für den Erhalt der Fruchtbarkeit und in die transkriptionelle Regulation von Transposons involviert (Deng und Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008). Kürzlich wurden piRNAs auch in somatischen Zellen, wie zum Beispiel in Neuronen und im zentralen Nervensystem von *M. musculus*, nachgewiesen (Lee et al., 2011).

4.5.3 Aufbau von Argonauten Proteinen

Die charakteristische Architektur dieser Proteinfamilie umfasst die PAZ- (Piwi-Argonaute-Zwille), MID- und PIWI-Domäne sowie einen konservierten N-Terminus. Alle Domänen weisen eine hohe Konservierung der Proteinstruktur entlang der Reiche der Prokaryoten, Archaeen und Eukaryoten auf. Darüber hinaus enthalten die Argonauten Proteine noch zwei *Linker*-Regionen, die die PAZ-Domäne mit dem N-Terminus und der MID-Domäne verbinden (vgl. Abb. 7A+B).

Intensive strukturelle Analysen der Domänenarchitektur von verschiedenen Argonauten Homologen identifizierten die PIWI-Domäne als katalytisches Zentrum der Proteinfamilie, während die MID- und PAZ-Domänen für die Bindung der *guide* RNA verantwortlich sind.

Eine detaillierte Strukturaufklärung des Argonauten Proteins aus *Pyrococcus furiosus* identifizierte deutliche strukturelle Ähnlichkeiten der PIWI-Domäne mit Proteinen der RNase H Familie (Song et al., 2004). Obwohl zwischen der PIWI-Domäne und den RNase H Proteinen keine Konservierung der primären Aminosäuresequenz besteht, wurde basierend auf der ausgeprägten Strukturhomologie und einer vergleichbaren Organisation eine katalytische Triade vermutet, dass das Argonauten

Protein für die *Slicer*-Aktivität des RISC Komplexes verantwortlich ist. Die Zuordnung der *Slicer*-Aktivität konnte daraufhin biochemisch bestätigt werden, da Argonauten Proteine nur in Anwesenheit einer *guide* RNA und Mg^{2+} eine Spaltung der komplementären Ziel-RNA katalysieren können. Weiterhin ist dafür ein konserviertes AS-Motif, ähnlich des Motif der RNase H, erforderlich (Rivas et al., 2005). Damit einhergehend sind die Spaltprodukte durch ein 5'-terminales Monophosphat und eine Hydroxylgruppe am 3'-Ende charakterisiert, was mit der Funktionsweise der RNase H übereinstimmt (Martinez und Tuschl, 2004). Homologe der RNase H Proteinfamilie weisen ein konserviertes Motiv bestehend aus zwei Asparaginsäuren (D) und einer Glutaminsäure (E) oder einer Asparaginsäure auf (DDE/DDD-Motiv) (Chang et al., 1990). Die PIWI-Domäne von Argonauten Proteinen weist eine Konservierung dieser katalytischen Triade auf, wobei die beiden Asparaginsäuren jedoch durch ein Histidin (H) oder Lysin (K) organisiert werden (DDH/DDK-Motiv) (Hock und Meister, 2008) (vgl. Abb. 6). Endonukleolytisch inaktive Argonauten Homologe weisen oftmals eine abweichende katalytische Triade auf. Jedoch können auch Argonauten Proteine mit einer organisierten Triade katalytisch inaktiv sein, wobei posttranslationelle Modifikation ein Grund für die fehlende *Slicer*-Aktivität sein könnten (Rivas et al., 2005; Johnston und Hutvagner, 2011).

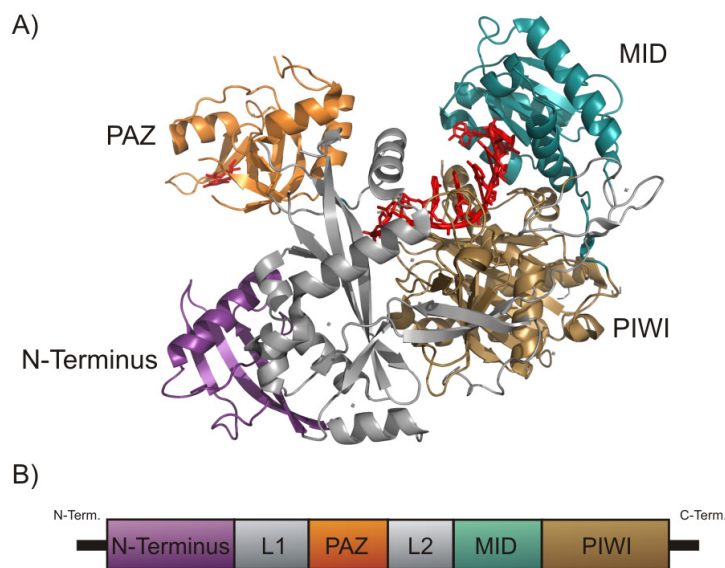


Abb. 7: Kristallstruktur des humanen Ago2

A) Kristallstruktur des humanen Ago2 Proteins im Komplex mit einer 21 nts langen RNA (Angelehnt an Schirle et al., 2012). Proteindomänen des Proteins sind farblich markiert (vgl. 7B). Die RNA, die rot dargestellt ist, wird von der PAZ- und MID-Domäne in dem Argonauten Protein verankert. Prozessierung und Visualisierung der Struktur erfolgte mit dem Programm Pymol Graphics System der Firma DeLano. PDB-Nummer: 4E13.

B) Schematische Darstellung der Proteindomänen und deren Organisation innerhalb eines Argonauten Proteins. L1, L2 = *Linker*-Regionen.

Neben der katalytischen Aktivität der PIWI-Domäne ist sie auch für die Interaktion mit anderen Faktoren des RNAi Mechanismus von Bedeutung. Interaktionspartner von Argonauten Proteinen, wie die GW182 Proteine aus *D. melanogaster*, enthalten oftmals Glycin-Tryptophan (GW)-reiche Domänen, die für die Bindung benötigt werden. Tryptophan-Bindestellen in der PIWI-Domäne bilden die Interaktionsstelle für diese GW-reichen Domänen der Interaktionspartner und über diese Bindestellen interagieren die Protein (Schirle und MacRae, 2012).

Die Inkorporation der *guide* RNA in das Argonauten Protein erfolgt durch die kooperative Bindung der funktionellen RNA durch die MID- und PAZ-Domäne (vgl. Abb. 7A). Das 5'-Monophosphat sowie die ersten beiden Basen der *guide* RNA werden dabei in einer tiefen Bindetasche innerhalb der MID-Domäne verankert. Die folgenden Basen stehen zudem in Interaktion mit der PIWI-Domäne (Boland et al., 2011). Die intensive Interaktion der beiden Domänen mit dem 5'-Ende der funktionellen RNA, insbesondere mit der endständigen Phosphatgruppe, gewährleistet die exakte Ausrichtung der komplementären Ziel-RNA in der PIWI-Domäne des Argonauten Proteins (Elkayam et al., 2012).

Die PAZ-Domäne ist evolutionär in Argonauten- und Dicerproteinen konserviert. Es konnte gezeigt werden, dass die PAZ-Domäne sequenzunabhängig RNA bindet und die 2 nts Überhänge am 3'-Ende von siRNA-Duplexen von dieser Domäne im Argonauten Protein verankert wird (Yan et al., 2003; Fenger-Gron et al., 2005). Durch die Bindung der RNA werden Argonauten Proteine stabilisiert, wodurch die Lebensdauer der Proteine gesteigert werden kann. Dies ist für die epigenetische Regulation in der Keimbahn durch PIWI-piRNA Komplexe von Bedeutung (Elkayam et al., 2012).

Der N-terminale Bereich der Argonauten Proteine ist die am wenigsten konservierte Domäne. Im humanen Ago2 wird die Domäne für das Entwinden der siRNAs benötigt. Für die Beladung des RISC mit siRNAs oder die Spaltung der Ziel-RNA ist sie nicht essentiell (Kwak und Tomari, 2012).

4.6 Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum (*D. discoideum*) ist ein eukaryotischer Organismus aus der Klasse der Eumycetozoa, der erstmals 1935 von Kenneth Bryan Raper beschrieben wurde. Diese singular lebende Amöbe ist auf Waldböden beheimatet und ernährt sich dort phagozytotisch von Bakterien. Die amöboiden Zellen sind 10-20 µm groß und verfügen über eine sehr flexible Plasmamembran, die Voraussetzung für die Beweglichkeit und die Phago- bzw. Pinozytose ist (Kessin, 2001). Durch die gezielte Mutation einiger Gene ist der Organismus in der Lage, in axenischem Medium zu wachsen. Unter diesen Bedingungen beträgt die Generationszeit 8-12 h, wobei die Reproduktion durch mitotische Teilung erfolgt.

Bei Nahrungsmangel gibt *D. discoideum* die einzellige Lebensweise auf und es erfolgt die Ausschüttung des sekundären Botenstoffs zyklisches AMP (cAMP), was zu der Aggregation von ca. 100.000 amöboiden Einzelzellen zu einem vielzelligen Organismus führt. Diese multizelluläre Organismusform dient der Ausbildung einer Dauerform, die aus Stiel- und Sporenzellen besteht (Loomis, 1975). Die so gebildeten Sporen sind resistent gegenüber widrigen Umweltbedingungen und können bei erneutem Nahrungsangebot wieder in die amöboide Lebensform übergehen, wohingegen die Stielzellen während der Differenzierung absterben (Kessin, 2001).

Die Fähigkeit einer Chemotaxis vermittelten Aggregation und der anschließenden Morphogenese von einzelnen Zellen zum vielzelligen Organismus macht *D. discoideum* zu einem interessanten Modellsystem für die Erforschung der molekularen Grundlagen der Zellbewegung und Zelldifferenzierung. Weiterhin eignet sich der Modellorganismus gut für genetische Manipulationen, da durch das Einfügen eines Selektionsmarkers via homologer Rekombination in Verbindung mit dem Cre-loxP System mehrfache Genunterbrechungen möglich sind (Faix et al., 2004). Darüber hinaus können RNAi vermittelte Gen *Knockdowns* (Martens et al., 2002) und REMI Mutagenesen (Kuspa und Loomis, 1992) in dem Organismus durchgeführt werden.

D. discoideum besitzt ein haploides Genom, das in sechs Chromosomen organisiert ist und insgesamt 34 Mbp umfasst. Weiterhin enthält der Organismus extrachromosomale Genombereiche in Form von Plasmiden und linearen DNA-Fragmenten (Palindromen), auf denen die ribosomalen RNAs kodiert sind. Im Jahr 2005 wurde das komplette Genom des *D. discoideum* Stamms AX4 sequenziert (Eichinger et al., 2005). Es enthält ungefähr 13.500 Protein-kodierende Gene, wobei der Großteil der Gene über ein oder zwei kurze Introns verfügt. Der GC-Gehalt des Genoms ist recht gering und beträgt nur rund 22 %. Das Genom von *D. discoideum* enthält viele repetitive Element, wie z.B. DNA Transposons, *long terminal repeat* (LTR) Retrotransposons und nicht-LTR Transposons (Glockner et al., 2001). Eines dieser LTR Retrotransposons ist DIRS-1 (*Dictyostelium inverted repeat sequence 1*), das in 40 vollständigen Kopien sowie weiteren 200 unvollständigen Kopien im Genom der Amöbe vorkommt (Rosen et al., 1983).

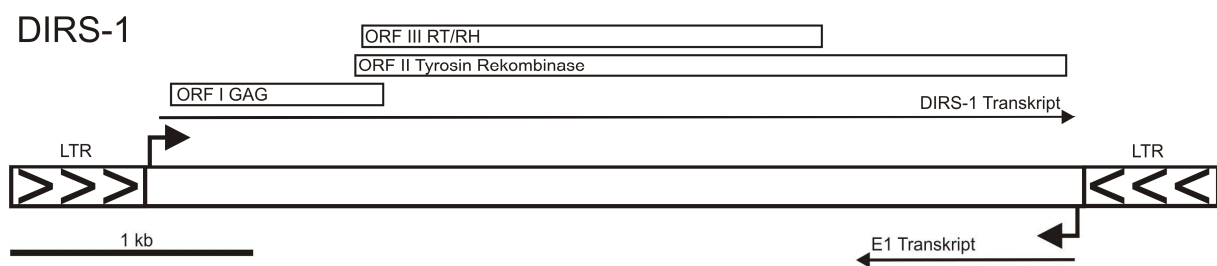


Abb. 8: LTR-Retrotransposon DIRS-1 aus *D. discoideum*

Schematische Darstellung des DIRS-1 Retrotransposons aus *D. discoideum*. Das Transposon umfasst eine Sequenz von ~4.1 kb und wird von zwei LTRs (~350 bp) eingerahmt. Das *sense* Transkript hat seinen Transkriptionsstart am Ende der linken LTR und enthält drei überlappende ORFs. ORF I kodiert dabei für ein GAG Protein (GAG), ORF II für eine Tyrosin Rekombinase und ORF III für eine Reverse Transkriptase/RNase H (RT/RH). Das E1 *antisense* Transkript besitzt eine Länge von ungefähr 900 nts, wobei der genaue Transkriptionsstart noch unbekannt ist.

Zusammengenommen umfassen die Sequenzen aller DIRS-1 Fragmente etwa 4 % des kompletten Genoms von *D. discoideum* (Eichinger et al., 2005). Der zentrale Bereich eines vollständigen Transposons umfasst ~4.1 kb und wird dabei von zwei terminalen Repeats, die invers zueinander angeordnet sind, flankiert (vgl. Abb. 8). DIRS-1 kodiert für drei überlappende, offene Leserahmen,

wobei ORF III Homologien zu anderen retroviralen Reversen Transkriptasen aufweist. In vegetativen Zellen wird DIRS-1 nur schwach exprimiert, wobei die Anzahl der Transkripte während der Entwicklung und unter Hitzeschock stark zu nimmt (Zuker et al., 1983). Nach einem durch Hitze induzierten Schock konnte zudem ein 900 nts langes *antisense* Transkript nachgewiesen werden, das teilweise komplementär zu der ORF II Sequenz ist und dessen Transkriptionsstartpunkt in der LTR liegt (Rosen et al., 1983). DIRS-1 bildet an einem Ende von jedem Chromosomen ein Cluster, wobei die centromere Histon Variante CenH3 mit diesem kolokalisiert (Dubin et al., 2010). Die Cluster fungieren vermutlich als Centromere in *D. discoideum* (Glockner und Heidel, 2009).

Neben den DIRS-1 Sequenzen, die etwa die Hälfte der Cluster ausmachen, liegen in diesen Bereichen auch noch andere Transposons wie DDT (20 %) und Skipper (10 %). Skipper ist ein Retrotransposon, das mit seinen 20 Kopien das zweithäufigste in der Amöbe ist. Es hat eine Länge von ~7 kb und umfasst somit etwa 1 % des Genoms von *D. discoideum* (Leng et al., 1998). Bei Skipper handelt sich wie auch bei DIRS-1 um ein LTR Retrotransposon, das zu der Ty3/gypsy Transposonfamilie gehört. Die drei offenen Leserahmen werden von zwei LTRs eingerahmt, die im Gegensatz zu DIRS-1 in der gleichen Richtung orientiert sind (vgl. Abb. 9). Skipper wird in vegetativen Zellen schwach exprimiert, wobei die Anzahl der Transkripte während der Entwicklung zunimmt (Leng et al., 1998).

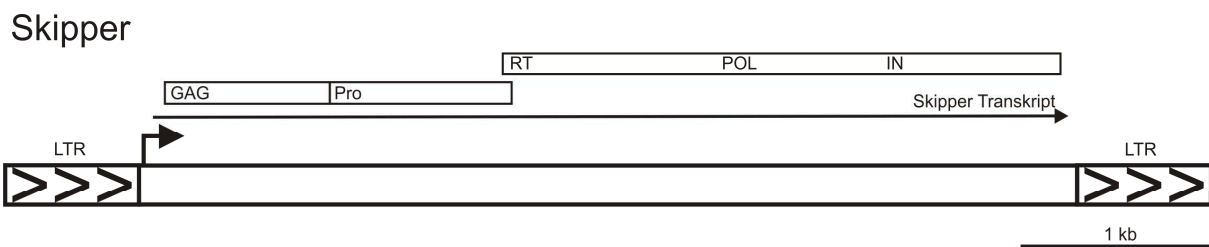


Abb. 9: Skipper Retrotransposon aus *D. discoideum*

Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Skipper Retrotransposons, dessen kodierender Bereich von zwei LTRs begrenzt wird. Es wird ein 7000 nts langes Transkript von diesem Retrotransposon gebildet, das für drei ORFs kodiert. Die ORFs von GAG und der Protease (Pro) werden durch ein Stopp-Codon voneinander getrennt. Der dritte ORF kodiert für eine Reverse Transkriptase (RT), Polymerase (POL) und Integrase (IN). Er überlappt mit dem Protease ORF, wobei der Leserahmen in Relation zu der Protease verschoben ist.

4.7 RNAi in *D. discoideum*

Im haploiden Genom von *D. discoideum* sind mehrere Proteine für RNA vermittelte Genregulationswege kodiert.

Die fünf kodierten Argonauten Proteine, AgnA bis AgnE, weisen die charakteristischen PAZ- und PIWI-Domänen auf und gehören alle der Piwi Unterfamilie an (Cerutti und Casas-Mollano, 2006). Daneben werden drei RdRPs, RrpA, RrpB, RrpC, sowie die beiden Dicer-ähnlichen Proteine DrnA und

DrnB exprimiert. Den beiden Dicer Homologen fehlt die typische Helikase Domäne; dafür weisen jedoch RrpA und RrpB eine solche Domäne auf (Martens et al., 2002; Shabalina und Koonin, 2008). *D. discoideum* besitzt kein Drosha Homolog, das in tierischen Organismen die Prozessierung der primären miRNAs im Kern übernimmt.

Genau wie Pflanzen und *C. elegans* gehört *D. discoideum* zu jenen Organismen, die RdRP Proteine für einige RNA vermittelte Signalwege benötigen. Daneben sind in dem fakultativ vielzelligen Organismus Regulationsmechanismen bekannt, die auch in tierischen Zellen zu finden sind. Das macht den Modellorganismus zu einem geeigneten System für die Erforschung solcher Signalwege.

In *D. discoideum* konnten bislang verschiedene Klassen kleiner regulatorischer RNAs mit Hilfe von *Deep Sequencing* Analysen identifiziert werden: es handelt sich um siRNAs, miRNAs und *Class I* RNAs (Aspegren et al., 2004; Hinas et al., 2007). Obwohl, wie oben beschrieben, ausschließlich Argonauten Proteine aus der Piwi-Unterfamilie kodiert werden, konnte bislang keine RNA-Spezies nachgewiesen werden, die strukturelle Ähnlichkeiten zu piRNAs aufweist.

Die weitaus größte Menge der siRNAs stammt vom Retrotransposon DIRS-1 ab (Hinas et al., 2007). Nur wenige siRNAs können dem Retrotransposon Skipper zugeordnet werden, wobei alle, wenn auch nicht ausschließlich, ihren Ursprung in einer unvollständigen Kopie auf Chromosom 2 haben (Hinas et al., 2007).

Für die beiden miRNAs mica1190 und mica1198, die entwicklungsabhängig exprimiert werden, wurden putative Targets vorhergesagt, die bislang allerdings noch nicht validiert werden konnten. Die Bildung dieser regulatorischen RNAs ist von DrnB (Hinas et al., 2007) und von einem Protein, das eine dsRBD Domäne besitzt, abhängig (Meier, unveröff.).

Class I RNAs bilden die dritte Kategorie kleiner regulatorischer RNAs in *D. discoideum*. Sie sind zwischen 52 und 65 nts lang, besitzen konservierte Motive und bilden *stem-loop* Strukturen aus (Aspegren et al., 2004; Avesson, 2011). Ob eine der bekannten RNAi Komponenten an der Prozessierung dieser kleinen RNAs beteiligt ist oder für ihre Wirkung benötigt wird, ist bislang noch unbekannt.

5 Zielsetzung

Zentrales Ziel dieser Arbeit ist die molekularbiologische Charakterisierung der Argonauten Proteine AgnA und AgnB aus *D. discoideum* innerhalb der RNA vermittelten Genregulation.

Argonauten Proteine sind in eukaryotischen Organismen hoch konserviert und haben ähnliche Funktionen. Die Hauptfunktion ist die Bindung kleiner regulatorischer RNAs, die den Ribonukleoproteinkomplex zu komplementären Ziel-RNAs leiten. Dort vermitteln Argonauten Proteine die Regulation der Genexpression maßgeblich.

Für die Suche nach RNA- und Proteininteraktionspartnern von AgnA und AgnB sowie für die Identifikation von Genen, deren Expression von diesen Proteinen abhängig ist, werden gentechnisch veränderte *D. discoideum* Stämme benötigt. Im Zuge dieser Arbeit sollen daher *Knockout*- und Überexpressions-Stämme generiert werden, die die Grundlage für die funktionelle Analyse der beiden Proteine darstellen.

Basierend auf den **Knockout-Stämmen** sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- *Haben Argonaut A und Argonaut B Einfluss auf die Prozessierung kleiner RNAs?*

In *D. discoideum* sind miRNAs und siRNAs bekannt, deren Mengen in den KO-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp mit Hilfe von *Northern Blots* untersucht werden sollen. Änderungen in der Menge dieser RNA-Spezies wären die ersten Hinweisen auf Argonauten-abhängige Signalwege. Eine starke Reduktion kleiner RNA-Spezies würde darauf hindeuten, dass Homologe aus *D. discoideum* für die Biogenese dieser RNAs benötigt werden.

- *Sind AgnA und AgnB an der Regulation von Retrotransposons beteiligt?*

Da der Hauptteil von endogenen siRNAs in *D. discoideum* von den Retrotransposons Skipper und DIRS-1 abstammt, soll die Expression dieser transposablen Elemente in den AgnA und AgnB KO-Stämmen untersucht werden. Die Anreicherung von transposablen Transkripten würde implizieren, dass die Argonauten Proteine an der Regulation von Skipper und DIRS-1 beteiligt sind. In diesem Fall kann mit Hilfe von *Run-On* Transkriptionen untersucht werden, ob die Regulation transkriptionell oder posttranskriptionell erfolgt. Darüber hinaus kann mit Hilfe von *Real-time* PCR und von *Southern Blots* analysiert werden, ob es in den KO-Stämmen zu einer erhöhten Transposition kommt.

- *Handelt es sich bei AgnA und AgnB um Komponenten im RNAi Signalweg?*

Mit Hilfe von artifiziellen Reportersystemen kann in KO-Stämmen untersucht werden, ob die ausgeschalteten Gene für die Funktion des RNAi Signalweges essentiell sind. Dazu wird ein *Hairpin*-Konstrukt in den Modellorganismus transformiert, das die Quelle zur Bildung von siRNAs darstellt. Diese richten sich gegen die mRNA eines endogenen Proteins, dessen Expression im Wildtyp Hintergrund inhibiert wird. Stellt sich heraus, dass es in den KO-Stämmen der Argonauten Proteine zur Derepression des Zielproteins kommt, so sind AgnA und AgnB für die Funktion des RNAi Signalweges notwendig.

- *Verändert sich das Transkriptom und das Repertoire kleiner RNAs in AgnA und AgnB KO-Stämmen?*

Mit Hilfe von *High Throughput* Sequenzierung kann festgestellt werden, ob sich die Zusammensetzung kleiner regulatorischer RNAs in Abhängigkeit von AgnA und AgnB verändert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch unbekannte und gering exprimierte RNAs erfasst werden.

Untersucht man mit Hilfe der gleichen Methode mRNAs im AgnA und AgnB *Knockout*-Hintergrund, können möglicherweise Ziel-mRNAs identifiziert werden, deren Regulation von den entsprechenden Proteinen abhängig ist.

Mit Hilfe der **Überexpressions-Stämme** sollen des Weiteren folgende Fragen beantwortet werden:

- *Was ist die subzelluläre Lokalisation von AgnB?*

Die Lokalisation von Argonauten Proteinen korreliert mit ihrer Funktion. Eine Kernlokalisation weist darauf hin, dass die Proteine möglicherweise an der transkriptionellen Regulation von Genen beteiligt ist. Lokalisieren Argonauten Proteine hingegen im Cytoplasma, ist davon auszugehen, dass sie in posttranskriptionelle Regulationswege involviert sind.

- *Mit welchen Proteinen und RNA Molekülen interagieren AgnA und AgnB?*

Um Protein-Interaktionspartner zu identifizieren, sollen Immunpräzipitate von AgnA und AgnB Fusionsproteinen massenspektrometrisch untersucht werden. Die Interaktion zweier Proteine kann durch Co-Immunpräzipitation oder durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Colokalisation weiter validiert werden. RNA Interaktionspartner von AgnA und AgnB können ebenfalls mit Hilfe von Immunpräzipitation isoliert werden. Ihre Analyse erfolgt mit Hilfe von *Northern Blots* oder *High Throughput* Sequenzierung.

6 Materialien

6.1 Geräte

- Autoklav
Zirbus, Bad Grund
- Blottingapparatur (Fastblot B449)
Biometra, Göttingen
- Brutschrank (Lab shaker)
Adolf Kühner, Schweiz
- Drehrad
Schütt Labortechnik, Göttingen
- Elektrophoresekammern
 - Agarosegele
Metallwerkstatt, Uni Kassel
 - GTC-Agarosegele
PeqLab, Erlangen
 - Proteingele, Mini-PROTEAN Tetra Cell
Biorad, München
 - PAA-Gele
Metallwerkstatt, Uni Kassel
- Elektroporator (Gene Pulser®)
Biorad, München
- Feinwaage
 - BP 210 S
Sartorius, Göttingen
 - MXSX-612
Denver Instruments, Göttingen
- Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRB)
Leica, Wetzlar
- Geldokumentation
Intas, Göttingen
- Geigerzähler
Mini-Instruments, GB
- Heizblock
Metallwerkstatt, Uni Kassel
- Hybridisierungsöfen (Compact Line OV4)
Biometra, Göttingen
- Kühlfalle
Bachofer Labort., Reutlingen
- Kulturschüttler
Schütt Labortechnik, Göttingen
- Magnetrührer (Heidolph MR 3000)
Bachofer, Reutlingen
- Mikroliter-Pipetten (20 µL, 200 µL, 1000 µL)
Abimed, Langenfeld
- Mikroliter-Pipette (10 µL)
Abimed, Langenfeld
- Mikrowelle (Lunik 250)
Aldi, Essen
- PCR-Maschine
 - Mastercycler® ep gradient S
Eppendorf, Hamburg
 - Mastercycler® ep realplex
Eppendorf, Hamburg
- Phosphor-Imager (FLA-7000)
Fujifilm, Düsseldorf
- Photometer
 - GeneQuant RNA/DNA calculator
Pharmacia, Schweden
 - Spekol 1300
Analytik Jena, Jena
- pH-Meter
Bachhofer, Reutlingen
- Pipettierhelfer (pipetboy accu)
Integra Biosciences, Schweiz
- Schüttler (Heidolph Rotmax 120)
Schütt Labortechnik, Göttingen
- Spannungsgeräte
 - EPS 200, EPS 600, EPS 3500
Pharmacia Biotech, Freiburg
 - Power Pack P25 T
Biometra, Göttingen
- Slot-Blot-Apparatur
MPI, Martinsried
- Sterilbank (*E. coli*)
Galaire, Italien
- Sterilbank (*D. discoideum*)
Nunc, Wiesbaden

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| • Stickstofftank | Messer Griesheim, Muddersbach |
| • Ultraschallprozessor (UP 200S) | Dr. Hielscher, Hamburg |
| • UV-Tisch | Bachofer, Reutlingen |
| • Vakuum Zentrifuge | Bachofer, Reutlingen |
| • Vortex | Bender & Hohbein, Schweiz |
| • Waage (PC440) | Mettler, Giessen |
| • Wasserbad (Multitemp III) | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| • Zentrifugen | |
| ○ Avanti [®] 30 | Beckman, München |
| ○ Centrifuge 5417C | Eppendorf, Hamburg |
| ○ Centrifuge 5810R | Eppendorf, Hamburg |
| ○ Microfuge Lite | Beckman, München |
| ○ Rotanta R | Hettich, Tuttlingen |
| ○ Rotina 48R | Hettich, Tuttlingen |

6.2 Verbrauchsmaterialien

- | | |
|---|-----------------------------|
| • Bechergläser | Schott, Mainz |
| • Costar-Platten | Sarstedt, Nürnberg |
| • Cryoröhrchen | Sarstedt, Nürnberg |
| • Deckgläschen | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| • Einmalhandschuhe (Nobaglove [®] -Nitril) | Sarstedt, Nürnberg |
| • Einmalskalpell | Bayha, Tuttlingen |
| • Einmalküvetten | Sarstedt, Nürnberg |
| • Einwegspritzen (Ominfix-F 1 mL) | B. Braun, Melsungen |
| • Einwegtücher | Kimberly-Clark, Forchheim |
| • EP-Küvetten (Gene Pulser [®] 0,4 cm) | Biorad, München |
| • Falconröhrchen (15 mL, 50 mL) | Sarstedt, Nürnberg |
| • Filterpapiere (3 mm Chr) | Whatman, Dassel |
| • Glasflaschen | Schott, Mainz |
| • Glaspipetten | Hirschmann, Eberstadt |
| • Hybridisierungsröhrchen | Biometra, Göttingen |
| • Nitrozellulosemembran (porablot [™] NCP) | Macherey-Nagel, Düren |
| • Nylonmembran (Hybond [™] -NX) | GE Healthcare, GB |
| • Objektträger | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| • Parafilm | Schütt, Göttingen |
| • PCR-Reaktionsgefäße | Sarstedt, Nürnberg |
| • Petrischalen | Sarstedt, Nürnberg |
| • pH-Papier | Roth, Karlsruhe |
| • Pipettenspitzen | Sarstedt, Nürnberg |
| • Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL) | Sarstedt, Nürnberg |
| • Reaktionsgefäße (15 mL; 50 mL) | Sarstedt, Nürnberg |
| • Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss | Sarstedt, Nürnberg |
| • Sterilfilter | Sarstedt, Nürnberg |

6.3 Chemikalien

• Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/40 %)	Roth, Karlsruhe
• Aceton	Fluka, Deisenhofen
• Agarose	Sigma, Taufkirchen
• Agar-Agar	Euler, Frankfurt am Main
• Aluminiumsulfat	Roth, Karlsruhe
• Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
• Bacto-Pepton	Merck, Darmstadt
• Bacto-Trypton	BD, Frankreich
• Borax	Fluka, Deisenhofen
• Borsäure	Roth, Karlsruhe
• Bromphenolblau	Fluka, Deisenhofen
• <i>Bovines</i> Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
• Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
• Complete Mini (Protease Inhibitor Tablette)	Roche, Mannheim
• Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
• DABCO	Roth, Karlsruhe
• 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth, Karlsruhe
• Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
• Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
• Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
• Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
• DTT	Roth, Karlsruhe
• EDC	Sigma, Taufkirchen
• Essigsäure (100 %)	Roth, Karlsruhe
• Ethanol (>99,8 %)	Roth, Karlsruhe
• Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
• Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
• EvaGreen [®] Fluorescent DNA stain	Jena Bioscience, Jena
• Ficoll 400	Sigma, Taufkirchen
• Gelvatol Typ II	Sigma, Deisenhofen
• Glucose	Roth, Karlsruhe
• Glycerin (86 %)	Roth, Karlsruhe
• Glycin	Roth, Karlsruhe
• Guanidinthiocyanat (GTC)	Roth, Karlsruhe
• Harnstoff (Urea)	Roth, Karlsruhe
• Hefeextrakt	Oxoid, GB
• HEPES	Roth, Karlsruhe
• Hexanukleotid Random-Primer-Mix	Roth, Karlsruhe
• HL5-Medium	Formedium, UK
• IPTG	Roth, Karlsruhe
• Isopropanol	Roth, Karlsruhe
• Isoton II	Coulter Electronics, Krefeld
• Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe

• Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
• Magermilchpulver	Reformhaus, Kassel
• Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
• Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
• Mercaptoethanol (-β)	Fluka, Deisenhofen
• Methanol	Roth, Karlsruhe
• Methylimidazol	Sigma, Taufkirchen
• MOPS	Roth, Karlsruhe
• Natriumacetat	Merck, Darmstadt
• Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
• Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
• Natriumdeoxycholat	Fluka, Deisenhofen
• Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
• Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
• Natriumiodat	Fluka, Deisenhofen
• Nonident® P40	Fluka, Deisenhofen
• Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
• Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
• Percoll	Sigma, Taufkirchen
• Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
• Phosphorsäure	Fluka, Deisenhofen
• Polyvinylpyrrolidone	Roth, Karlsruhe
• RiboLock Ribonuklease Inhibitor (40 u/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
• Saccharose	Roth, Karlsruhe
• Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt
• Sepharose (Sephadex® G50)	Fluka, Deisenhofen
• SDS	Roth, Karlsruhe
• TEMED	Roth, Karlsruhe
• Tolidiniumsalz (BCIP)	Fermentas, St. Leon-Roth
• Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
• Tris	Roth, Karlsruhe
• Triton-X 100	Roth, Karlsruhe
• TRIzol® Reagent	Invitrogen, GB
• Tween®20	Roth, Karlsruhe
• X-Gal	Fermentas, St. Leon-Roth
• Xylencyanol	Fluka, Deisenhofen

6.4 Puffer und Lösungen

AP-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
APS (20%)	0,2 g (w/v) APS ad 1 mL ddH ₂ O

BCIP-Stocklösung	50 mg (w/v) Toluidiniumsalz ad 1 mL DMF
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in 1x NCP
Borat-Puffer I (2x)	120 mM Borax 120 mM Borsäure pH 8,6 einstellen (HCl)
Borat-Puffer II (1x)	60 mM Borax 60 mM Borsäure pH 9,6 einstellen (NaOH)
<i>Church-Puffer</i>	0,5 M NaPO ₄ , pH 7,2 7 % (w/v) SDS 1 mM EDTA 1 % (w/v) BSA
<i>Crosslinking Solution</i>	127 mM Methylimidazol 0,16 M EDC in DEPC-H ₂ O pH 8,0 einstellen (HCl)
Crosslink-Reversal-Buffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 300 mM NaCl 0,5% NP40 0,5% Natriumdeoxycholat 5 mM EDTA 0,5% SDS
Dilution buffer (modifiziert)	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 3 mM MgCl ₂
Denhardt-Lösung (100 x)	2 % (w/v) Ficoll 400 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone 2 % (w/v) BSA
Denhardt-Puffer	5 x Denhardt-Lösung 5 x SSC 50 % (v/v) Formamid 1 % (w/v) SDS 120 mM Phosphatpuffer, pH 6,7

DEPC-H ₂ O	0,1-0,2 % (v/v) DEPC ad 1 L ddH ₂ O 2 x autoklavieren
Elutionspuffer (NiNTA)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 0,1 % (v/v) TritonX-100 250 mM Imidazol
EP-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM Saccharose pH 6,7 (HCl)
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/mL Ethidiumbromid in MP-H ₂ O
Hybridisierungspuffer EB	50% (v/v) Formamid 5x SSPE 50 mM NaPO ₄ , pH 6,5
Kollodiales Coomassie	0,1 % (w/v) CBB G250 2 % (w/v) Phosphorsäure 5 % (w/v) Aluminumsulfat
Lagerpuffer (Run-On)	40 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 50% Glycerin 14 mM β-Mercaptoethanol
Lösung I	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lösung II	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Lösung III	3 M Natriumacetat, pH 4,7
<i>Lower buffer</i>	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 14 mM SDS

Lyse-Puffer (GFP Nanotrap)	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0.5% NP40 25 mM MgCl ₂ pro 10 mL Roche proteinase inhibitor cocktail
Lysepuffer (NiNTA)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 0,1 % (v/v) TritonX-100 10 mM Imidazol
10 x MOPS-Puffer für Agarosegele	42,2 g MOPS 10,9 g Natriumacetat * 3 H ₂ O 3,7 g EDTA pH 7,0 (NaOH) ad 1 L ddH ₂ O
MOPS-Puffer für PAA-Gele	20 mM MOPS, pH 7
MP-H ₂ O	entsalztes H ₂ O (Filteranlage E- Pure)
NCP-Puffer (10 x)	12,1 g Tris/HCl, pH 8,0 87 g NaCl 5 g Tween® 20
OLB-Mix	100 µL Tris-HCl, pH 7,5 6,25 µL 2 M MgCl ₂ 1,7 µL β-Mercaptoethanol 1,25 µL 100 mM dCTP 1,25 µL 100 mM dGTP 1,25 µL 100 mM dTTP 250 µL 2 M HEPES, pH 6,6 150 µL 90 A260 U/mL Oligos 250 µL UV-H ₂ O
PBS (10 x), pH 7,6	80,6 g NaCl/HCl, pH 7,3 7,65 g Na ₂ HPO ₄ 2x H ₂ O 2,01 g KCl 1,91 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L H ₂ O

Paraformaldehyd-Fixierungslösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,7
Permeabilisierungspuffer	0,2 % (v/v) Triton-X 100 in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,7
Prähybridisierungspuffer EB	0,5 M NaPO ₄ , pH 6,5 7% (w/v) SDS
Probenpuffer (5 x) <i>complete</i>	10 mL 5 x Probenpuffer (<i>incomplete</i>) 1 mL β-Mercaptoethanol
Probenpuffer (5 x) <i>incomplete</i>	31 mL 1 M Tris, pH 6,8 10 g SDS 50 mM Glycerin 1,8 mg Bromphenolblau ad 100 mL ddH ₂ O
Proteingellaufpuffer (5 x)	15,1 g Tris 72 g Glycin 5 g SDS ad 1 L ddH ₂ O
Reaktionspuffer (5 x) (<i>Run-On</i>)	200 mM Tris/HCl, pH 7,9 50 mM MgCl ₂ 250 mM KCl 0,5 mM DTT 25 % Glycerin
RIPA Puffer (modifiziert)	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 % NP40 0,5 % Natriumdeoxycholat 1 mM EDTA
RIPA Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 300 mM NaCl 0,5 % NP40 0,5 % Natriumdeoxycholat 1 mM EDTA 0,1 % SDS

RNA-Auftragspuffer (3x)	950 µL Formamid 50 µL 0,5 M EDTA Spuren Bromphenolblau Spuren Xylencyanol
SDS-Lysepuffer	7 % (w/v) SDS in TE
<i>Semi-dry Blotting</i> Puffer	5,8 g Tris 2,92 g Glycin 0,38 g SDS 200 mL Ethanol ad 1 L ddH ₂ O
Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)	2 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄
SSC (20 x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
SSPE (20 x)	3,6 M NaCl 200 mM NaPO ₄ 20 mM EDTA pH 7,4 (NaOH)
<i>Stringency RIPA buffer A</i>	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 M NaCl 1 % NP40 1 % Natriumdeoxycholat 1 mM EDTA 0,1 % SDS 1 M Urea
<i>Stringency RIPA buffer B</i>	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 M NaCl 1 % NP40 1 % Natriumdeoxycholat 1 mM EDTA 0,1 % SDS 2 M Urea
<i>Stripping</i> Puffer	0,1 x SSC 1 % (w/v) SDS

TBE-Puffer (5 x)	445 mM Tris 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
<i>Upper buffer</i>	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 14 mM SDS
Waschpuffer (NiNTA)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 0,1 % (v/v) TritonX-100 50 mM Imidazol
Wasch-Puffer (GFP Nanotrap)	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 25 mM MgCl ₂
Waschpuffer I	2 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschpuffer II	1 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschpuffer III	0,5 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschpuffer IV	0,2 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Zelllysepuffer	50 mM HEPES 40 mM MgCl ₂ 20 mM KCl 5 % (w/v) Saccharose
Zelllysepuffer (<i>Run-On</i>)	Zelllysepuffer + 14 mM β-Mercaptoethanol

6.5 Kits

- | | |
|---|-------------------------|
| • NucleoBond [®] PC 100 | Macherey-Nagel, Düren |
| • NucleoSpin [®] Extract II | Macherey-Nagel, Düren |
| • NucleoSpin [®] miRNA | Macherey-Nagel, Düren |
| • CloneJET [™] PCR-Cloning Kit | Fermentas, St. Leon-Rot |
| • GeneJET [™] Genomic DNA Purification Kit | Fermentas, St. Leon-Rot |

- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit Fermentas, St. Leon-Rot
- pGEM®-T Easy Vector System I Promega, Mannheim

6.6 Enzyme und Enzympuffer

Enzyme:

- DNaseI (RNase frei) 1 u/μl Fermentas, St. Leon-Rot
- Fast AP 1 u/μL Fermentas, St. Leon-Rot
- Klenow-Fragment 10 u/μL Fermentas, St. Leon-Rot
- *Micrococcal Nuclease* 300 u/μL Fermentas, St. Leon-Rot
- *Pfu* DNA Polymerase Universität Kassel
- Proteinase K 25 mg/mL Roth, Karlsruhe
- Restriktionsenzyme 10 u/μL Fermentas, St. Leon-Rot
- RNase A 1 mg/mL Merck Biosciences, Bad Soden
- S1 Nuclease 100 u/μL Fermentas, St. Leon-Rot
- T4 DNA-Ligase 1 u/μL Fermentas, St. Leon-Rot
- T4 Polynukleotid-Kinase 10 u/μL Fermentas, St. Leon-Rot
- T7 RNA Polymerase Universität Kassel
- *Taq* DNA Polymerase Universität Kassel

Enzympuffer:

- DNaseI Puffer 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- *Pfu* Puffer (+MgSO₄) 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Puffer B 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Puffer G 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Puffer O 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Puffer R 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Puffer Tango 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Reaktion Puffer A 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Reaktion Puffer für S1 5 x Fermentas, St. Leon-Rot
- T4 DNA Ligase Puffer 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- *Taq* Puffer +KCl/MgCl₂ 10 x Fermentas, St. Leon-Rot
- Transkription Puffer 5 x Fermentas, St. Leon-Rot

6.7 Nukleotide

- Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Fermentas, St. Leon-Rot
- Ribonukleotide (ATP, CTP, GTP, UTP) Fermentas, St. Leon-Rot
- Radionukleotide
 - [α-³²P] dATP (110 TBq/mmol) Hartmann Analytic, Braunschweig
 - [γ-³²P] dATP (110 TBq/mmol) Hartmann Analytic, Braunschweig
 - [α-³²P] UTP (110 TBq/mmol) Hartmann Analytic, Braunschweig

6.8 Größenstandards

- | | |
|---|-------------------------|
| • GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus | Fermentas, St. Leon-Rot |
| • GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| • GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus | Fermentas, St. Leon-Rot |
| • microRNA Marker | NEB, GB |
| • PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| • RiboRuler™ Low Range RNA Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |

6.9 Antikörper

Erste Antikörper

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| • Kaninchen-Anti-CadA (DdCad-1) | Universität Toronto, Kanada |
| • Kaninchen-Anti-HA (sc805) | Santa Cruz Biotech., USA |
| • Maus-Anti-Coronin | Universität Kassel, Kassel |
| • Maus-Anti-GFP | Universität Kassel, Kassel |
| • Maus-Anti-MYC | Universität Kassel, Kassel |
| • Ratte-Anti- α Tubulin | Universität Kassel, Kassel |

Zweite Antikörper

- | | |
|--|------------------|
| • Alexa288-gekoppelter Ziege-Anti-Maus | Millipore, USA |
| • AP-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen | Dianova, Hamburg |
| • AP-gekoppelter Ziege-Anti-Maus | Dianova, Hamburg |
| • Cy3-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen | Dianova, Hamburg |
| • Cy3-gekoppelter Ziege-Anti-Maus | Dianova, Hamburg |

6.10 Antibiotika

- | | |
|--|--------------------------|
| • Amphotericin (0,25 mg/mL) | PAA, Cölbe |
| • Ampicillin (50 mg/mL) | Roth, Karlsruhe |
| • Blastidicin (5 mg/mL) | MP Biomedicals, Eschwege |
| • Geneticin G418 (100 mg/mL) | PAA, Cölbe |
| • Kanamycin | Sigma, Taufkirchen |
| • Penicillin (10000 u/mL)/
Streptomycin (10 mg/mL) | PAA, Cölbe |

6.11 Nährmedien

BS10-Medium

G0-Medium
+ 10 μ g/mL Blastidicin

BS10/G10-Medium

G0-Medium
+ 10 μ g/mL Geneticin (G418)
+ 10 μ g/mL Blastidicin

G0-Medium	HL5-Medium + 50 µg/mL Ampicillin + 0,25 µg/mL Amphotericin + 100 u/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin
G10-Medium	G0-Medium + 10 µg/mL Genitacin (G418)
HL5-Medium, pH 6,7 (Watts und Ashworth, 1970)	2,5 g Bacto-Trypton 2,5 g Pepton aus Casein 5 g Protease-Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g Glucose 0,35 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 1,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L H ₂ O
LB-Medium, pH 7,0	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L H ₂ O
LB _{Amp} -Medium	LB-Medium + 50 µg/mL Ampicillin
LB-Agar	LB-Medium + 13 g/L Agar-Agar
LB _{Amp} -Agar	LB-Agar + 50 µg/mL Ampicillin
Phosphatagar	Soerensen-Phosphatpuffer + 13 g/L Agar-Agar
SM-Agar, pH 6,5 (Singleton et al., 1987)	13 g Agar-Agar 10 g Bacto-Pepton 10 g Glucose 1 g Hefeextrakt 1 g Magnesiumsulfat 2,2 g KH ₂ PO ₄ 1,3 g K ₂ PO ₄ * 3H ₂ O ad 1 L H ₂ O

6.12 Bakterienstämme

- *Escherichia coli*-DH5 α TM Invitrogen, Karlsruhe
- *Escherichia coli* One Shot[®] TOP10 Invitrogen, Karlsruhe
- *Escherichia coli* Rosetta2 pLysS Invitrogen, Karlsruhe
- *Klebsiella aerogenes* Universität Kassel

6.13 *D. discoideum* Stämme

Stämme aus vorherigen Arbeiten

Stamm	Urheber
AX2 wt	Watts et al., 1970
AX2 pDneo2a-GFP	Dubin et al., 2010
AX2 pDneo2a-HA	Dubin et al., 2010
AX2 pDneo2a-GFP-AgnA	Meier, 2010
AX2 pDneo2a-AgnA-GFP	Meier, 2010
AX2 pDneo2a-HA-AgnA	Meier, 2010
AX2 pDneo2a-AgnA-HA	Meier, 2010
AX2 pDneo2a-AgnB-HA	Dubin, 2010
AX2 pDneo2a-AgnB-GFP	Dubin, 2010
Xrn1 KO	Moog, 2012

Generierte Stämme in der vorliegenden Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Transformierter Vektor
AgnA KO	AX2 wt	pGEM-T-Easy-agnA fragment for KO w/o loxP +BSr rev
AgnB KO	AX2 wt	pGEMnAgnB KO
AgnB KO rox	AgnB KO	pDEX RH NLS-cre
AgnA/B KO	AgnB KO rox	pGEM-T-Easy-agnA fragment for KO w/o loxP +BSr rev
AX2 pDneo2a-GFP-AgnB	AX2 wt	pDneo2a-GFP-AgnB
AX2 pDneo2a-HA-AgnB	AX2 wt	pDneo2a-HA-AgnA

6.14 Oligonukleotide

Primer	Primer-Nr.	Schmelztemp. (°C)	Verwendung	Sequenz
BB021_NdeI_agnA_LA	#2217	58	Klonierung	CATATGGGTCCTAAAAACCAACATACAAGAT
BB022_agnA_BglII_LA	#2218	57	Klonierung	AGATCTAACACTTTGGTAGTTGAATCACATAA
BB023_BglII_agnA_RA	#2219	56	Klonierung	AGATCTCAGACTGTATTGGAAAGAATTAGAT
BB024_agnA_BamHI_RA	#2220	56	Klonierung	GGATCCTTAAAGGAAATATAATTTATCAGATAAATC
BB026_agnB_BamHI	#2222	59	Klonierung	GGATCCTTAAAGGAAATAATTTATCAGATAATTGAG
BB038_agnA_PstI_KO_LA	#2234	62	Klonierung, Sonde	CTGCAGACATTGAGTTAAACTCTGAATTGGATCAATG
BB041_BamHI_agnB-2	#2301	60	Klonierung	GGATCCAATGATCCAAAAAACAAAAAGGATTC
BB042_agnB_seq_fw	#2302	53	KO-Check	CTGGATTAAGTGATCATATGCGTAA
BB044_agnA_outer_fw	#2304	51	KO-Check	CCAAAAATAAAATCACCGATTTAAATC
BB046_agnB_outer_fw	#2306	51	KO-Check	CTATTTATCTTTTAAACAAATACATAATATTTTC
BB047_agnB_outer_rev	#2307	54	KO-Check	TACTTGAGAGACTAAAAAGAAATCATACC
BB048_agnB_outer_rev_2	#2308	52	KO-Check	ATTTTGATTGTGTGTTTATTATTATGTGATG
BB049_agnA_KO_outer_fw	#2309	55		CCAAAAAATAAAATCTTTGAAAAGTCAGCG
BB050_agnA_KO_inner_rev	#2310	57		GAAAAGATACATTGAGTTAAACTCTGAATTGG
BB059_agnA_wo_loxP_N_outer	#2319	49	KO-Check	TAGTATACCTTACCATAATAAAAAAC
BB060_agnA_wo_loxP_C_outer	#2320	52	KO-Check	GCAACCACTTGTGTTTCAATTTG
BB067_Sall_agnB_LA_N_pDneo2a	#2843	60	Klonierung	GTCGACAATGATCCAAAAAACAAAAAGGATTC
BB070_agnB_XhoI_RA_N_pDneo2a	#2846	60	Klonierung	CTCGAGTTAAAGGAAATAATTTATCAGATAATTGAGG
BB076_NheI_agnB	#2852	59	Klonierung	GCTAGCATGATCCAAAAAACAAAAAGGATTC
BB077_agnB_XhoI	#2853	58	Klonierung	CTCGAGTTAAAGGAAATAATTTATCAGATAATTG
BB082_CAGC_NdeI_agnA	#2858	62	Klonierung	CAGCCATATGGGTCCTAAAAACCAACATACAAGAT
BB083_agnA_XhoI_CCG	#2859	60	Klonierung	GCCGGATCCTTAAAGGAAATATAATTTATCAGATAAATC
BB094_BamHI_agnA_truncated	#2870	60	Klonierung	GGATCCATGTTATTATGTGATTCAACTACCAAAGTTG
BB095_agnA_PstI_truncated	#2871	56	Klonierung	CTGCAGTTAAAGGAAATATAATTTATCAGATAAATC
BB096_agnA_XhoI_truncated	#2872	56	Klonierung	CTCGAGTTAAAGGAAATATAATTTATCAGATAAATC
BB097_BamHI_agnB_truncated	#2873	60	Klonierung	GGATCCATGTTATTAGCAGATACAAGTTCAAAG
BB098_agnB_PstI_truncated	#2874	58	Klonierung	CTGCAGTTAAAGGAAATAATTTATCAGATAATTG
BB099_agnB_XhoI_truncated	#2875	58	Klonierung	CTCGAGTTAAAGGAAATAATTTATCAGATAATTG
BB110_PstI_D-1_ORF1	#2886	60	Klonierung	CTGCAGAAATGTCTACCACTGTTAATAAATGATG
BB111_D-1_ORF1_BamHI	#2887	60	Klonierung	GGATCCCTTCTGTTCTTCTGAAAACGG
BB112_PstI-D-1_ORF2	#2888	60	Klonierung	CTGCAGAAATGGCCGATCTAACCACTTC
BB113_D-1_ORF2_BamHI	#2889	59	Klonierung	GGATCCTGAAATTTGGACGACAGTATTTAAG
BB114_PstI_D-1_ORF3	#2890	62	Klonierung	CTGCAGAAATGCTAAACCCGATTCGATTTTC
BB115_D-1_ORF3_BamHI	#2891	61	Klonierung	GGATCCCATGAGATTGAAAAGTTGAATAATCC
BB141_DIRS_1_sense	#2916	49	Sonde	TAGAGGCATCATTATTATTAACAGT
BB143_DIRS_2_sense	#2918	53	Sonde	CATACTTGACATAAGAAGCAAAGGT
BB145_DIRS_3_sense	#2920	58	Sonde	GAACAAACGTCACCTACTGGTAAAG
BB147_DIRS_4_sense	#2922	58	Sonde	AACCCGAACGGCATTGTTTCCAAC
BB149_DIRS_5_sense	#2924	58	Sonde	CTGACTTGACATCTTGAGGAATGGG
BB151_DIRS_6_sense	#2926	56	Sonde	CTTCAGTTGCCAGTTGTAACCTTG
BB153_DIRS_7_sense	#2928	54	Sonde	TACTTTGAGAGTTGAAGGTTCCCAT
BB155_DIRS_8_sense	#2930	49	Sonde	AATATTGAAACAACACCACTTCTTT

BB159 DIRS_LE_qPCR_fw	#2934	60	Real-time PCR	TGGCCGATCTAACAACTTCA
BB160 DIRS_LE_qPCR_rev	#2935	60	Real-time PCR	CCAAACTGTGTTGTGGTGGA
BB167_DDB0241004_INTRON_CHR_1	#2942	68	Sonde	CGACCCCGACCCTCTATCAAAGGGTAGTCTCAT
BB175_DDB0252359_Intron_PLUS_3' (CHR 6)	#2950	42	Sonde	AAAGACTCTTAAAGTAATT
BB177_DDB0251096_PLUS (CHR 6)	#2952	47	Sonde	ATTAAAGATTGGACTAGTTCTGA
BB179_DDB0239154_Intron_MINUS (CHR 1)	#2954	63	Sonde	ATCGATTTGTAATCCGAGAAATGTAATTGATTGAGTTGGT TC
BB180_agnA_Trans_Check_fw	#2955	60	Real-time PCR	TCCAATTAATAACGCCAATGC
BB181_agnA_Trans_Check_rev	#2956	60	Real-time PCR	ATCACGGGAATCTTTGGAA
BB182_agnB_Trans_Check_fw	#2957	60	Real-time PCR	CGCGATAAAAGACCAATTCAA
BB183_agnB_Trans_Check_rev	#2958	60	Real-time PCR	ACCCCATGGTGCATAACCTA
Coronin_qPCR_for	#1828	56	Real-time PCR	AAATATCGTCATGTTTTGCAGCACAAAC
Coronin_qPCR_rev	#1829	56	Real-time PCR	AATAATGGAATGATGTGGTTTTACCTGAA

Primer aus anderen Arbeiten

Primer	Primer -Nr.	Schmelz-temp. (°C)	Urheber	Verwendung	Sequenz
Bsr G1-5A	#385	49	S. Fuhrmann	PCR	CGCTACTTCTAGTAATTCTAGA
#1923 cinD-1_qPCR for	#1923	54	S. Wiegand	Real-time PCR	GCCAGAAATGCTTTGAAAATGACAC
#1924 cinD-1_qPCR rev	#1924	54	S. Wiegand	Real-time PCR	GAGTGGTTTGCCAATTTCTTTCT
DD5.8S		55	F. Söderbom	Sonde	CCAGTAGGCTGCAATCAAGTG
DDsno6 (DdR-6)	#2554	56	F. Söderbom	Sonde	GGCCAACAATTTTCTCAGCAAGAC
DIRS LE for	#2981	50	F. Söderbom	PCR	AGTAAATCCAGTAGTGGGAGT
DIRS LE for T7	#2980	67	F. Söderbom	PCR	GTTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAATCCA GTAGTGGGAGT
DIRS LE rev	#2982	50	F. Söderbom	PCR	GTGATGCAATCTGATTTTCGGA
DIRS LE rev T7	#2979	65	F. Söderbom	PCR	GTTAATACGACTCACTATAGGGTATGCAATC TGATTTTCGGA
DIRS-1 LTR FW	#896	45	M. Kuhlmann	Real-time PCR, Sonde	ATCAAATGTTTTAGTTTTAGTG
DIRS-1 LTR REV	#897	45	M. Kuhlmann	Real-time PCR, Sonde	AACATTTATTTATTTGAATTTCCC
DIRS small RNA	#2599	52	F. Söderbom	Sonde	ACCTCGATTGGAGTCAATGGA
ddi-mir-1176_rc	#2601	47	F. Söderbom	Sonde	GCTTCTCTGATAAAAATTGG
ddi-mir-1177_rc	#2602	50	F. Söderbom	Sonde	GAACCATTAACCCCTAACTGG
MJD83	#1927	52	M. Dubin	Real-time PCR	GGAAGAAGAAAGCCCATTC
MJD84	#1928	54	M. Dubin	Real-time PCR	CAGAGAAGCCATAGCGGAAC
Skipper small RNA (3' stem)		46	F. Söderbom	Sonde	AAGTCAAAGACAACCTCCATT
Skipper small RNA (5' stem)		59	F. Söderbom	Sonde	AAAAAATGCTGCCACTGCTCTCATCTTCA
Skipper small RNA (loop)		47	F. Söderbom	Sonde	AGCTAAAACCATTTGATGCTTT
SM5_tRNA_Asp_mid	#2263	75	S. Müller	Sonde	CCCGGGCCTTTTCGCGTGACAGGCGAAAATCC TCACCACTAGACCAACAAG
SM70_skipper_RT_fw_qPCR	#2776	52	S. Müller	Real-time PCR	GTAGGTTATCAAAGAAACACAATG
SM71_skipper_RT_rev_qPCR	#2777	53	S. Müller	Real-time PCR	ACTTCTCTGATCCATTAGGTTTC
SW101 cadA_siRNA-1		56	S. Wiegand	Sonde	TATCACCATTGTTGAATCTTACAGTTTCAC
SW116 cadA_OLB_for		52	S. Wiegand	Sonde	CTCCAACCTCCAGGAAAATCC
SW117 cadA_OLB_rev		52	S. Wiegand	Sonde	GTCATATGGTGTATGTGTTTGAC

6.15 Plasmide

Kommerziell erhältliche Plasmide

Plasmid	Urheber
pET15b	Novagen
pET28a	Novagen
pGEM [®] -T-Easy	Promega, Mannheim
pJet1.2	Fermentas, St. Leon-Rot
pMAL-c2X	New England Biolabs

Plasmide aus anderen Arbeiten

Plasmid	Urheber
BSr Expressionskassette Plasmid #27	Sutoh, 1993
pDEX RH NLS-cre	Faix et al., 2004
pGEMnAgnB_KO	Dubin, unveröffentlicht
pDM304	Veltman et al., 2009
pDM304 cadA hp II	Wiegand, 2012
pDneo2a-GFP	Dubin et al., 2010
pDneo2a-GFP-AgnA	Meier, 2010
pDneo2a-AgnB-GFP	Dubin et al., 2010
pDneo2a-HA	Dubin et al., 2010
pDneo2a-mRFP	Dubin et al., 2010
pDneo2a-MYC	Dubin et al., 2010
pLPBLP	Faix et al., 2004

Plasmide dieser Arbeit

Die nachfolgenden Plasmide wurden in Rahmen der vorliegenden Dissertation erstellt:

pET15b-AgnA

Für die Klonierung der kodierenden Sequenz von AgnA in den Expressionvektor pET15b, wurde das Gen in zwei Teilen mittels PCR auf cDNA amplifiziert. Der linke Arm wurde mit den Primer BB021/BB022 (#2217/#2218) gewonnen und in den pGEM-T-Easy Vektor ligiert. Für die Amplifikation des rechten Arms wurden die Primer BB023/BB024 (#2219/#2220) verwendet und das PCR-Produkt wurde ebenfalls in den pGEM-T-Easy Vektor ligiert. Nach der Sequenzierung wurde der linke Arm mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BglII* ausgeschnitten und in den mit *NdeI/BglII* geöffneten pGEM-T-Easy-agnA-RA ligiert. Das komplette *agnA* Gen wurde mit *NdeI/BamHI* herausgeschnitten und anschließend in den mit den gleichen Enzymen geöffneten pET15b ligiert.

pET28a-AgnA

Zur Klonierung des Vektors pET28a-AgnA wurde das Gen mittels der Primer BB082/BB083 (#2858/#2859) von dem Vektor pET15b-AgnA mittels PCR amplifiziert und in pJet1.2 ligiert. Nach der Sequenzierung wurde das Gen über die angefügten Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* aus dem Vektor geschnitten. Der Zielvektor pET28a wurde mit *NdeI* und *XhoI* linearisiert und das *agnA* Gen hinein ligiert.

pET28a-AgnA truncated

Zur Expression eines His₆-markierten AgnA Proteins, bei dem der N-terminale Teil deletiert ist, wurde die kodierende Sequenz mittels der Primer BB094/BB096 (#2870/#2872) von dem Vektor pET15b-AgnA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pJet1.2 ligiert und im Anschluss sequenziert. Über die angefügten Schnittstellen *BamHI* und *XhoI* wurde das Gen in den Zielvektor pET28a ligiert.

pMAL-c2X-AgnA truncated

Für die Expression des MBP-markierten AgnA *truncated* wurde der benötigte Genabschnitt mit den Primern BB094/BB095 (#2870/#2871) von dem Vektor pET15b-AgnA amplifiziert. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt in pJet1.2 ligiert und danach sequenziert. Das verkürzte *agnA* Gen wurde mit *BamHI* und *PstI* ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten pMAL-c2X ligiert.

pET15b-AgnB

Das *agnB* Gen soll für die rekombinante Expression in *E. coli* in den Expressionsvektor pET15b kloniert werden. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern BB041/BB026 (#2301/#2222), wobei cDNA als Template für die PCR eingesetzt wurde. Das PCR-Produkt wurde in pGEM-T-Easy ligiert und im Anschluss sequenziert. Über die in der PCR angefügten *Bam*HI Schnittstellen wurde das Gen ungerichtet in den pET15b ligiert und die gewünschte Orientierung durch Restriktionsverdauung überprüft.

pET28a-AgnB

Für die Klonierung des *agnB* Gens in den *E. coli* Expressionsvektor pET28a wurde es mit den Primern BB076/BB077 (#2852/#2853) von dem Vektor pET15b amplifiziert und in den Vektor pJet1.2 ligiert. Über die angefügten Restriktionsschnittstellen *Nhe*I und *Xho*I wurde das Gen herausgeschnitten und in den pET28a Vektor, der durch *Nhe*I und *Xho*I linearisiert wurde, ligiert.

pET28a-AgnB truncated

Zur rekombinanten Expression eines verkürzten His₆-markiertem AgnB Proteins wurde die kodierende Sequenz mit den Primern BB097/BB099 (#2873/#2875) von dem Vektor pET15b-AgnB amplifiziert. Danach wurde das PCR-Fragment in pJet1.2 kloniert und sequenziert. Die Sequenz wurde über *Bam*HI und *Xho*I aus dem Vektor geschnitten und über die gleichen Schnittstellen in pET28a ligiert.

pMAL-c2X-AgnB truncated

Für die Expression des MBP-markierten AgnB *truncated*, wurde der benötigte Genabschnitt mit den Primern BB097/BB098 (#2873/#2874) von dem Vektor pET15b-AgnB amplifiziert und in pJet1.2 ligiert. Nach der Überprüfung der Sequenz wurde das Gen über die angefügten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I aus dem Vektor geschnitten und in den mit *Bam*HI und *Pst*I linearisierten Vektor pMAL-c2X ligiert.

pDneo2a-GFP-AgnB und pDneo2a-HA-AgnB

Für die Expression von markierten AgnB Proteinen in *D. discoideum* wurde die genomische Sequenz des *agnB* Gens kloniert. Der *Tag* soll am N-Terminus des Proteins vorliegen. Das Gen wurde mit Hilfe der Primer BB067/BB070 (#2843/#2846) amplifiziert, wobei das Plasmid pDneo2a-AgnB-GFP (Dubin und Nellen, 2010) als Template verwendet wurde, und in den Vektor pJet1.2 ligiert. Nach der Sequenzierung wurde das Gen über die angefügten Schnittstellen *Sal*I und *Xho*I aus dem Vektor

geschnitten und in die ebenfalls mit *Sall* und *XhoI* geöffneten Vektoren pDneo2a-GFP und pDneo2a-HA (Dubin und Nellen, 2010) ligiert.

AgnA KO Konstrukt ohne loxP-sites (pGEM-T-Easy-agnA fragment for KO w/o loxP +BSr rev)

Zum *Knockout* des *agnA* Gens wurde ein KO-Plasmid mit einer BSr-Kassette kloniert, die über keine loxP sites verfügt. Ein Teil des kodierenden Bereichs von *agnA* wurde mit den Primern BB049/BB050 (#2309/#2310) von *D. discoideum* AX2 wt genomische DNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in pGEM-T-Easy kloniert und im Anschluss sequenziert. Die BSr-Kassette wurde aus dem Plasmid #27 (Sutoh, 1993) mit dem Enzym *Bam*HI ausgeschnitten und in den mit *Bgl*II linearisierten Vektor pGEM-T-Easy-agnA fragment ligiert. Im fertigen Vektor ist die BSr Kassette reverse zu dem *agnA* Genfragment inseriert.

AgnA KO Konstrukt mit loxP-sites (pGEM-T-Easy-agnA fragment for KO with BSr + loxP rev)

Für die Klonierung eines AgnA KO Konstruktes, bei welchem die BSr-Kassette mittels Cre-Rekombinase entfernt werden kann (Faix et al., 2004), wurde der Vektor pGEM-T-Easy-agnA fragment for KO mit *Bgl*II linearisiert. Die entstandenen Überhänge wurden mit T4 DNA Pol. gebluntet. Danach wurde die BSr-Kassette mit loxP sites über *Sma*I aus dem Vektor pLPBLP (Faix et al., 2004) geschnitten und in pGEM-T-Easy-agnA fragment for KO ligiert. Die BSr-Kassette ist revers zu der *agnA* Sequenz im Vektor.

pJet1.2-DIRS-1 ORF I fw und pJet1.2-DIRS-1 ORF I rev

Zur Generierung von *sense* und *antisense* Transkripten des DIRS-1 ORF I wurde der ORF mit Hilfe der Primer BB110/BB111 (#2886/#2887) amplifiziert, wobei *D. discoideum* AX2 wt genomische DNA als Template verwendet wurde. Das PCR-Produkt wurde in pJet1.2 ligiert. Durch die verwendeten Primer wurden die Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Bam*HI angefügt. Fw und rev bezeichnen die Stellung des ORFs zum T7-Promotors des pJet1.2 Vektors.

pJet1.2-DIRS-1 ORF II fw und pJet1.2-DIRS-1 ORF II rev

Für die Klonierung des DIRS-1 ORF II wurde die kodierende Sequenz mit den Primern BB112/BB113 (#2888/#2889) von genomische DNA von *D. discoideum* AX2 wt amplifiziert und in den Vektor pJet1.2 ligiert. Der ORF II kann mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Bam*HI aus dem Vektor geschnitten werden. Bei pJet1.2-DIRS-1 ORF II fw steht der ORF in gleicher Richtung zum T7-Promotor und bei pJet1.2-DIRS-1 ORF II rev entgegengesetzt zu diesem.

pJet1.2-DIRS-1 ORF III fw und pJet1.2-DIRS-1 ORF III rev

Zur Amplifikation des DIRS-1 ORF III wurden die Primer BB114/BB115 (#2890/#2891) verwendet. Für die PCR wurde genomische DNA eingesetzt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in pJet1.2 ligiert. Durch *Bam*HI und *Pst*I kann der ORF wieder aus dem Vektor geschnitten werden. Fw und rev bezeichnen die Stellung des ORFs zum T7-Promotors des pJet1.2 Vektors.

6.16 Sequenzen

Gen	Organismus	DDB bzw. Gene Bank-Nummer
<i>agnA</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0276299
<i>agnB</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0290377
<i>cinD-1</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0273061
<i>corA</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0267382
<i>DIRS-1</i>	<i>D. discoideum</i>	M11339.1; clone SB41
<i>Skipper</i>	<i>D. discoideum</i>	GB_AF049230.1
<i>sno6 (DdR6)</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0295531
<i>tRNA-Asp-GUC</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0294707
<i>U6 (rnu6)</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0295505

Genbezeichnungen nach www.dictybase.org bzw. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

7 Methoden

7.1 Zellbiologische Methoden

7.1.1 Anzucht von *E. coli*

Falls nicht anders beschrieben, werden *E. coli* Zellen in LB-Medium bei 37 °C im Brutschrank angezogen, wobei das Medium durch einen Schüttler kontinuierlich bewegt wird. Zur Selektion werden dem Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. LB-Agar-Platten werden nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C anschließend dauerhaft bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

7.1.2 Transformation von *E. coli*

Plasmide können durch die Hitzeschock-Methode in *E. coli* transformiert werden. Dazu werden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Zu 100 µL Zellen werden 1 µg Plasmid-DNA oder ein kompletter Ligationsansatz (siehe 7.2.5) gegeben. Es folgt eine Inkubation für 30 min auf Eis. Im Anschluss daran erfolgt der Hitzeschock durch eine Inkubation bei 42 °C im Heizblock für 90 sec. Danach werden die Zellen unverzüglich auf Eis gestellt. Es wird 1 mL kaltes LB-Medium zu den Zellen gegeben bevor diese für 30 min bei 37 °C inkubiert werden. In einer anschließenden Zentrifugation bei 1700 rcf für 5 min werden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in dem verbleibenden Restmedium resuspendiert und mit einem Drigalski-Spatel auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

7.1.3 Anzucht von *D. discoideum*

Die Anzucht von *D. discoideum* findet unter Dauerlicht auf Petrischale oder in Schüttelkultur bei 150 rpm statt. Zur Selektion und zur Vermeidung von Kontaminationen werden den Medien Antibiotika zugesetzt. Bei Kulturen, die auf Petrischale gehalten werden, werden die Platten jeden dritten Tag komplett abgespült und neues Medium zugegeben. Schüttelkulturen werden ebenfalls alle drei Tage mit frischem Medium verdünnt, wobei darauf zu achten ist, dass die Dichte im Bereich zwischen 1×10^5 und 5×10^6 Zellen/mL liegt.

7.1.4 Herstellung von *Klebsiella aerogenes*-Platten

Für die Präparation von *Klebsiella aerogenes*-Platten (KA-Platten) werden 100-250 mL KA-Suspension mit einem Drigalski-Spatel auf einer SM-Agar-Platte ausplattiert und diese über Nacht bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Platten, die mit einem kontinuierlichen Bakterienrasen bewachsenen sind, aus dem Brutschrank genommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

7.1.5 Transformation von *D. discoideum* durch Elektroporation

Für die Transformation von *D. discoideum* durch Elektroporation werden 2×10^7 Zellen benötigt, die aus einer axenisch wachsenden Schüttelkultur mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL abgenommen werden. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis werden die Zellen bei 1200 rpm für drei Minuten abzentrifugiert. Das Medium wird verworfen und die Zellen werden mit 10 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min werden die Zellen zweimal mit jeweils 10 mL EP-Puffer gewaschen und danach in 700 μ L desselbigen aufgenommen. Zu dem Transformationsansatz werden schließlich 10 μ g Plasmid-DNA hinzugegeben und die Suspension wird in eine vorgekühlte EP-Küvette überführt. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis findet die Elektroporation bei 1 kV und 25 μ F statt. Die Zellen werden erneut für 10 min auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit werden 8 μ L 100 mM CaCl_2 sowie 8 μ L 100 mM MgCl_2 in eine Petrischale gegeben. Die Zellsuspension wird zu den Salzen in die Petrischale pipettiert und für 30 min in dieser belassen. Anschließend wird die Petrischale mit 10 ml G0-Medium aufgefüllt. Am Folgetag wird das Medium komplett abgenommen und durch das Selektionsmedium ausgetauscht. Abhängig von der transformierten Plasmid-DNA sind bei einer erfolgreichen Transformation frühestens nach drei Tagen die ersten Einzelkolonien zu erkennen.

7.1.6 Subklonieren von *D. discoideum*

Nach der erfolgreichen Transformation von *D. discoideum* können die erhaltenen Klone vereinzelt werden. Für die Subklonierung wird das komplette Medium von der Transformationsplatte abgenommen und die Zellen werden mit 1 mL Soerensen-Phosphatpuffer abgespült. Von der Zellsuspension wird eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000) hergestellt und von jeder Verdünnung werden 100 μ L mit 100 μ L KA-Suspension auf einer SM-Agar-Platte ausplattiert. Nach drei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur sind die ersten Fraßlöcher im KA-Rasen zu erkennen. Von klar abgegrenzten Plaques werden mit einem Zahnstocher Einzelklone in eine Multiwellplatte mit jeweils 1 mL Flüssigmedium gepickt.

7.1.7 Herstellen von Sporen

Herstellen von Sporen auf Phosphatagar-Platten

Zur Herstellung von Sporen auf Phosphatagar-Platten werden 1×10^8 Zellen pro Platte benötigt, die aus einer dichtgewachsenen Schüttelkultur mit max. 5×10^6 Zellen/mL entnommen werden. Die Zellen werden bei 1200 rpm/4 °C für 3 min abzentrifugiert und danach zweimal mit je 20 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen, wobei die Zellen zwischen den Waschsritten bei 1200 rpm/4 °C für 3 min abzentrifugiert werden. Abschließend werden die Zellen in 1 mL Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen und auf einer Phosphatagar-Platte ausplattiert. Die Platte wird für

einige Minuten bei geöffnetem Deckel in der Sterilbank stehen gelassen und anschließend bei Raumtemperatur und Dauerlicht mit dem Deckel nach unten für ein oder zwei Tage inkubiert. Nach 24 Stunden hat *D. discoideum* Sporen gebildet. Diese erntet man, indem die Petrischale mit dem Deckel nach unten fest auf den Tisch geklopft wird. Die Sporen werden in Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen und in einem Cryoröhrchen bei -196 °C dauerhaft gelagert.

Produktion von Sporen auf *Klebsiella aerogenes*-Platten

Für die Gewinnung von *D. discoideum*-Sporen werden 100 µl einer *D. discoideum* Zellsuspension in die Mitte einer *Klebsiella aerogenes*-Platte (KA-Platten) pipettiert. Die Platte wird so lange offen in der Sterilbank stehen gelassen, bis die Flüssigkeit komplett eingezogen ist. Danach werden die Platten mit dem Deckel nach unten für drei bis fünf Tage bei Raumtemperatur gelagert. *D. discoideum* ernährt sich von den Bakterien und frisst sich durch den Bakterienrasen auf der Platte. Wenn die Nahrungsquelle erschöpft ist, beginnt *D. discoideum* mit der Ausbildung von Sporen. Die Sporen werden wie oben beschrieben geerntet und gelagert.

7.1.8 Langzeitwachstumsversuch

Für die Untersuchung von langzeitwachstumsabhängigen Phänotypen werden *D. discoideum* Zellen über einen längeren Zeitraum (~ ein Jahr) kontinuierlich kultiviert. Für jeden Stamm werden parallel drei Startplatten angesetzt, die in gleicher Weise behandelt werden. Die zu untersuchenden Stämme lässt man sechs Wochen auf Petrischale wachsen, wobei die Platten jeden dritten Tag komplett abgespült und mit neuem Medium aufgefüllt werden. Nach dieser axenischen Wachstumsphase wird das Medium abgenommen und die Zellen werden jeweils mit 1 mL Soerensen-Phosphatpuffer von den Petrischalen gespült. 100 µL einer Zellsuspension werden auf eine mit KA bewachsene SM-Agar-Platte gegeben. Diese Platte wird bei Raumtemperatur so lange inkubiert, bis die kompletten Bakterien aufgebraucht sind und sich die *D. discoideum* Zellen zu Sporenköpfen und Stielzellen entwickelt haben. Durch festes Aufklopfen der Petrischalen auf den Tisch werden die Sporen geerntet und danach in 1 mL Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen. Mit 100 µL Sporensuspension wird eine neue Petrischale angeimpft und nach dem Schlüpfen der *D. discoideum* Zellen werden diese wieder sechs Wochen auf Petrischale wachsen gelassen, bis sie schließlich wieder auf mit KA bewachsenen SM-Agar-Platten ausgebracht werden. Dieser Zyklus wird acht Mal wiederholt. Zur dauerhaften Lagerung der Stämme bei -196 °C werden nach 7.1.7 Sporen hergestellt.

7.1.9 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen

Mikroskopie fixierter Zellen

Für die Fixierung von Zellen werden $1-2 \times 10^5$ Zellen auf ein mit HCl-gereinigtes 20×20 mm Deckgläschen gegeben und für 30 min absitzen gelassen. Das Austrocknen der Zellen wird verhindert, indem die Deckgläschen in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer gelagert werden.

Das überschüssige Medium wird abgenommen und auf die Zellen wird für 10 min bei Raumtemperatur 200 μ L Paraformaldehyd-Fixierungslösung gegeben. Alternativ zur Paraformaldehyd-Fixierung können die Zellen mit Methanol bei -20°C für 10 min fixiert werden. Anschließend werden die Zellen mit 200 μ L Permeabilisierungspuffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wird abgenommen und durch 200 μ L Blockierlösung [2 % BSA (w/v) in 1 x PBS (pH 7,6)] ersetzt, die für 30 min auf den Zellen verbleibt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 200 μ L der primären Antikörperlösung, welche über Nacht bei 4°C oder alternativ für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt wird. Danach werden die Zellen drei Mal für 5 min mit 1 x PBS gewaschen bevor 200 μ L der sekundären Antikörperlösung auf die Präparate gegeben wird. Es folgt eine Inkubation für 30 min bei 37°C sowie drei weitere Waschstritte. Anschließend gibt man 200 μ L DAPI-Lösung in einer Verdünnung von 1:15.000 auf die Zellen und inkubiert diese für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wird das Präparat drei Mal mit 1 x PBS gewaschen. Die komplette Flüssigkeit wird mit einem Kimtechtuch abgezogen und das Deckgläschen wird mit einem Tropfen Gelvaltol mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger geklebt. Nach dem Trocknen des Gelvaltols können die Präparate direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht oder bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Die Verarbeitung der Fotos erfolgt am Computer mit Hilfe der Software GIMP.

Mikroskopie lebender Zellen

Für die Mikroskopie von lebenden Zellen gibt man $1-2 \times 10^5$ Zellen auf ein 50×50 mm Deckglas und lässt diese für 30 min absitzen. Anschließend wird das Medium mit einer Pipette abgenommen und die Zellen werden innerhalb einer Stunde mehrmals mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Danach können die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

7.1.10 Entwicklungskurs von *D. discoideum*

Bei ausreichender Nahrungsversorgung kommt *D. discoideum* als einzellige Amöbe vor. Bei Nahrungsknappheit bildet der Organismus einen vielzelligen Verband unterschiedlich differenzierter Zellen. Für das Experiment gibt man *D. discoideum* Zellen ohne Nahrungsquelle auf Filter und lässt sie darauf entwickeln. Die Differenzierung in Sporenköpfe und Stiele ist nach einem 24-stündigen Entwicklungszyklus bei AX2 wt abgeschlossen. Die Filter werden in Wasser gekocht und schließlich

auf mit Soerensen-Phosphatpuffer getränkten Whatman-Papieren in einer Plastikbox ausgelegt. Für den Entwicklungskurs werden pro Filter 5×10^7 Zellen verwendet. Diese werden aus einer Schüttelkultur entnommen, abzentrifugiert und zwei Mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in einer geeigneten Menge Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen. 500 μL dieser Zellsuspension, was ungefähr 5×10^7 Zellen entspricht, werden auf den Filter gegeben. Während des Entwicklungskurses werden zu bestimmten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 21 und 24 h) Filter mit differenzierten Zellen entnommen, um daraus RNA zu gewinnen. Die Zellen werden mit 10 mL Soerensen-Phosphatpuffer von dem Filter gespült, abzentrifugiert und die RNA wird nach Protokoll (vgl. 7.2.15) isoliert.

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Analytischer Restriktionsverdau

Analytische Restriktionsverdaue dienen dazu, Plasmide auf Richtigkeit bzw. auf das Vorhandensein eines Inserts zu testen. Für die enzymatische Reaktion werden Restriktionsendonukleasen vom Typ II eingesetzt, die innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz doppelsträngige DNA schneiden. Für die analytischen Restriktionsverdaue werden ungefähr 0,5-1 μg Plasmid-DNA aus Plasmidminipräparationen eingesetzt. Es wird ein Enzympuffer verwendet, in dem die eingesetzten Enzyme mindestens eine Aktivität von 50 % besitzen. Ein typischer Ansatz für einen analytischen Restriktionsverdau ist in der folgenden Tabelle angegeben (vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Ansatz eines analytischen Restriktionsverdaus

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Plasmid-DNA	-	10 μL
Enzym I	10 u/ μL	0,5 μL
Enzym II	10 u/ μL	0,5 μL
Enzympuffer	10 x	2 μL
RNase A	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 μL
H ₂ O		ad 20 μL

Der Ansatz wird für ein bis zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgt die Analyse der Verdaue durch eine Agarosegelelektrophorese.

Präparativer Restriktionsverdau

Präparative Restriktionsverdauere werden durchgeführt, um geschnittene Vektoren und Inserts zu gewinnen, die für die Klonierung von neuen Plasmiden benötigt werden. Um für die spätere Ligation eine ausreichende Menge an Vektor- bzw. Insert-DNA zu bekommen, werden zwischen 3-4 µg Plasmid-DNA aus einer Plasmid-Maxipräparation für den Verdau eingesetzt. Ein typischer präparativer Restriktionsverdau ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tab. 3: Ansatz eines präparativen Restriktionsverdaus

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Plasmid-DNA	1-2 µg/µL	2-4 µL
Enzym I	10 u/µL	1-2 µL
Enzym II	10 u/µL	1-2 µL
Puffer	10 x	5 µL
H ₂ O		ad 50 µL

Nach Mischung der Komponenten wird der Ansatz für 4-6 Stunden bei 37 °C inkubiert, um einen möglichst vollständigen Restriktionsverdau zu erzielen. Die geschnittenen Plasmide werden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, um die gewünschten Fragmente aus dem Gel zu eluieren (siehe 7.2.4).

7.2.2 Agarosegelelektrophorese

TBE-Agarosegele

Für die Auftrennung von DNA-Molekülen werden nicht denaturierende 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Hierfür wird die benötigte Menge an Agarose eingewogen, mit 1 x TBE versetzt und in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Aufkochen werden 5 µL Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL) zugegeben und die flüssige Agarose wird in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wird das Gel mit 1 x TBE Puffer überschichtet und die DNA-Proben, die vorher mit DNA-Auftragspuffer versetzt wurden, in die Geltaschen pipettiert. Der Gellauf findet bei 80-100 V statt. Die Dokumentation der Gele erfolgt mit Hilfe des Intas-Geldokumentationssystems statt. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäuren interkaliert. Bestrahlt man das Gel mit UV-Licht (312 nm), so fluoresziert der in die DNA eingebaute Farbstoff bei 560 nm.

Guanidinthiocyanat-Gele

Guanidinthiocyanat-Agarosegele (GTC-Gele) werden eingesetzt, um die Integrität von isolierter RNA zu analysieren. GTC wirkt sich stark denaturierend auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA aus. Es werden 1,2-1,8 g Agarose in 100 mL 1 x TBE aufgekocht und unter Rühren auf 60 °C abgekühlt. Zu der flüssigen Agarose werden 2 mL Guanidinthiocyanat-Lösung (1 M) gegeben und das Gel wird anschließend in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Elektrophorese findet bei 60 V im Kühlraum statt, da sich die Gele stark aufheizen können. Die RNA-Proben werden vor dem Gelauftrag mit RNA-Auftragspuffer für GTC-Gele versetzt und für 5 min bei 80 °C erhitzt. Anschließend werden die Proben kurz auf Eis gestellt und danach auf das Gel aufgetragen.

GTC/MOPS-Gele

RNA-Proben, die für *Northern Blots* verwendet werden sollen, werden in GTC/MOPS-Gelen aufgetrennt. Für die GTC/MOPS-Gele werden 0,8-2 g Agarose in 90 mL ddH₂O aufgekocht. Unter Rühren wird die Agarose auf 60 °C abgekühlt. Danach gibt man 10 mL 10 x MOPS-Puffer und 2 mL Guanidinthiocyanat-Lösung (1 M) hinzu und gießt die Lösung in eine horizontale Gelkammer. Nach dem Erstarren des Gels wird dieses mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet. Die RNA-Proben werden mit Auftragspuffer für GTC-Gele versetzt, 5 min bei 80 °C erhitzt und danach kurz auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Proben auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese findet bei 60 V im Kühlraum statt.

Glyoxal/DMSO-Gele

Glyoxal/DMSO-Gele finden Verwendung, wenn RNA-Proben deutlich aufgetrennt werden sollen. Im Anschluss werden die Gele für *Northern Blots* verwendet. Vor dem Gellauf wird die RNA mit Glyoxal/DMSO denaturiert (siehe Tab. 4), wobei die Denaturierung bei 50 °C für eine Stunde auf dem Heizblock erfolgt.

Tab. 4: Zusammensetzung eines typischen Glyoxal/DMSO-Gels

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
RNA	-	1-5,5 µL
Glyoxal (pH 7,0)	6 M	5 µL
DMSO	100 %	15 µL
MOPS-Puffer	10 x	1,5 µL
ddH ₂ O		27 µL

In der Zwischenzeit wird das Gel vorbereitet, indem 1,2-1,8 g Agarose in 90 mL DEPC-H₂O aufgekocht, auf 55 °C abgekühlt und mit 10 mL 10 x MOPS Puffer versetzt werden. Die Lösung wird in eine

horizontale Gelapparatur gegeben. Nach dem Erkalten des Gels wird dieses mit 1 x MOPS Puffer überschichtet. Die denaturierten RNA-Proben werden mit je 3 μL 10 x Nukleinsäure Ladepuffer versetzt und auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Für die Visualisierung der Nukleinsäuren wurden dem Denaturierungsansatz Spuren von Ethidiumbromid zugefügt, sodass die Banden unter UV-Licht photographiert werden können. Im Anschluss wird das Gel einmal für 15 min in ddH₂O und 2 x für 15 min in 10 x SSC Puffer geschwenkt und anschließend nach dem Protokoll 7.2.19 geblottet.

7.2.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung von RNA-Molekülen mit einer Größe von 20-200 nts werden denaturierende PAA Gele verwendet. Durch die Zugabe von Harnstoff zu dem Gel werden Sekundärstrukturen der RNA aufgebrochen und die RNA somit denaturiert. Die Zusammensetzung eines typischen PAA-Gels ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 5) aufgeführt. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen.

Tab. 5: Zusammensetzung eines 12 % PAA-Gels

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	40 %	18 mL
Harnstoff (7 M)	-	25,2 g
TBE	5 x	12 mL
ddH ₂ O	-	ad 60 mL
TEMED	-	30 μL
APS	20 % (w/v)	120 μL

Für die Gelelektrophorese wird 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Vor dem Gelauftrag wird die RNA mit RNA-Auftragspuffer versetzt, für 5 min auf 80 °C erhitzt und danach kurz auf Eis gestellt. Die Gelelektrophorese findet bei 200 V, 25 mA und 18 W statt. Nach dem Gellauf wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Für die Dokumentation wird das PAA-Gel mit dem Geldokumentationssystem photographiert.

7.2.4 Gelelution von DNA Fragmenten

DNA Fragmente können nach ausreichender Auftrennung in einem Agarosegel ausgeschnitten und daraus eluiert werden. Dazu bestrahlt man das Gel mit langwelligem UV-Licht geringer Intensität und schneidet die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus. Das Gelstück wird anschließend in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die eigentliche Elution der DNA-Fragmente wird mit Hilfe des NucleoSpin® Extract-II Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

7.2.5 Ligation von DNA Fragmenten

Für die Klonierung von neuen Vektoren werden DNA-Fragmente in linearisierte Plasmide ligiert. Die Ligation erfolgt meist nach einem im Vorfeld durchgeführten Restriktionsverdau, um kompatible einzelsträngige Überhänge bzw. glatte DNA Enden miteinander zu verknüpfen. Eine Religation linearisierter Vektoren wird durch die Behandlung mit Fast-AP verhindert, wobei 1 μL des Enzyms (1 u) zu dem Restriktionsansatz hinzugegeben werden. Der Ansatz wird dann für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch den Einsatz von Fast-AP werden die terminalen 5'-Phosphatgruppen entfernt, was eine Verknüpfung des Vektors durch die Ligase unmöglich macht.

Die Ligationsreaktion wird normalerweise in einem Volumen von 20 μL bei Raumtemperatur für mindestens 30 min durchgeführt. Für die Ligation werden 50-100 ng des geschnittenen Vektors und die drei- bis fünffache molare Menge des Inserts in den Ansatz gegeben. Die folgende Tabelle zeigt einen typischen Reaktionsansatz.

Tab. 6: Komponenten eines typischen Ligationsansatzes

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Plasmid-DNA	50-100 ng/ μL	1-2 μL
Insert-DNA	50-100 ng/ μL	3-5 μL
T4 DNA Ligase Puffer	10 x	2 μL
T4 DNA Ligase	5 u/ μL	1 μL
ddH ₂ O		ad 20 μL

Für die Ligation von PCR-Produkten kommt das CloneJet PCR Cloning Kit bzw. das pGEM®-T Easy Vector System I zum Einsatz, wobei die Fragmente ohne vorherigen Restriktionsverdau in die Vektoren hineinligiert werden. Die Ligationsreaktionen werden nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

7.2.6 Plasmid-Mini-Präparation

Für die Analyse von Plasmiden durch Restriktionsverdau oder *Colony*-PCR werden geringe Mengen Plasmid-DNA mittels Plasmid-Mini-Präparationen aus *E. coli* gewonnen. Dazu werden 1 mL Schüttelkulturen mit je einem *E. coli* Einzelklon angepickt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt angelehnt an die Methode der alkalischen Extraktion nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Zu einem Zellpellet werden 100 μL Lösung I gegeben und die Zellen darin durch Vortexen resuspendiert. Nachdem 200 μL Lösung II hinzugegeben und kurz invertiert wurde, findet eine fünfminütige Inkubation bei

Raumtemperatur statt. Nach Zugabe von 150 μL vorgekühlter Lösung III und kurzem Invertieren wird ein weiterer Inkubationsschritt von 10 min auf Eis durchgeführt. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm werden die Zellreste bzw. die ausgefällten Proteine gesammelt und anschließend 400 μL des Überstandes vorsichtig abgenommen. Anschließend werden die in der Lösung enthaltenen Nukleinsäuren nach 7.2.14 gefällt, getrocknet und die DNA in 20 μL UV-Wasser aufgenommen.

7.2.7 Plasmid-Maxi-Präparation

Zur Gewinnung größerer Mengen sauberer Plasmid-DNA, die für präparative Verdauungen oder Transformationen eingesetzt wird, werden Schüttelkulturen mit einem Volumen von 100 mL angesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mit dem Nucleobond® PC 100 Kit nach Anleitung des Herstellers.

7.2.8 Präparation von genomischer DNA aus *D. discoideum*

Für die Präparation von genomischer DNA aus *D. discoideum* zur *Southern Blot* Analyse werden in der Regel $1-2 \times 10^8$ Zellen benötigt. Da sich der hohe Gehalt an Kohlenhydraten und RNA in den *D. discoideum* Zellen negativ auf die Isolierung der chromosomalen DNA auswirkt, wird die DNA aus Zellkernen gewonnen. Es werden $1-2 \times 10^8$ Zellen für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und zwei Mal mit eiskaltem ddH_2O gewaschen. Das entstandene Zellpellet wird in 45 mL eiskaltem Zelllysepuffer resuspendiert, wobei unter kräftigem Schütteln tröpfchenweise 10%ige NP40 Lösung bis zu einer maximalen Endkonzentration von 1 % hinzugegeben wird. Die Lösung wird deutlich klarer nachdem die Lyse der Zellen durch die Zugabe von NP40 erfolgt ist. Unter diesen Bedingungen bleiben die Kerne intakt und werden bei 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Das Zellkernpellet wird in 5 mL SDS-Lysepuffer und 100 μL Proteinase K (25 mg/mL) vorsichtig resuspendiert und für 2 h bei 60 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Im Anschluss wird das Lysat nach 7.2.13 phenolisiert und die DNA nach 7.2.14 gefällt. Die genomische DNA wird luftgetrocknet und in 100 μL 1 x TE gelöst.

Soll genomische DNA für *Real-time* PCR Analysen Verwendung finden, erfolgt die Präparation mit Hilfe eines Kits, da die gewonnene DNA sauberer ist. Für die Isolierung der DNA werden 5×10^6 Zellen benötigt und die Isolierung erfolgt mit dem GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit nach dem Protokoll des Herstellers.

7.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) können DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert werden. Bei der PCR wird durch die Verwendung einer thermostabilen Polymerase, sequenzspezifischer Primer sowie weiterer Komponenten (siehe Tab. 7) der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Ein Standard-Programm einer PCR-Reaktion ist in Tab. 8

angegeben. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm werden an die DNA-Probe, die Fragmentlänge und die Primer angepasst. Dient die PCR zur Klonierung von DNA-Fragmenten, wird eine Polymerase mit Proofreading-Aktivität eingesetzt. In allen anderen Fällen kommt die *Taq* Polymerase zum Einsatz.

Tab. 7: Reaktionsansatz einer Standard-PCR

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
DNA-Probe	-	2 µL
<i>Taq</i> -Puffer (+MgCl ₂ , + KCl)	10 x	5 µL
dNTPs	2,5 mM	5 µL
Primer 1	5 mM	5 µL
Primer 2	5 mM	5 µL
<i>Taq</i> Polymerase	-	2 µL
UV-H ₂ O	-	ad 50 µL

Tab. 8: Programm einer Standard-PCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	94	5 min	1
2	94	30 sec	30*
3	50	40 sec	
4	72*	1 min/kb	
5	72	5 min	1

* Werte können den Bedürfnissen entsprechend angepasst werden.

7.2.10 Quantitative PCR (*Real-time* PCR)

Mit der quantitativen PCR wird die Amplifikation von DNA-Abschnitten in Echtzeit gemessen. Die Detektion der Amplifikate erfolgt über einen Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und dadurch fluoresziert. Die Fluoreszenz kann vom verwendeten Thermocycler detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zu der Amplifikationsrate der PCR-Produkte an.

Mit Hilfe der quantitativen PCR kann u.a. das Expressionslevel von Genen bestimmt werden, indem die Amplifikationsrate des Zielgens mit der Amplifikationsrate eines konstitutiv exprimierten Gens (*housekeeping*-Gen) verglichen wird (Wong und Medrano, 2005). Auch die Kopienzahl von Genen im Genom kann mit Hilfe dieser Methode analysiert werden.

Den PCR-Ansätzen wird der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® zugesetzt. Als Template dient entweder RNA oder genomische DNA. Die quantitative PCR wird mit dem Mastercycler® ep realplex der Firma Eppendorf durchgeführt.

Wird DNA als Template eingesetzt, wird der nachfolgende Standard-*Real-time* PCR Ansatz verwendet (vgl. Tab. 9). Quantitative PCR Signale, die auf genomischer DNA gemessen werden, werden mit Hilfe des Gens *corA* standardisiert. Die Auswertung der Signale und die Bestimmung der relativen Kopienzahlen wird mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach Pfaffl (Pfaffl, 2001) durchgeführt.

Tab. 9: Reaktionsansatz einer Standard-*Real-time* PCR

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
DNA-Template	-	1 μL
PCR-Puffer (+ MgCl_2 , + KCl)	10 x	2 μL
dNTPs	2,5 mM	2 μL
Primer 1	5 mM	0,4 μL
Primer 2	5 mM	0,4 μL
<i>Taq</i> Polymerase	-	0,4 μL
EvaGreen®	50 x	0,4 μL
H ₂ O		ad 20 μL

Wenn RNA als Template verwendet wird, wird für die cDNA-Synthese und die anschließende quantitative PCR das One-Step Kit der Firma Biorline verwendet. Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm werden nach den Angaben des Herstellers des Kits durchgeführt. Als Template wird 400 ng totale RNA in die cDNA Synthese bzw. den quantitativen PCR-Ansatz eingesetzt. Die gemessenen Signale für die zu untersuchenden Gene werden mit *cinD-1* standardisiert. Anschließend wird mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die relative Expressionsrate ermittelt.

7.2.11 Reverse Transkriptase PCR

Die Umwandlung eines RNA Templates in cDNA für eine anschließende PCR erfolgt durch die Verwendung der ReverseAid Reverse Transkriptase. Für die Herstellung von cDNA ist es unerlässlich, dass die eingesetzte RNA frei von Verunreinigungen durch genomische DNA ist. Dafür wird die gewonnene RNA mit DNaseI für 1 h bei 37 °C nach folgendem Ansatz verdaut (vgl. Tab. 10).

Tab. 10: Reaktionsansatz eines DNaseI-Verdaus

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
RNA	1 µg/µL	10 µL
DNaseI (RNase free)	1 u/µL	1 µL
DNaseI Puffer	10 x	2 µL
DEPC-H ₂ O		ad 20 µL

Nach der Inkubation wird der Ansatz mit DEPC-H₂O auf 200 µL aufgefüllt, nach Protokoll 7.2.13 phenolisiert und die RNA nach Protokoll 7.2.14 gefällt. Nach der Trocknung der RNA wird diese in 10 µL DEPC-H₂O aufgenommen.

Für die Reverse Transkriptase-PCR werden 2 µL RNA, 2 µL Oligo(dT)₂₆-Primer und 8,6 µL DEPC-H₂O in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gemischt und die Probe für 5 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend werden dem Ansatz 5 µL 5 x Reaktionspuffer, 0,5 µL RiboLock und 2 µL dNTPs (je 10 mM) hinzugefügt. Das Annealing der Primer findet bei 42 °C für 2 min statt. Danach wird 1 µL ReverseAid Reverse Transkriptase (200 u/µL) hinzugegeben und der Ansatz für weitere 60 min bei 42 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 70 °C und danach können 2 µL des Reaktionsansatzes für eine PCR-Reaktion eingesetzt werden.

7.2.12 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen können photometrisch bestimmt werden, indem die Absorption bei 260 nm gemessen wird. Zur Quantifizierung werden die Proben angemessen verdünnt und in einem Photometer gegen eine Referenzküvette mit H₂O gemessen.

Die Konzentration der Nukleinsäuren kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration}_{\text{Nukleinsäuren}} \text{ µg/mL} = \text{gemessene Absorption} \times \text{Multiplikator} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Multiplikatoren:

$$\text{dsRNA/dsRNA} = 50 \text{ µg/mL}$$

$$\text{ssRNA} = 40 \text{ µg/mL}$$

$$\text{ssDNA} = 33 \text{ µg/mL}$$

7.2.13 Phenol/Chloroform-Extraktion

Verunreinigungen von Proteinen in Nukleinsäurelösungen werden durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Dabei wird die Lösung im Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform versetzt, kurz gevortext und für 10 min bei 20.000 rcf/4 °C zentrifugiert. Anschließend kann die wässrige, Nukleinsäure-haltige Phase vorsichtig abgenommen werden. Um Reste der organischen Lösungsmittel zu entfernen, wird die Nukleinsäure anschließend einer Fällung unterzogen (vgl. 7.2.14).

7.2.14 Fällung von Nukleinsäuren

Isopropanol-Fällung

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen werden diese mit einem Probenvolumen Isopropanol und mit 1/10 Probenvolumen 3 M Natriumacetat pH 4,7 versetzt. Nach kurzem Mischen der Lösung wird diese für 30 min bei 20.000 rcf/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 min wird der Überstand abermals verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend werden die Nukleinsäuren in der gewünschten Menge UV-H₂O aufgenommen.

Ethanol-Fällung

Für die Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol wird die wässrige Nukleinsäurelösung mit dem zweieinhalbfachen Probenvolumen Ethanol und 1/10 an Natriumacetat pH 4,7 versetzt. Nach dem Mischen der Lösung werden die Nukleinsäuren bei 20.000 rcf/4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und die Nukleinsäuren für 15 min bei 20.000 rcf/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Nukleinsäuren werden schließlich in UV-H₂O aufgenommen.

7.2.15 RNA-Präparation aus *D. discoideum*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *D. discoideum* wird ein leicht verändertes Protokoll der Trizol-Methode verwendet (Chomczynski und Sacchi, 1987). Zur Isolierung werden 2×10^7 Zellen mit einer Zelldichte von $2-4 \times 10^6$ Zellen/mL abgenommen und für 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen in 1 mL Trizol-Reagenz resuspendiert. Durch mehrmaliges Pipettieren und Vortexen werden die Zellen lysiert und in der anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rcf werden die unlöslichen Zellbestandteile pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die Lösung wird gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie im Anschluss bei

12.000 rcf für 15 min zentrifugiert wird. Die Nukleinsäure-haltige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Vol. Isopropanol versetzt und die RNA wird über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wird die RNA bei 20.000 rcf/4 °C für 30 min abzentrifugiert und der Überstand komplett verworfen. Das RNA-Pellet wird mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen. Die getrocknete RNA wird in 50-100 µL DEPC-H₂O aufgenommen.

7.2.16 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription werden Vektoren als Vorlage verwendet, die im Vorfeld durch einen Restriktionsverdau linearisiert wurden. Zur Herstellung von *in vitro* Transkripten wird der in Tab. 11 angegebene Ansatz für 2 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Für den Abbau des DNA-Templates wird 1 µL DNaseI hinzugegeben. Der Ansatz wird für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss daran mit DEPC-H₂O auf 200 µL aufgefüllt und nach 7.2.13 einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen. Die *in vitro* Transkripte werden nach Protokoll 7.2.14 gefällt und in 10-20 µL DEPC-H₂O aufgenommen.

Tab. 11: Standardansatz für eine *in vitro* Transkription

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Linearisierter Vektor	1 µg/µL	1 µL
Transkriptionspuffer	5 x	10 µL
Ribonukleotid-Mix (ATP/CTP/GTP/UTP)	jeweils 10 mM	10 µL
RiboLock	40 u/µL	1,25 µL
RNA Polymerase (T7; SP6)		2 µL
DEPC-H ₂ O		ad 50 µL

Die Transkription von radioaktiv markierter RNA findet für 1,5 h bei 37 °C im Heizblock statt, nachdem der folgende Ansatz hergestellt wurde.

Tab. 12: Standardansatz für die Herstellung von radioaktiv markierten Transkripten

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Linearisierter Vektor	0,1-0,5 µg/µL	1 µL
Transkriptionspuffer	5 x	4 µL
DTT	0,1 M	2 µL
Ribonukleotid-Mix (ATP/CTP/GTP)	je 3,3 mM	3 µL
Unmarkiertes UTP	200 µM	1 µL
RiboLock	40 u/µL	1 µL
DEPC-H ₂ O		ad 20 µL
RNA Polymerase (T7; SP6)		1 µL
α- ³² P-UTP		2 µL

Zu dem *in vitro* Transkriptionsansatz wird 1 µL DNaseI zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wird der Ansatz mit DEPC-H₂O auf 200 µL aufgefüllt und nach 7.2.13 einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen. Die radioaktiv markierten *In-Vitro* Transkripte werden für die Hybridisierung von *Northern Blots* eingesetzt.

7.2.17 End-Labeling von DNA

Zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Oligos wird mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase das radioaktive γ -Phosphat vom ATP auf das 5'-OH Ende der DNA übertragen. Nach Zugabe aller Komponenten, wie sie in Tab. 13 aufgeführt sind, wird der Reaktionsansatz für 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss werden die Nukleotide durch eine Reinigung über eine 1 mL Sephadex® G50 Säule entfernt. Dazu wird der Ansatz mit 120 µL UV-H₂O aufgefüllt und komplett auf die Säule gegeben. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm kann die markierte DNA gefällt oder für die Hybridisierung eines Blots eingesetzt werden.

Tab. 13: Standardansatz einer End-Labeling Reaktion

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Linearisierter Vektor	1 µg/µL	1 µL
Transkriptionspuffer	5 x	10 µL
Ribonukleotid-Mix (ATP/CTP/GTP/UTP)	jeweils 10 mM	10 µL
RiboLock	40 u/µL	1,25 µL
RNA Polymerase (T7; SP6)		2 µL

7.2.18 Herstellung von OLB-Sonden

Für die Markierung von längeren DNA-Molekülen wird das Klenow-Fragment verwendet. Bei der Herstellung von OLB-Sonden sorgt das Enzym dafür, dass radioaktiv markierte Nukleotide bei der Verlängerung der Oligohexamere in die DNA eingebaut werden (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die benötigte DNA-Vorlage wird mittels PCR (vgl. 7.2.9) amplifiziert und nach einer Agarose-gelelektrophorese aus dem Gel eluiert (vgl. 7.2.4). Zu 5 µL PCR-Fragment werden 10 µL OLB-Mix und 27 µL H₂O gegeben, der Ansatz wird gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach erfolgt eine dreiminütige Inkubation bei 55 °C, wobei sich die im OLB-Mix enthaltenen Oligohexamere an die denaturierten DNA-Stränge anlagern. Nach Zugabe von 1 µL BSA (20 mg/µL), 5 µL ³²P α-ATP und 2 µL Klenow-Fragment (2 u/µL) wird der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide wird der Ansatz mit 70 µL H₂O aufgefüllt und komplett auf eine 1 mL Sephadex®G50 Säule gegeben. Im Anschluss wird die Säule für 5 min bei 1000 rpm

zentrifugiert. Die Sonde kann nach fünfminütiger Denaturierung bei 95 °C zur Hybridisierung von *Southern* bzw. *Northern Blots* verwendet werden.

7.2.19 Northern Blot

Agarose Northern Blot

Für *Agarose Northern Blots* werden RNA-Proben unter denaturierenden Bedingungen in GTC-MOPS Gelen (siehe 7.2.2) oder Glyoxal/DMSO Gelen (siehe 7.2.2) elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Kapillartransfer wird die aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran übertragen, welche im Anschluss nacheinander mit radioaktiv markierten Sonden (siehe 7.2.17 und 7.2.18) hybridisiert wird.

Der Kapillartransfer erfolgt mit 10 x SSC Puffer, der in eine Glasschale gegeben wird, die als Pufferreservoir dient. In den Puffer werden drei Whatman Papiere eingetaucht, die als Docht für das 10 x SSC fungieren. Auf die Whatman Papiere wird das Gel gelegt, gefolgt von der Nylonmembran und zwei weiteren Whatman Papieren. Anschließend wird auf das oberste Whatman Papier ein Stapel Papiertücher aufgelegt und der Aufbau mit einem Buch oder einer Glasflasche beschwert. Der Kapillartransfer erfolgt über Nacht. Anschließend wird die übertragene RNA mit Hilfe von UV-Licht 312 nm, 0,560 J/cm² auf der Membran fixiert. Die Membran kann trocken und dunkel mehrere Tage gelagert oder gleich zur Hybridisierung von Sonden verwendet werden.

Polyacrylamid Northern Blot

Polyacrylamid *Northern Blots* werden zum Nachweis von kleinen RNAs (21-24 nt) eingesetzt, wobei die Methode in Anlehnung an Pall et al. (Pall et al., 2007) durchgeführt wird.

Für die Auftrennung der RNA werden denaturierende 11 % PAA/MOPS Gele verwendet, deren Zusammensetzung in folgender Tabelle aufgeführt ist (Tab. 14).

Tab. 14: Zusammensetzung eines denaturierenden 11 % Polyacrylamidgels

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	40 %	8,25 mL
MOPS (pH 7)	1 M	0,6 mL
Urea (7 M)	-	12,6 g
ddH ₂ O	-	ad 30 mL
TEMED	-	15 µL
APS	20 % (w/v)	60 µL

Für die Gelelektrophorese werden je Probe 10 µg totale RNA mit RNA-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 80 °C inkubiert. Danach kommen die Proben sofort auf Eis und werden im Anschluss auf das PAA-Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten RNA wird der miRNA Marker von NEB aufgetragen, der im Vorfeld genau wie die Proben behandelt wird. Der Gellauf erfolgt bei 150 V, max. 25 mA für ca. 2 h, bis das Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hat.

Im Anschluss an den Gellauf wird die aufgetrennte RNA auf die Nylonmembran Hybond-NX durch Elektroblot übertragen. Für den Transfer der Nukleinsäuren wird DEPC-H₂O als Puffer verwendet und der Blot findet im Elektroblotsystem der Firma Biometra statt. Auf die Kathode werden zwei mit DEPC-H₂O getränkte Whatman Papiere, die angefeuchtete Nylonmembran und das PAA-Gel gelegt. Anschließend werden zwei weitere mit DEPC-H₂O getränkte Whatman Papiere auf dem PAA-Gel platziert und die Blotapparatur geschlossen. Der Elektroblot erfolgt für 10 min mit 20 V bei 4 °C. Nach dem Blot wird die Membran auf ein mit *Crosslinking Solution* getränktes Whatman Papier gelegt und in Folie eingeschweißt. Es folgt eine zweistündige Inkubation bei 55 °C im Hybridisierungsöfen. Nach der Inkubation wird die Membran mit DEPC-H₂O abgespült, um die *Crosslinking Solution* zu entfernen. Danach erfolgt die Hybridisierung des Blots nach Protokoll 7.2.20.

Das geblottete PAA-Gel wird mit Ethidiumbromid nachgefärbt und unter UV-Licht mit dem Geldokumentationssystem fotografiert.

7.2.20 Hybridisierung von *Northern Blots*

Für die Hybridisierung von *Northern Blots* werden normalerweise radioaktiv endmarkierte DNA-Oligos (siehe 7.2.17) oder radioaktiv markierte *in vitro* Transkripte (siehe 7.2.16) verwendet. Im Fall von DNA-Oligos wird die Nylonmembran für 1 h bei 42 °C mit *Church*-Puffer prähybridisiert und im Anschluss wird die markierte Sonde hinzugeben und über Nacht bei 42 °C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wird die Sonde abgenommen und die Membran jeweils zweimal mit Waschlösung I für 15 min, mit Waschlösung II für 10 min und mit Waschlösung III für 5 min gewaschen.

Werden für die Detektion *in vitro* Transkripte eingesetzt, gilt das eben beschriebene Protokoll für DNA-Oligos mit dem Unterschied, dass Prähybridisierung und Hybridisierung bei 60 °C erfolgen.

Nach dem Waschen der Membran wird diese kurz auf einem Labortuch getrocknet und danach in eine Folie eingeschweißt. Zur Detektion der Signale wird ein *Imager-Screen* aufgelegt. Die Exposition richtet sich nach der Stärke der Signale und kann sich über wenigen Stunden bis mehrere Tage erstrecken.

7.2.21 Southern Blot

Southern Blots werden in Anlehnung an E. M. Southern (Southern, 1975) durchgeführt. Sie kommen zur Anwendung, um den *Knockout* von Genen zu verifizieren, die Kopienzahl von Retrotransposons zu bestimmen oder ihre DNA-Intermediate nachzuweisen.

Für *Southern Blots* wird genomische DNA von *D. discoideum* mit Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 7.2.1), die DNA gefällt (siehe 7.2.14) und mittels Agarosegelelektrophorese der Größe entsprechend aufgetrennt (siehe 7.2.2). Zur Bestimmung von retrotransposablen DNA-Intermediaten wird Gesamt-DNA oder mit GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit aufgereinigte DNA aus *D. discoideum* unverdaut auf das Gel geladen. Das Gel wird unter UV-Licht photographiert und für 30 min in Denaturierungslösung schüttelnd inkubiert. Die Denaturierungslösung wird dekantiert und das Gel für weitere 30 min in Neutralisierungslösung geschwenkt.

Der Kapillartransfer der DNA erfolgt wie bereits für *Northern Blots* beschrieben mit 20 x SSC als Laufpuffer über Nacht. Das *Crosslinking* der DNA an die Membran wird durch Bestrahlung der Membran mit UV-Licht 312 nm, 0,560 J/cm² erreicht. Im Anschluss kann die Membran dunkel und trocken für mehrere Tage gelagert oder direkt mit einer Sonde hybridisiert werden.

7.2.22 Hybridisierung von Southern Blots

Zur Hybridisierung von *Southern Blots* werden meist OLB-Sonden (siehe 7.2.18) eingesetzt. Die Prähybridisierung der *Southern Blots* findet bei 42 °C mit Denhardt-Hybridisierungspuffer im Hybridisierungsöfen für eine Stunde statt. Bevor die OLB-Sonde zu der Membran gegeben wird, wird diese 5 min bei 95 °C denaturiert und die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42 °C rotierend. Am nächsten Tag wird die Sonde abgenommen und die Membran für 1 h mit Waschlösung I und anschließend für 1 h mit Waschlösung IV bei 42 °C gewaschen. Nach kurzem Trocken der Membran wird diese in Folie eingeschweißt und ein *Imager-Screen* wird aufgelegt. Die Exposition erfolgt abhängig von der Signalstärke für einen bis mehrere Tag(e).

7.2.23 Primer Extension

Für die Primer Extension werden 4 µg totale RNA und ein radioaktiv markierter DNA-Oligo (siehe 7.2.17) in 1 x Transkriptionspuffer für 1 min bei 95 °C denaturiert. Das Anlagern des Primers erfolgt bei 57 °C für 4 min. Zu diesem Ansatz werden 5 µL dNTP-Mix (jeweils 5 mM) und 1 µL Reverse Transkriptase (200 u/µL) in 1 x Transkriptionspuffer gegeben und dieser Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird beendet, indem der Ansatz für 10 min auf 70 °C erhitzt wird. Im Anschluss wird 1 µL RNaseA zugegeben und der Reaktionsansatz wird für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden durch Zugabe von Ethanol (siehe 7.2.14) gefällt und in ddH₂O

aufgenommen. Zur Auftrennung der DNA-Stücke werden 8-15%ige denaturierende Polyacrylamid-gele verwendet.

7.2.24 β -Eliminierung

Um zu untersuchen, ob eine Methylierung am 3'-Ende von RNA vorhanden ist, wird die β -Eliminierung durchgeführt. Für jede zu untersuchende Probe werden zwei gleiche Ansätze vorbereitet. Die Reaktionsansätze werden wie in der nachfolgenden Tabelle beschrieben (Tab. 15), zusammengegeben und für 10 min bei 22 °C inkubiert.

Tab. 15: Ansatz für die β -Eliminierung

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
RNA	30 μ g	7,5 μ L
Borat-Puffer pH 8,6	2 x	10 μ L
Natriumiodat	0,2 M	2,5 μ L

Nach der Inkubation werden zu jedem Reaktionsansatz 2 μ L Glycerin gegeben und sie werden weitere 10 min bei 22 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Reaktionsansätze in der Vakuumzentrifuge für 45 min bei 30 °C getrocknet. Danach wird einer der Reaktionsansätze mit 50 μ L 1 x Borat Puffer (pH 9,6) und der andere mit 50 μ L ddH₂O versetzt. Beide Ansätze werden für 90 min bei 45 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 150 μ L 100 % EtOH und 35 μ g Glycogen folgt eine Inkubation bei -20 °C für 1 h. Die Proben werden bei 20.000 rcf/4 °C für 30 min gefällt, mit 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocken in 15 μ L ddH₂O aufgenommen.

Mit den Proben werden Polyacrylamid *Northern Blots* (siehe 7.2.19) durchgeführt. Zur Detektion bestimmter RNA-Spezies werden diese mit radioaktiv markierten DNA-Oligos hybridisiert (siehe 7.2.20).

7.2.25 Trennung vom Cytoplasma und Zellkern

Zur Untersuchung der Lokalisation von Nukleinsäuren in der Zelle werden die Zellkerne vom Cytoplasma getrennt. Für die Trennung werden 5×10^6 Zellen bei 390 rcf/4 °C für 5 min abzentrifugiert. Das Medium wird komplett dekantiert und die verbleibenden Zellen werden in 900 μ L Zellysepuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 μ L 10 % NP40 Lösung wird der Ansatz für 10 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss werden die Zellkerne bei 3200 rcf/4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der komplette Überstand wird abgenommen, nach 7.2.13 phenolisiert und die enthaltenen Nukleinsäuren werden nach 7.2.14 gefällt. Die Zellkerne werden mit 1 mL Trizol-Reagenz versetzt und die enthaltene RNA nach 7.2.15 isoliert.

7.2.26 Run-On Transkription

Run-On Transkription wird zur Untersuchung der *de novo* Synthese von Transkripten im Zellkern eingesetzt. Im Vorfeld müssen Zellkerne isoliert werden, die für die eigentliche Transkriptionsreaktion eingesetzt werden. Für die Isolierung werden $1-2 \times 10^8$ Zellen bei 390 rcf/4 °C für 5 min abzentrifugiert und einmal mit 20 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen, wobei die Zellen im Anschluss wieder bei 390 rcf/4 °C abzentrifugiert werden. Die Zellen werden dann in 16 mL Zellysepuffer (*Run-On*) resuspendiert und der Suspension werden 2 mL Percoll und 2 mL 10 % NP40 zugegeben. Im Anschluss erfolgt eine 15-minütige Inkubation auf dem Drehrad bei 4 °C im Kühlraum. Die Zellkerne werden bei 3200 rcf/4 °C für 15 min abzentrifugiert und danach vorsichtig in 100 µL Lagerpuffer (*Run-On*) resuspendiert. Nach dem Aliquotieren in 10 µL Fraktionen werden die Zellkerne in einem Eis/100 % Ethanol Bad schockgefroren und im Anschluss bei -20 °C gelagert. Für eine *Run-On* Transkription werden 20 µl der Zellkernsuspension ($\sim 1-2 \times 10^7$ Zellkerne) verwendet. Die folgende Tabelle spezifiziert den Standardansatz für eine *Run-On* Transkription, der 20 min bei Rt inkubiert wird.

Tab. 16: Standardansatz für eine *Run-On* Transkription

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Zellkerne		20 µL
Reaktionspuffer (<i>Run-On</i>)	5 x	20 µL
Ribonukleotid-Mix (ATP/CTP/GTP)	5 mM jeweils	5 µL
RiboLock	40 u/µL	1 µL
α - ³² P-UTP	0,37 MBq/µL	10 µL
ddH ₂ O		ad 100 µL

Im Anschluss wird der Reaktionsansatz nach Protokoll Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 7.2.13) phenolisiert und die nicht eingebauten Nukleotide über eine 1 mL Sephadex® G50 Säule entfernt.

In vitro Transkripte, die komplementär zu den zu untersuchenden *Run-On* Transkripten sind, werden nach dem Protokoll *in vitro* Transkription (siehe 7.2.16) hergestellt und photometrisch vermessen. Gleiche Mengen an *in vitro* Transkripten werden mit Hilfe einer *Slot-Blot*-Kammer unter Vakuum auf eine Nylonmembran gezogen. Im Anschluss erfolgt das *Crosslinking* der Nukleinsäuren an die Membran unter UV-Licht bei 312 nm mit $0,560 \text{ J/cm}^2$. Die Membran wird für eine Stunde bei 50 °C in Prähybridisierungspuffer EB prähybridisiert. Danach werden die *Run-On* Transkripte, die vorher für 5 min bei 95 °C denaturiert wurden, zugegeben. Die Hybridisierung findet für 48 h bei 50 °C statt. Im Anschluss wird die Membran jeweils einmal für eine Stunde bei 50 °C mit Waschlösung I und mit Waschlösung IV gewaschen. Nach kurzem Trocknen der Membran wird diese in Folie eingeschweißt

und ein *Imager-Screen* wird aufgelegt. Die Exposition erfolgt abhängig von der Signalstärke für einen bis mehrere Tag(e).

7.2.27 RNA-Isolierung für *Deep Sequencing* Analysen

Für die *Deep Sequencing* Analyse werden kleine RNA Moleküle (< 200 nt) aus axenisch wachsenden *D. discoideum* Stämmen isoliert. 1×10^7 Zellen werden für 3 min bei 390 rcf/4 °C abzentrifugiert und das überständige Medium wird verworfen. Die Zellen werden einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und danach wieder für 3 min bei 390 rcf/4 °C abzentrifugiert. Für die Isolierung der kleinen RNAs wird das NucleoSpin® miRNA Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

7.3 Proteinbiochemische Methoden

7.3.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen werden diese durch Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladen, denaturiert und in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Trenngel und das Sammelgel (vgl. Tab. 17) werden nacheinander zwischen zwei Glasplatten, die mit Platzhaltern versehen sind, gegossen. In das Sammelgel wird ein Kamm zur Ausformung von Geltaschen eingesetzt, der nach dem vollständigen Auspolymerisieren aus dem Sammelgel gezogen wird. Das Gel wird in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 x Proteinpuffer überschichtet. Nach 15-minütiger Inkubation der Proteinproben bei 95 °C werden diese und zusätzlich ein Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wird anschließend bei 200 V durchgeführt, bis das Bromphenolblau des 5 x Probenpuffers *complete* aus dem Gel herausgelaufen ist.

Tab. 17: Komponenten für zwei Proteingele

Komponenten	12 % Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	4,4 mL	450 µL
Trenngelpuffer	2,67 mL	-
Sammelgelpuffer	-	1 mL
250 mM EDTA pH 7,4	43,2 µL	16 µL
H ₂ O	3,4 mL	2,5 mL
TEMED	6 µL	4 µL
APS 20 % (w/v)	120 µL	60 µL

7.3.2 Coomassiefärbung von Proteingelen

Nach der SDS-PAGE (siehe 7.3.1) können die aufgetrennten Proteine mit Hilfe von Coomassie unspezifisch angefärbt werden. Für die Färbung wird das Proteingel für 10 min in heißem H₂O geschwenkt, um das SDS aus dem Gel herauszuwaschen. Im Anschluss wird das Gel über Nacht in kolloidaler Coomassiefärbelösung schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wird die Färbelösung abgenommen und gegen Wasser ausgetauscht, wobei das Gel schwenkend inkubiert wird. Sichtbare Proteinbanden, die eine semiquantitative Aussage über Proteinmengen zulassen, werden mit dem Geldokumentationssystem fotografiert oder mit einem Flachbettscanner gescannt.

7.3.3 Western Blot

Für den Nachweis von spezifischen Proteinen müssen die aufgetrennten Proteine aus dem Proteingel (siehe 7.3.1) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Proteine können im *Semi-Dry* Blot Verfahren oder im *Wet-Blot* Verfahren auf die Membran übertragen werden. Für den *Semi-Dry* Blot werden zwei Lagen Whatman Papier mit *Semi-Dry* Blot Puffer getränkt und auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Darauf wird die Nitrocellulosemembran, das Proteingel und weitere mit *Semi-Dry* Blot Puffer getränkte Whatman Papiere gelegt. Während des Aufbaus werden eventuell vorhandene Lufteinschlüsse zwischen den Lagen entfernt. Nach dem Aufbau wird der Deckel der Apparatur aufgelegt und der Transfer der Proteine für 1 h bei 200 mA durchgeführt.

Für den Transfer von Proteinen mit einer Größe über 100 kDa wird der *Wet-Blot* durchgeführt, da dieser einen besseren und vollständigeren Übertrag der Proteine sicherstellt. Der *Wet-Blot* wird mit dem Mini-Protean® Tetra System durchgeführt, wobei pro Gel eine Blot-Kassette Verwendung findet. Auf die klare Seite der Kassette wird ein Schwamm, zwei mit 1 x *Tankblot* Puffer angefeuchtete Whatman Papiere, die Nitrocellulosemembran und das Proteingel gelegt. Abschließend werden weitere zwei feuchte Whatman Papiere und ein Schwamm aufgelegt. Die Kassette wird nach dem Verriegeln in die Kammer eingesetzt. Für die Kühlung während des Transfers wird in die mit 1 x *Tankblot* Puffer gefüllte Kammer ein Kühlakku eingelegt. Nach dem Schließen der Blotkammer erfolgt der *Western Blot* für 1 h bei 100 V und 350 mA.

7.3.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der immunologische Nachweis von spezifischen Proteinen erfolgt durch die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern und der abschließenden Färbereaktion mit Hilfe der alkalischen Phosphatase, die an die sekundären Antikörper gekoppelt ist. Nach dem *Western Blot* (siehe 7.3.3) wird die Nitrocellulosemembran für 30 min in 5 % Milchpulver (w/v) gelöst in 1 x NCP schwenkend inkubiert, um die freien Bindungsstellen auf der Membran unspezifisch mit Proteinen abzusättigen.

Anschließend wird die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert, der 1:5 in 1 x NCP verdünnt wird. Am folgenden Tag wird die Membran drei Mal mit 1 x NCP für jeweils 5 min gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine dreistündige Inkubation mit dem 1:5000 in 1 x NCP verdünnten sekundären Antikörper (AP-gekoppelter Ziege-anti-Maus/Ziege-anti-Kaninchen). Nach der Inkubation wird der Antikörper abgenommen und alle nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit 1 x NCP entfernt. Die Färbereaktion wird im Dunkeln durch die Inkubation der Membran in 20 mL AP-Puffer und 70 µL BCIP-Lösung gestartet. Wenn deutliche Banden auf der Membran zu erkennen sind, wird die BCIP-Lösung abgenommen und die Membran zweimal mit H₂O abgespült. Die gefärbte Membran wird mit Hilfe des Geldokumentationssystems photographiert oder mit einem Flachbettscanner gescannt. Die entstandenen Banden können mit Hilfe des Programmes ImageJ quantifiziert werden.

7.3.5 Präzipitation von Proteinen

Proteine können durch den Einsatz von Trichloressigsäure aus Lösungen präzipitiert und durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Proben werden hierzu mit 20%iger Trichloressigsäure versetzt (Endkonzentration 10 %) und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben bei 20.000 rcf/4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Pellet dreimal mit 1 mL Aceton gewaschen. Das Pellet wird in 30-100 µL 5 x Probenpuffer *complete* aufgenommen und für 15 min bei 95 °C gekocht.

7.3.6 Protein *Pull-Down* mit GFP Nanotrap

Chemisches *Crosslinking* mit DTBP

Der Protein *Pull-Down* mit chemischem *Crosslinking* wurde angelehnt an das Protokoll von M. Dubin (Dubin et al., 2011) durchgeführt. Der Protein *Pull-Down* wird mit je 5×10^8 *D. discoideum* Zellen pro Stamm durchgeführt. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet, einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und in 10 mL 1 x PBS mit 5 mM DTBP aufgenommen. Das *Crosslinking* erfolgt für 30 min bei Rt auf dem Drehrad. Nach dem *Crosslinking* wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und in 10 mL Lyse-Puffer (GFP Nanotrap) resuspendiert. Zur Unterstützung der Lyse werden die Zellen auf Eis dreimal für 10 sek bei Amplitude 50 und Cycle 0,5 sonifiziert. Im Anschluss werden die unlöslichen Bestandteile dreimal bei 10.000 rcf/4 °C für 15 min abzentrifugiert, wobei der lösliche Überstand jeweils in neue Reaktionsgefäße überführt wird. In der Zwischenzeit werden 250-300 µL Sephadex™ G-50, die gelöst in 1 x TE Puffer vorliegen, einmal mit 1 mL Lyse-Puffer (GFP Nanotrap) äquilibriert. Nach dem Äquilibrieren der Beads wird der lösliche Überstand für 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad mit diesen inkubiert. Für den eigentlichen *Pull-Down* werden 30 µl GBP-NHS-Sepharose (Rothbauer et al., 2008) mit 1 mL Lyse-Puffer (GFP Nanotrap) äquilibriert und

danach wird der Überstand für 90 min bei 4 °C auf dem Drehrad mit diesen inkubiert. Das Waschen der Beads erfolgt fünfmal mit Wasch-Puffer (GFP Nanotrap), wobei die Beads zwischen den Waschschritten jeweils für 2 min bei 2000 rpm/4 °C abzentrifugiert werden. Die Beads werden in 100 µL 5 x Probenpuffer *complete* aufgenommen und für 15 min bei 95 °C erhitzt. Die gewonnenen Proben können für massenspektrometrische Untersuchungen und *Western Blots* (siehe 7.3.3) verwendet werden.

UV-Crosslinking

Für den Protein *Pull-Down* werden je 2×10^8 *D. discoideum* Zellen pro Stamm verwendet. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet, einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und in 10 mL 1 x PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wird auf eine Petrischale gegeben, sodass sich die Zellen für 15 min absetzen können. Danach erfolgt das UV-Crosslinking mit $0,250 \text{ J/cm}^2$ bei 254 nm. Der 1 x PBS Puffer wird vorsichtig abgenommen, die Zellen in 4 mL RIPA Puffer (mod.) resuspendiert und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Unterstützung der Lyse werden die Zellen auf Eis drei- bis fünfmal für 10 sek bei Amplitude 50 und *Cycle* 0,5 sonifiziert. Im Anschluss werden die unlöslichen Bestandteile dreimal bei 10.000 rcf/4 °C für 15 min abzentrifugiert, wobei der lösliche Überstand jeweils in neue Reaktionsgefäße überführt wird. In der Zwischenzeit werden 250-300 µL Sephadex™ G-50, die gelöst in 1 x TE Puffer vorliegen, dreimal mit 1 mL Dilutionspuffer äquilibriert, wobei die Beads jeweils bei 390 rcf abzentrifugiert werden. Nach dem Äquilibrieren der Beads wird der lösliche Überstand für 15 min bei 4 °C auf dem Drehrad mit diesen inkubiert. Für den eigentlichen *Pull-Down* werden 30 µL GBP-NHS-Sepharose (Rothbauer et al., 2008) mit 1 mL Dilutionspuffer äquilibriert und danach wird der Überstand für 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Das Waschen der Beads erfolgt zweimal mit *Stringency* RIPA Puffer A und Dreimal mit *Stringency* RIPA Puffer B, wobei die Beads zwischen den Waschschritten jeweils für 2 min bei 2000 rpm/4 °C abzentrifugiert werden. Die GBP-NHS-Sepharose wird mit 1 mL RIPA Äquilibrierungs-Puffer inkubiert und danach werden die Beads in 200 µL 5 x Probenpuffer *complete* aufgenommen. Zur Elution der isolierten Proteine werden die Beads für 15 min bei 95 °C erhitzt und danach kurz auf Eis gestellt. Die gewonnenen Proben können für massenspektrometrische Untersuchungen und *Western Blots* (siehe 7.3.3) verwendet werden.

7.3.7 Expression von rekombinanten Proteinen

Für die Expression von rekombinanten Proteinen werden Plasmide in geeignete *E. coli* Expressionstämme, z.B. BL21 Rosetta2, mittels Hitzeschock (siehe 7.1.2) transformiert. Mit einem Einzelklon werden 20 mL LB-Medium, dem das benötigte Antibiotikum zugesetzt wurde, angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden jeweils 200 mL

frisches Medium mit 2 mL der über Nacht angewachsenen Vorkultur versetzt. Die Kultur wird bei 30 °C bzw. 37 °C schüttelnd im Brutschrank inkubiert, wobei die Zelldichte im Photometer bei 600 nm gemessen wird, bis ein OD-Wert von 0,6 erreicht ist. Die Expression der rekombinanten Proteine kann durch die Zugabe von ITPG (0,1-1,5 mM Endkonzentration) induziert werden. Abhängig von der Expressionsrate wird die Kultur zwischen ein bis 16 Stunden bei 16-30 °C schüttelnd inkubiert. Danach wird die Kultur in mehreren 50 mL Reaktionsgefäßen für jeweils 10 min/5000 rcf herunterzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets werden zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

7.3.8 Löslichkeitstest

Zur Überprüfung der Löslichkeit rekombinant exprimierter Proteine werden nach Protokoll „Expression von rekombinanten Proteinen“ (siehe 7.3.7) hergestellte Bakterienpellets in 5 mL Lysepuffer (NiNTA) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wird die Lösung drei- bis fünfmal eingefroren und aufgetaut, wobei sie zwischendurch gevortext wird. Zur Unterstützung der Zellyse wird die Lösung auf Eis 5-8 x für jeweils 10 sek sonifiziert (Zyklus: 0,5 s; Amplitude: 50), wobei zwischen den einzelnen Schritten jeweils eine Pause von 30 sek erfolgt. Nach der Zellyse wird die Lösung für 15 min bei 10.000 rcf/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird komplett abgenommen. 100 µL des Überstandes werden mit 100 µL 5 x Probenpuffer *complete* versetzt. Das Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen wird mit 5 mL Lysepuffer (NiNTA) resuspendiert und 100 µL des resuspendierten Pellets werden mit 100 µL 5 x Probenpuffer *complete* versetzt. Die gewonnenen Proben werden mittels SDS-PAGE (siehe 7.3.1) aufgetrennt, durch einen *Western Blot* (siehe 7.3.3) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und die rekombinanten Proteine mit Antikörpern detektiert (siehe 7.3.4).

7.3.9 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen über His₆-Tag

Die Anreicherung rekombinanter, His₆-markierter Proteine erfolgt über Ni-Sepharose™. Die markierten Proteine binden mit hoher Affinität über die Histidine an den Nickel der Sepharose, was eine selektive Anreicherung des gewünschten Proteins aus dem Zelllysate erlaubt.

Bakterienpellets von 200 mL Expressionskultur werden in 20 mL Lysepuffer (NiNTA) resuspendiert und fünf Mal bei -20 °C eingefroren und auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wird die Lösung jeweils für 10 sek gevortext. Um die Zellyse noch zu verbessern, wird die Probe 5-7 x für jeweils 10 sek auf Eis sonifiziert (Zyklus: 0,5 sek; Amplitude: 50), wobei zwischen den einzelnen Schritten eine Pause von 30 sek erfolgt. Nichtlösliche Reste werden in einer 10-minütigen Zentrifugation bei 10.000 rcf/4 °C entfernt. In der Zwischenzeit werden für die Anreicherung der rekombinanten Proteine 500 µL NiNTA-Sepharose in eine Plastiksäule gegeben und mit 5 mL Lysepuffer (NiNTA)

äquibriert. Der lösliche Überstand der lysierten Zellen wird in die Plastiksäule gegeben. Für spätere Analysezwecke werden hier, wie auch bei den folgenden Schritten, 30 μ L der Proben abgenommen und in 30 μ L 5 x Probenpuffer *complete* aufgekocht. Der Durchfluss wird noch einmal auf die Säule gegeben. Es folgen vier Waschschrirte mit 5 mL Waschpuffer (NiNTA). Nach den Waschungen werden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 500 μ L Elutionspuffer (NiNTA) eluiert. Dieser Schritt wird noch zweimal wiederholt.

8 Ergebnisse

8.1 Herstellung von AgnA KO, AgnB KO und AgnA/B KO *D. discoideum* Stämmen

Argonauten Proteine bilden essentielle Faktoren in einer Vielzahl von RNA vermittelten Genregulationsmechanismen (vgl. 4.5). Im Genom von *D. discoideum* sind fünf Argonauten Homologe kodiert, deren Expression in vegetativen Zellen und während der Entwicklung stark variiert. Alle fünf Proteine werden insgesamt gering exprimiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von AgnA und AgnB untersucht. Die Charakterisierung der Funktion von AgnC, AgnD und AgnE wird von unserem Kooperationspartner F. Söderbom an der *Swedish University of Agricultural Sciences* in Uppsala, Schweden untersucht. AgnA und AgnB unterscheiden sich in der Expression: AgnA wird in vegetativen Zellen am stärksten transkribiert, wobei seine Expression während der Entwicklung abnimmt. Hingegen wird AgnB in vegetativen Zellen kaum transkribiert (vgl. Abb. 10). Seine Expression nimmt während der Entwicklung stark zu und ist verglichen mit der der anderen Argonauten Proteinen hier am stärksten (Rot et al., 2009) (vgl. <http://dictyexpress.biolab.si/>). Um die Funktion und die Wirkweise der beiden Argonauten Homologe AgnA und AgnB aus *D. discoideum* zu analysieren, wurden Stämme erzeugt, in denen entweder das *agnA* Gen, das *agnB* Gen oder beide Gene gleichzeitig unterbrochen sind. Durch homologe Rekombination wird eine Blastocidin-Resistenz-Kassette (BSr-Kassette) in die kodierende Region des entsprechenden Gens eingebracht. Verfügt die BSr-Kassette über zwei *loxP-sites*, die von der Cre Rekombinase erkannt werden, kann diese Kassette spezifisch wieder entfernt werden, was die multiple Genzerstörung mit nur einem Selektionsmarker ermöglicht (Faix et al., 2004). Am Insertionsort bleiben eine *loxP-site* und ein Polyterminator zurück, dessen Sequenz gewährleistet, dass die Translation an dieser Position abgebrochen wird und kein funktionsfähiges Protein entsteht.

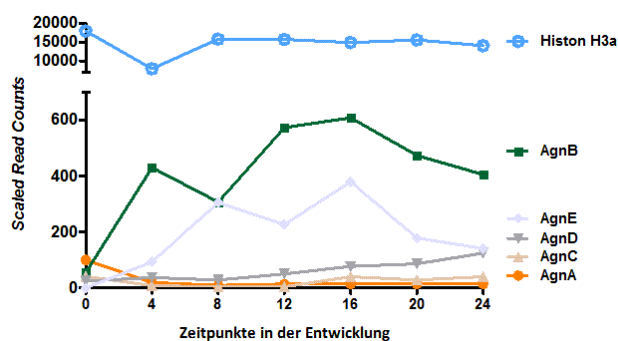


Abb. 10: Expressionsprofil der Argonauten Protein in *D. discoideum*

Quantifizierung der mRNA der Argonauten Proteine während der Entwicklung von *D. discoideum* wt mittels *High Throughput* Sequenzierung. Zum Vergleich wurden die Werte für das Histon H3a aufgetragen. Daten übernommen von DictyExpress (<http://dictyexpress.biolab.si/>). *Scaled Read Counts* = *High Throughput Reads* normalisiert auf *Reads* pro eine Million und pro 1[°]kb Gensequenz.

8.1.1 Generierung eines AgnA KO-Stammes

Zur Unterbrechung des *agnA* Gens wurde zunächst eine Klonierungsstrategie angelehnt an das Protokoll von Faix und Mitarbeitern verfolgt, wobei zwei kurze Bereiche des Gens in den Vektor pLPBLP kloniert wurden. Das KO-Konstrukt wurde so konzipiert, dass die BSR-Kassette bei erfolgreicher Integration *upstream* vom kodierenden Bereich der PAZ- und der PIWI-Domäne inseriert und die Expression eines vollständigen AgnA Proteins unterbindet. Der linearisierte Vektor wurde in den *D. discoideum* AX2 wt transformiert und anschließend wurden blasticidinresistente Klone selektiert. Bei der Analyse der resistenten Klone mittels PCR zeigte sich, dass das *Knockout*-Konstrukt in dem Genom enthalten, aber nicht in den ORF des *agnA* Gens integriert war (Daten nicht gezeigt). Die Transformation mit diesem Konstrukt wurde dreimal wiederholt, wobei in keiner Transformation die gewünschte Rekombination erzielt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weitere Versuche alternative Konstrukte mit *loxP-sites* zu transformieren schlugen ebenfalls fehl.

Daraufhin wurde ein neuer *Knockout*-Vektor (pGEM[®]-T-Easy-agnA fragment for KO w/o *loxP* +BSr rev) konzipiert, der einen größeren Bereich des *agnA* Gens sowie einen Teil des Promotors enthält (vgl. Tab. 18), um so die homologe Rekombination zu verbessern. Darüber hinaus wurde eine BSR-Kassette ohne *loxP-sites* verwendet (vgl. 6.15 Plasmid AgnA KO Konstrukt ohne *loxP-sites*). Auch in anderen Experimenten wurden häufiger eine verminderte Anzahl bzw. keine positive *Knockout*-Klone erhalten, wenn eine BSR-Kassette mit *loxP-sites* verwendet wurde. Bei der Verwendung der BSR-Kassette ohne *loxP-sites* traten diese Probleme nicht auf (B. Popova, persönliche Mitteilung). Ohne die *loxP-sites* kann die Resistenzkassette nicht entfernt werden und somit können keine weiteren Gene in dem KO-Stamm ausgeknockt werden.

Tab. 18: Position der BSR-Kassette innerhalb des *agnA* Gens

Gen	Position des linken Arms ¹	Position des rechten Arms ¹	Deletion
<i>agnA</i>	-222, +1337	+1338, +2309	Keine Deletion

¹Start- und Endnukleotid des Arms relativ zum ATG Start-Codon des Gens.

Der klonierte Vektor pGEM[®]-T-Easy-agnA fragment for KO w/o *loxP* +BSr rev wurde durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* linearisiert und in den Wildtypstamm AX2 transformiert. Blasticidinresistente Klone wurden daraufhin mittels PCR auf eine korrekte Integration der BSR-Kassette in das *agnA* Gen überprüft (vgl. Abb. 11).

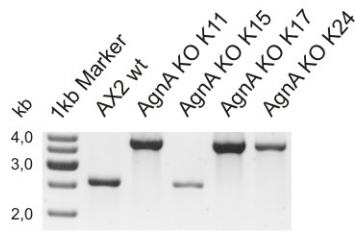


Abb. 11: Nachweis der Integration eines Bsr-Konstrukts in das *agnA* Gen

Genomische DNA wurde aus blasticidinresistenten *D. discoideum* Einzelklonen und dem Wildtypstamm AX2 wt isoliert. In einer PCR wurden die Primer BB059/BB060 (#2319/#2320) verwendet, um eine erfolgreiche Insertion des Bsr-Konstrukts in das *agnA* Gen nachzuweisen. Erwartete Fragmentgrößen: AX2 wt = 2645 bp; AgnA KO = 3899 bp. Die Klone K11, K17 und K25 entsprechen dem erwarteten KO-Stamm.

Die Bindestellen der Primer wurden so gewählt, dass der eine Primer in dem KO-Konstrukt und der andere in der Genomregion des *agnA* Gens bindet, womit die Integration des Konstruktes und dessen Lokalisation zugleich ermittelt werden können. Die Lokalisation der Bsr-Kassette im *agnA* Gen wurde in positiven Klonen durch *Southern Blot* Analysen verifiziert. So konnte bestätigt werden, dass das *agnA* Gen in den Klonen AgnA KO K11 und K17 durch die Bsr-Kassette unterbrochen wurde und dass in diesen Klonen jeweils nur eine Kopie des Konstrukts in das Genom integrierte (vgl. Abb. 12A + B). Um zu gewährleisten, dass die Integration der Bsr-Kassette die Expression des AgnA Proteins verhindert, wurde die *agnA* mRNA Menge in den AgnA KO K11 und K17 mittels *Northern Blot* bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptmenge im Vergleich zum AX2 wt deutlich reduziert ist (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 18). In *D. discoideum* KO-Stämmen wird häufig beobachtet, dass die mRNA unterbrochener Gene destabilisiert wird. Die beiden KO-Stämme AgnA KO K11 und K17 wurden im Weiteren für die molekularbiologische Charakterisierung der AgnA Funktion verwendet.

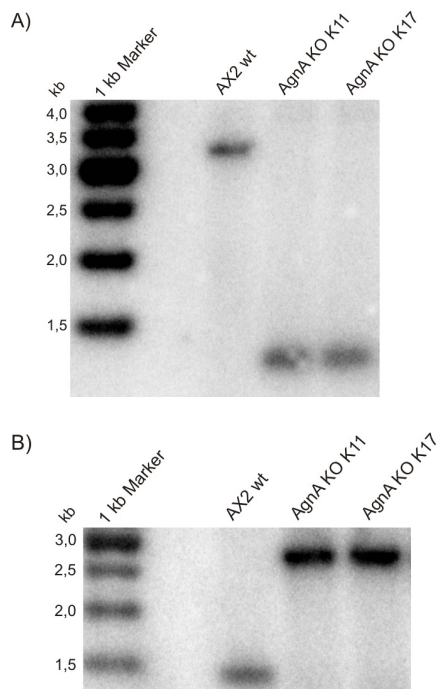


Abb. 12: *Southern Blot* zum Nachweis der Genunterbrechung von *agnA*

Genomische DNA wurde aus AX2 wt und verschiedenen Einzelklonen von AgnA KO-Stämmen isoliert. Nach dem Verdau wurde die DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und im Anschluss durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit einer OLB-Sonde hybridisiert, um die Unterbrechung des Gens nachweisen zu können.

A) Genomische DNA verdaut mit *Xba*I. Hybridisierung des Blots mit OLB-Sonde BB038/BB044 (#2234/#2304). Erwartete Fragmentgrößen: AX2 wt = 3263 bp; AgnA KO = 1298 bp.

B) Genomische DNA verdaut mit *Eco*RI/*Sty*I. Hybridisierung des Blots mit OLB-Sonde BB038/BB044 (#2234/#2304). Erwartete Fragmentgrößen: AX2 wt = 1487 bp; AgnA KO = 2830 bp.

Die Klone K11 und K17 entsprechen dem erwarteten KO-Stamm.

8.1.2 Herstellung des AgnB KO-Stammes

Für die Unterbrechung des *agnB* Gens wurde das *Knockout*-Konstrukt pGEMnAgnB_KO (Dubin, unveröffentlicht) verwendet. Zur Generierung des Konstruktes wurde zunächst das komplette *agnB* Gen amplifiziert und in den Vektor pGEM®-T-Easy kloniert. Um den Vektor pGEMnAgnB_KO zu erhalten, wurde in die ORF Sequenz des *agnB* Gens die Bsr-Kassette mit *loxP-sites* aus dem Vektor pLPBLP eingefügt (vgl. 6.15). Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Bam*HI linearisiert und in den AX2 wt Stamm transformiert. Blasticidinresistente Einzelklone wurde mittels PCR auf die Integration der Bsr-Kassette in das *agnB* Gen untersucht (vgl. Tab. 19). Die Klone AgnB KO K25 und K40 wiesen die erwartete Fragmentgröße auf (vgl. Abb. 13). Die korrekte Lokalisation des Konstrukts wurde mittels *Southern Blot* Analysen verifiziert. Die Analysen zeigten, dass in den Klonen AgnB KO K25 und K40 das *agnB* Gen durch die Bsr-Kassette unterbrochen wurde und das KO-Konstrukt nicht mehrfach in das Genom integrierte (vgl. Abb. 14).

Tab. 19: Position der Bsr-Kassette innerhalb des *agnB* Gens

Gen	Position des linken Arms ¹	Position des rechten Arms ¹	Deletion
<i>agnB</i>	+1, +1577	+1578, +2963	Keine Deletion

¹Start- und Endnukleotid des Arms relativ zum ATG Start-Codon des Gens.

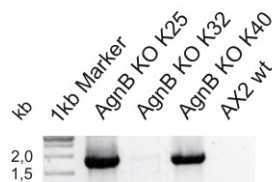


Abb. 13: Nachweis der Integration eines Bsr-Konstruktes in das Gen *agnB*

Genomische DNA wurde aus verschiedenen putativen AgnB KO-Stämmen und dem AX2 wt Stamm isoliert und in eine PCR mit den Primern BB048/Bsr G1-5A (#2308/#385) eingesetzt, um die erfolgreiche Insertion der Bsr-Kassette nachzuweisen. Erwartete PCR-Produkte: AX2 wt = kein Produkt; AgnB KO = 1935 bp. Die Klone K25 und K40 entsprechen dem erwarteten KO-Stamm.

Der anschließende Nachweis der *agnB* mRNA Menge mittels *Northern Blot* zeigte, dass der Gehalt an *agnB* Transkripten in den Klonen AgnB KO K25 und K40 im Vergleich zum AX2 wt deutlich reduziert war (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 18). Die beiden analysierten Einzelklone wurde für die im Folgenden beschriebenen molekularbiologische Experimente verwendet und bildeten zudem den Ausgangspunkt für die Generierung von AgnA/B KO-Stämmen.

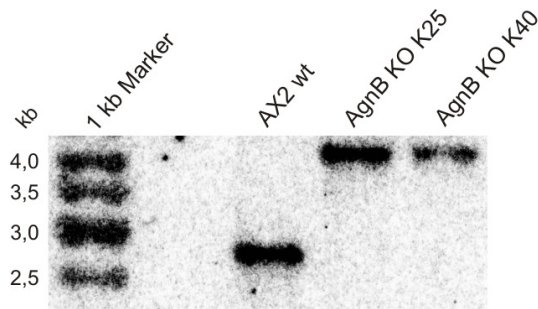


Abb. 14: Nachweis der Genunterbrechung von *agnB* durch *Southern Blot*

Genomische DNA wurde aus dem AX2 wt und zwei B_{Sr}-resistenten Einzelklonen, die mit dem Plasmid pGEM_AgnB_KO transformiert wurden, isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Clal* verdaut. Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Detektion der Unterbrechung des *agnB* Gens durch das B_{Sr}-Konstrukt wurde die Membran mit der OLB-Sonde BB042/BB047 (#2302/#2307) hybridisiert. Erwartete Fragmente: AX2 wt = 2833 bp; AgnB KO = 4318 bp.

8.1.3 Generierung des AgnA/B KO-Stammes

Um Effekte des Verlustes beider Argonauten Protein zu untersuchen wurden Doppel-KO Stämme generiert, in denen die beiden Argonauten Proteine ausgeknockt wurden. Für die Herstellung von AgnA/B KO-Stämmen wurde das *agnA* Gen im AgnB KO K25 Stamm zerstört. Der Stamm AgnB KO K25 wurde verwendet und der Selektionsmarker mit Hilfe der Cre Rekombinase entfernt.

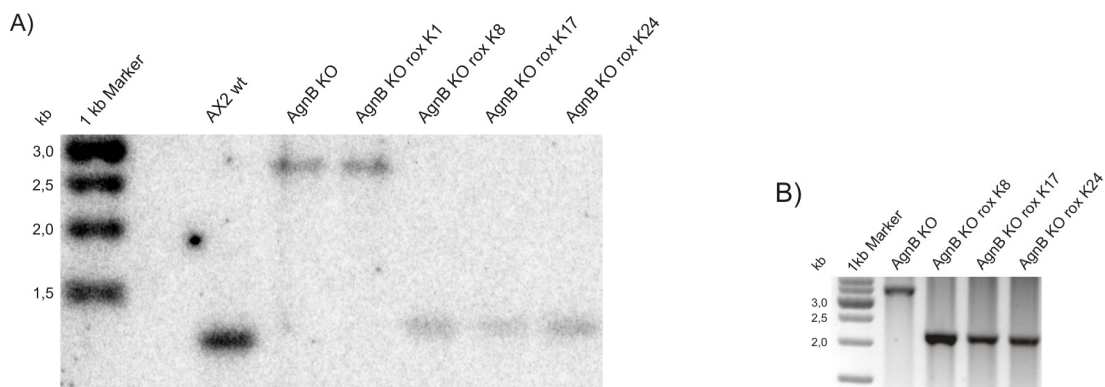


Abb. 15: Nachweis der erfolgreichen Entfernung der B_{Sr}-Kassette aus dem AgnB KO-Stamm

Genomische DNA wurde aus AX2 wt, AgnB KO und verschiedenen Einzelklonen nach der Transformation mit dem Plasmid pDEX RH NLS-Cre isoliert.

- A) Nach einem Restriktionsverdau mit *HincII* wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit der OLB-Sonde BB042/BB047 (#2302/#2307) hybridisiert, um die Entfernung der B_{Sr}-Kassette nachweisen zu können. Erwartete Fragmentgrößen: AX2 wt = 1235 bp; AgnB KO = 2688 bp; AgnB KO rox = 1288 bp.
- B) Für einen zusätzlichen Nachweis der erfolgreichen Entfernung der B_{Sr}-Kassette wurden eine PCR mit den Primern BB046/BB047 (#2306/#2307) durchgeführt. Erwartete Fragmentgrößen: AgnB KO = 3606 bp; AgnB KO rox = 2198 bp. Die Klone K8, K17 und K24 entsprechen dem erwarteten KO-Stamm.

Hierfür wurde das Plasmid pDEX RH NLS-Cre in den Stamm transformiert und die Cre Rekombinase für 4 Tage transient exprimiert. Die erfolgreiche Entfernung der B_{Sr}-Kassette wurde daraufhin mittels PCR und *Southern Blots* in den Klonen K8 rox, K17 rox und K24 rox verifiziert (vgl. Abb. 15A + B). Die

Klone wiesen zudem eine Genitacin-Sensitivität auf, sodass eine stabile Integration des Plasmids pDEX RH NLS-Cre ausgeschlossen werden kann. Anschließend wurde der Einzelklon AgnB KO rox K24 mit dem linearisierten Plasmid pGEM-T-Easy-agnA fragment for KO w/o loxP +BSr rev (vgl. 6.15) transformiert, um das *agnA* Gen zu unterbrechen. PCR- und *Southern Blot* Analysen zeigten, dass in den Klonen AgnA/B KO K5 und K6 das *agnA* Gen durch die BSr-Kassette unterbrochen wurde (vgl. Abb. 16 + Abb. 17).

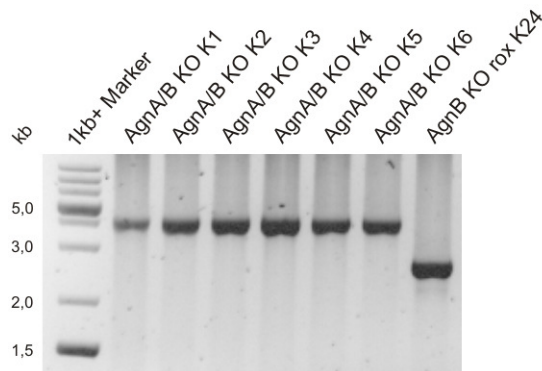


Abb. 16: Nachweis der AgnA/B KOs durch PCR

Genomische DNA wurde aus verschiedenen putativen AgnA/B KOs und dem AgnB KO rox K24 isoliert. Zum Nachweis des Genunterbrechung wurde eine PCR mit den Primern BB059/BB060 (#2319/#2320) durchgeführt. Erwartete Fragmentgrößen: AgnB KO rox = 2645 bp; AgnA/B KO = 3988 bp.

Darüber hinaus wurde die Transkriptmenge der *agnA* und *agnB* mRNAs in den einzelnen *Knockout*-Stämmen und in den AgnA/B KOs mittels *Real-time* RT-PCR quantifiziert. Die Transkriptmenge des *agnA* bzw. *agnB* Gens ist in den jeweiligen KO-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp um ca. 70 % reduziert. In den AgnA/B KOs sind sowohl die *agnA* als auch die *agnB* Transkripte im Vergleich zum AX2 wt um mindestens 60 % reduziert (vgl. Abb. 18). Durch die eingefügten Stopp-Codons kann maximal ein Teilprotein von ~412 AS (~50 kDa) im Fall von AgnA, bzw. von ~303 AS (~37 kDa) im Fall von AgnB translatiert werden.

Die bestätigten Doppel-KOs wurden in weiterführenden molekularbiologischen Experimenten verwendet, um die Funktion der Argonauten Proteine in der Regulation der Genexpression und der Transposonkontrolle zu untersuchen (vgl. 8.4).

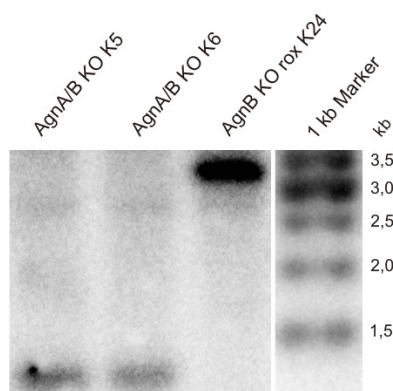


Abb. 17: Nachweis von AgnA/B KO-Stämmen mittels *Southern Blot*

Genomische DNA wurde aus verschiedenen putativen AgnA/B KOs und AgnB KO rox K24 isoliert. Nach einem Restriktionsverdau mit *Xba*I wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und im Anschluss durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion der Unterbrechung des *agnA* Gens erfolgt durch die Hybridisierung der Membran mit der OLB-Sonde BB038/BB044 (#2234/#2304). Erwartete Fragmentgrößen: AgnB rox = 3263 bp; AgnA/B KO = 1298 bp. Die Klone K11, K17 und K25 entsprechen dem erwarteten KO-Stamm.

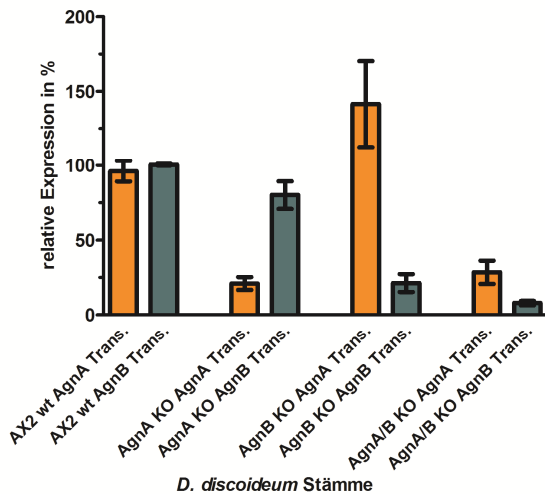


Abb. 18: Bestimmung der Menge an Transkripten von *agnA* und *agnB* in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Relative Quantifizierung der Menge an *agnA* und *agnB* Transkripten in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Real-time* RT-PCR. Nachweis der *agnA* Transkripte erfolgte mit dem Primern BB180/BB181 (#2955/#2956). Die *agnB* Transkripte wurden mit Primern BB182/BB183 (#2957/#2958) gemessen. Die Signale wurden gegen *cinD-1* mit den Primer #1923 *cinD-1*_qPCR for/#1924 *cinD-1*_qPCR rev (#1923/#1924) referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 4. Fehlerbalken: *mean with SD*. Trans. = Transkripte.

8.1.4 Rescue der AgnA KO- bzw. AgnB KO-Stämme

Um eventuelle Phänotypen der *Knockout*-Stämme zu prüfen sollte die Genfunktion von *agnA* in den Einzelklonen AgnA KO K11 und K17 durch die Transformation mit dem Vektor pDneo2a-HA-AgnA oder pDneo2a-AgnA-HA wiederhergestellt werden. Bei den Vektoren handelt es sich um integrierende Vektoren, die für die Fusionsproteine HA-AgnA bzw. AgnA-HA kodieren. Die Expression der rekombinanten Proteine in unterschiedlichen Einzelklonen wurde mit Hilfe von *Western Blots* und dem anschließenden immunologischen Nachweis des HA-Tags kontrolliert. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression des AgnA-Fusionsproteins mit dem N-terminalen HA-Tag im Vergleich zur Variante mit der C-terminalen HA-Fusion um den Faktor fünf höher ist (Daten nicht gezeigt). Jeweils zwei Einzelklone der putativen *Rescue* Stämme AgnA KO HA-AgnA bzw. AgnA KO AgnA-HA wurden in weiteren molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzt.

Zum *Rescue* der AgnB KO-Stämme wurden diese mit dem Vektor pDneo2a-HA-AgnB, pDneo2a-AgnB-HA oder pDneo2a-AgnB-GFP transformiert. Die Vektoren kodieren für die Fusionsproteine HA-AgnB, AgnB-HA und AgnB-GFP, deren Expression ebenfalls mit Hilfe von *Western Blots* und dem immunologischen Nachweis des jeweiligen Tags bestätigt wurde. Die Transformation mit dem Vektor pDneo2a-AgnB-HA brachte keine resistenten Klone, sodass die weiteren Versuche nur mit den Stämmen AgnB KO HA-AgnB und AgnB KO AgnB-GFP durchgeführt wurden. Auch hier zeigte sich, dass das AgnB Fusionsprotein mit dem N-terminalen Tag deutlich höher exprimiert wird als das AgnB Fusionsprotein mit dem C-terminalen GFP-Tag (Daten nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob die durch den Verlust des endogenen AgnB Proteins entstandenen Phänotypen durch die Fusionsproteine aufgehoben werden können, wurden jeweils zwei Einzelklone von AgnB KO HA-AgnB und AgnB KO AgnB-GFP für detaillierte Untersuchungen verwendet.

8.2 Lokalisation von AgnA und AgnB in *D. discoideum*

Die Lokalisation von ektopisch exprimiertem AgnA in der Zelle wurde im Rahmen der Examensarbeit von Doreen Meier untersucht. Das mit unterschiedlichen *Tags* markierte Protein ist im Cytoplasma lokalisiert und der Zellkern ist weitgehend ausgespart (Meier, 2010). Zur Untersuchung der Lokalisierung von AgnB in *D. discoideum* wurde der ORF von AgnB in die Vektoren-Serie pDneo2a kloniert (Dubin et al., 2010). *D. discoideum* Stämme, die AgnB mit C-terminalem HA- sowie GFP-*Tag* im Wildtyp Hintergrund exprimieren, wurden von M. Dubin generiert (Dubin, 2010). Für die N-terminal markierten AgnB-Fusionsproteine wurden die entsprechenden Plasmide kloniert (vgl. 6.15) und in *D. discoideum* AX2 wt transformiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde mit Hilfe von *Western Blots* und dem immunologischen Nachweis des GFP- bzw. des HA-*Tags* kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

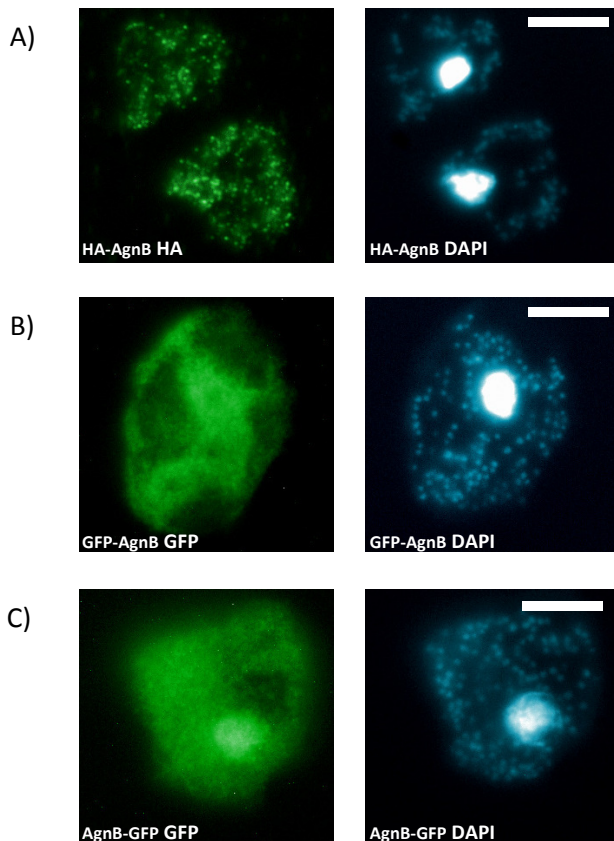


Abb. 19: Untersuchung der subzellulären Lokalisation der AgnB Fusionsproteine

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation der Fusionsproteine in der *D. discoideum* Zelle. Alle Zellen wurden mit DAPI gefärbt, um die Lokalisation des Kerns in der Zelle zu identifizieren. Die Prozessierung der Bilder erfolgte mit der Software GIMP 2. Größenstandard = 5 μm .

- A) Für die Detektion des Fusionsproteins HA-AgnB wurde ein spezifischer 1. Antikörper verwendet, der das *Tag* erkennt.
- B) Lokalisation von GFP-AgnB in der Zelle von *D. discoideum*.
- C) Lokalisation von AgnB-GFP in der Zelle von *D. discoideum*.

Zur Bestimmung der Lokalisation von markierten Argonauten Proteinen wurden fixierte Zellen mit *Tag*-spezifischen Antikörpern angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die HA-markierten AgnB Fusionsproteine lokalisieren heterogen im Cytoplasma und im Nukleus, wobei granuläre Strukturen im Cytoplasma eine stärkere Färbung zeigen (vgl. Abb. 19A, AgnB-HA nicht gezeigt). Die GFP-markierten AgnB Fusionsproteine wiesen eine abweichende Lokalisation in

Abhängigkeit der N- oder C-terminalen GFP-Fusion auf. GFP-AgnB lokalisiert - wie auch die HA-markierten Fusionsproteine - im Cytoplasma und im Zellkern, wobei eine stärkere Färbung des Cytoplasmas beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 19B). Im Gegensatz dazu akkumuliert das Fusionsprotein mit dem C-terminalen GFP-Tag fast ausschließlich im Nukleus der Zelle, während im Cytoplasma nur geringe Mengen AgnB-GFP vorlagen (vgl. Abb. 19C).

Die Zelllinien, die die GFP markierten AgnB Fusionsproteine exprimieren und abweichende, stärker im Kern akkumulierte Proteinlokalisierung zeigen, wurden für die Identifikation putativer Proteininteraktionspartner mittels Protein *Pull-Down* und Massenspektrometrie verwendet (vgl. 8.6).

Zur Validierung der Lokalisation von AgnB-GFP und um Stämme von unabhängigen Transformation zu erhalten, wurde in der Zwischenzeit AX2 wt erneut mit dem Plasmid pDneo2a-AgnB-GFP transformiert. Die transformierten Zellen exprimierten ebenfalls das Fusionsprotein. Bei der Analyse mittels *Western Blot* ergaben sich Unterschiede in Bezug auf die Größe der Fusionsproteine: Das AgnB-GFP Protein, welches vom dem ersten Stamm exprimiert wird, ist um etwa 10 kDa kleiner als das Fusionsprotein aus Zellen der zweiten Transformation. Dieses besitzt die erwartete Größe von ~132 kDa (Daten nicht gezeigt). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des neuen Stammes zeigte das Fusionsprotein, wie auch GFP-AgnB (vgl. Abb. 19B), eine homogene Verteilung im Cytoplasma und im Nukleus (Daten nicht gezeigt). Die Anreicherung im Nukleus, die der erste AgnB-GFP Überexpressionsstamm zeigte, konnte in der zuletzt transformierten Zelllinie nicht mehr nachgewiesen werden (vgl. Abb. 19C). Die unterschiedliche Expression konnte trotz erneuter Überprüfung der Plamide nicht geklärt werden und ist vermutlich auf eine ungewöhnliche Integration zurückzuführen.

8.3 Expression von rekombinanten Argonauten Proteinen

Bei *in vitro* Experimenten mit rekombinant exprimiertem humanen Ago2 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein mRNAs endonukleolytisch spalten kann (Meister et al., 2004). Zur Charakterisierung der Funktionen der Argonauten Proteine AgnA und AgnB aus *D. discoideum* sollten vergleichbare Experimente mit rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteinen durchgeführt werden. Die rekombinanten Proteine sollten über eine His₆-Markierung mittels immobilisierter Metallchelate Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Für die Expression der Proteine wurden die entsprechenden ORFs in den Expressionsvektor pET-15b und pET28a kloniert (vgl. 6.15) und in *E. coli* BL21 Rosetta2 Zellen transformiert. Jedoch konnte nur eine schwache Expression der Argonauten Proteine erzielt werden, was mit Hilfe von *Western Blots* und dem immunologischen Nachweis von His₆ nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der sehr geringen Expression der His₆-markierten Proteine konnte nicht genug Material für weiterführende Versuche isoliert werden.

8.3.1 Expression von verkürzten Argonauten Proteinen

Um Immunpräzipitation von Argonauten Proteinen durchzuführen oder Depletionen für *in vitro* Experimente zu ermöglichen, sollten *single chain variable fragment* (scFv) Antikörpern spezifisch für AgnA und AgnB hergestellt werden. Aufgrund der niedrigen Expression der rekombinanten Volllänge-Proteine in *E. coli* war es jedoch nicht möglich, ausreichende Mengen des Antigens für die Gewinnung (*Panning*) der scFvs herzustellen. Deshalb sollten verkürzte (*truncated*) Varianten der Proteine exprimiert werden, in denen die N-terminalen Bereiche der Proteine entfernt wurden, ohne dabei die wichtigen PAZ- und PIWI-Domänen zu deletieren.

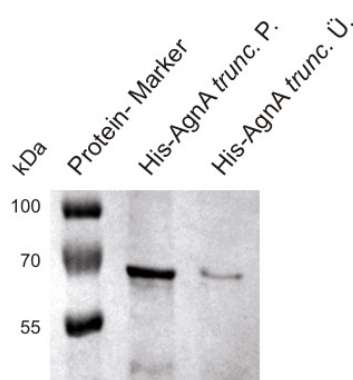


Abb. 20: Expression von rekombinantem Protein His₆-AgnA truncated

Die Induktion von His₆-AgnA *truncated* erfolgte mit 1,5 mM IPTG für 3 h bei 22 °C. Anschließend wurden die löslichen (Ü.: Überstand) und unlöslichen (P.: Pellet) Bestandteile der lysierten Zellen in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe des immunologischen Nachweises des His₆-Tags. Das theoretische MW des rekombinanten Proteins beträgt 69,3 kDa. *trunc.* = *truncated*.

Für das *Antibody Phage Display*, das Stephan Giesler in der Arbeitsgruppe Biotechnologie von Prof. Dr. Stefan Dübel an der Technischen Universität in Braunschweig durchgeführt hat, sollten sowohl His₆-markierte als auch Maltose Bindeprotein (MBP)-fusionierte Argonauten Proteine in *E. coli* exprimiert werden (Giesler, 2011). Zu diesem Zweck wurden die verkürzten ORFs von AgnA und AgnB

jeweils in den Vektor pET28a und pMAL-c2X kloniert (vgl. 6.15) und anschließend in *E. coli* BL21 Rosetta2 Zellen exprimiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch *Western Blots* und dem immunologischen Nachweis mit His₆- bzw. MBP-spezifischen Antikörpern detektiert (vgl. Abb. 20 + Abb. 21).

Im Fall von His₆-AgnA *truncated* wurde eine dominante Bande bei ~65 kDa detektiert, was der theoretischen Proteingröße von 69,3 kDa entspricht (vgl. Abb. 20). Dabei zeigte sich jedoch, dass der Hauptteil des His₆-AgnA Proteins unlöslich in den lysierten Zellen vorlag. Im Vergleich zu dem His₆-markierten AgnA Fusionsprotein, lag MBP-AgnA zu etwa 60 % im löslichen Überstand vor. Für das MBP-markierte AgnA *truncated* konnte die erwartete Bande bei 110-120 kDa (theoretische Größe: 108,9 kDa) und darüberhinaus mehrere Banden mit geringerem MW identifiziert werden (vgl. Abb. 21). Trotz der schlechteren Löslichkeit wurde das His₆-AgnA *truncated* Protein mittels immobilisierter Metallchelate Affinitätschromatographie aufgereinigt und für die Herstellung von Antikörpern eingesetzt (Giesler, 2011). Für das AgnB Protein konnte auch mit verkürzten Varianten keine ausreichende Menge an löslichem Protein aufgereinigt werden, um scFvs zu gewinnen (Daten nicht gezeigt).

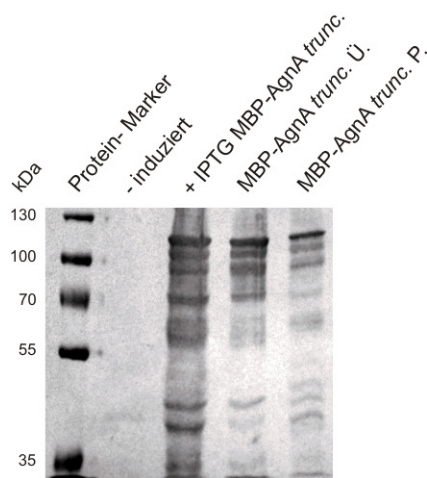


Abb. 21: Expression des rekombinanten Proteins MBP-AgnA *truncated*

Die Induktion von MBP-AgnA *truncated* erfolgte mit 0,3 mM IPTG für 3 h bei 22 °C. Nach der Induktion wurden die Zellen pelletiert und lysiert. Anschließend wurden die löslichen (Ü. = Überstand) und unlöslichen (P. = Pellet) Bestandteile der lysierten Zellen in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe des immunologischen Nachweises des MBP-Tags. Das theoretische MW des rekombinanten Proteins beträgt 108,9 kDa. *trunc.* = *truncated*.

Nach dem *Panning* konnte ein spezifischer scFv, der das His₆-AgnA *truncated* bindet, isoliert werden. Der scFv wurde als Primärantikörper eingesetzt, um das AgnA Protein nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran zu detektieren. Der scFv kann das rekombinante His₆-AgnA *truncated* Protein binden. Der Nachweis des scFvs erfolgte durch den Einsatz von Antikörpern. Wird der scFv allerdings zur Detektion des endogenen AgnA Proteins im Zelllysat von *D. discoideum* eingesetzt, so wird eine Vielzahl von Proteinen (>30 Banden) bei dem immunologischen Nachweis sichtbar (Daten nicht gezeigt). Der scFv ist daher nicht in der Lage, das endogene AgnA Protein spezifisch nachzuweisen.

8.4 Untersuchung der Expression von Retrotransposons in Argonauten KO-Stämmen

Organismen verwenden unterschiedliche Mechanismen zum Schutz ihrer Genome vor der Aktivität und Ausbreitung von Transposons und Retrotransposons (vgl. 4.2.2 + 4.2.3). Argonauten Proteine spielen bei diesen Regulationsmechanismen oft eine entscheidende Rolle, indem sie z.B. Transkripte von Transposons endonukleolytisch spalten und sie auf diese Weise unschädlich machen (vgl. 4.2.2 + 4.2.3). In dem Genom von *D. discoideum* stellt DIRS-1 das prominenteste LTR Retrotransposon dar und weit über 60 % aller 21 nts langen RNAs in den Zellen können dem *sense* oder *antisense* Transkript des Retrotransposons zugeordnet werden (Hinas et al., 2007). Von dem zweithäufigsten Retrotransposon Skipper konnten bisher nur wenige spezifische siRNAs mittels *Deep Sequencing* identifiziert werden (Hinas et al., 2007).

In verschiedenen Organismen führt der Verlust von Argonauten Proteinen zur Aktivierung von Retrotransposon (Tabara et al., 1999). Um eine mögliche Beteiligung der Argonauten Proteine AgnA und AgnB an der Regulation der Retrotransposons zu überprüfen, wurde die Expression von DIRS-1 und Skipper Transkripten sowie der kleinen siRNAs, die von diesen Elementen abstammen, in den entsprechenden KO-Stämmen untersucht. Die nachfolgenden Ergebnisse sind in der chronologischen Abfolge der Durchführung, wobei zunächst die kleinen RNAs und im Anschluss die Transkripte untersucht wurden. Im Anhang 12.1 und 12.2 befinden sich die Bindepositionen der verwendeten Sonden.

8.4.1 Nachweis von siRNAs und Transkripten des Skipper Retrotransposons

Im Jahr 1998 wurde erstmals ein 7000 nts langes Transkript beschrieben, das einem vollständigen Skipper-Element zugeordnet werden konnte (Leng et al., 1998). Anhand von *High Throughput* Sequenzierung konnten acht unterschiedliche Skipper siRNAs identifiziert werden, die alle einer unvollständigen Kopie auf dem Chromosom 2 von *D. discoideum* zugeordnet werden können (Hinas et al., 2007).

Um die Expression der Skipper siRNAs in verschiedenen KO-Stämmen zu untersuchen, wurden *Northern Blots* durchgeführt und die siRNAs mit spezifischen Oligonukleotiden detektiert. Die siRNAs konnten schwach im AX2 wt und den AgnB KO-Stämmen nachgewiesen werden. Der Verlust von AgnB beeinflusst das Expressionslevel der untersuchten siRNAs nicht. In den AgnA KO- und den AgnA/B KO-Stämmen konnte eine Anreicherung der Skipper spezifischen siRNAs nachgewiesen werden. Allerdings schwankte das Expressionslevel innerhalb der untersuchten Einzelklone sehr stark: Es konnten Unterschiede von bis zu 400 % gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

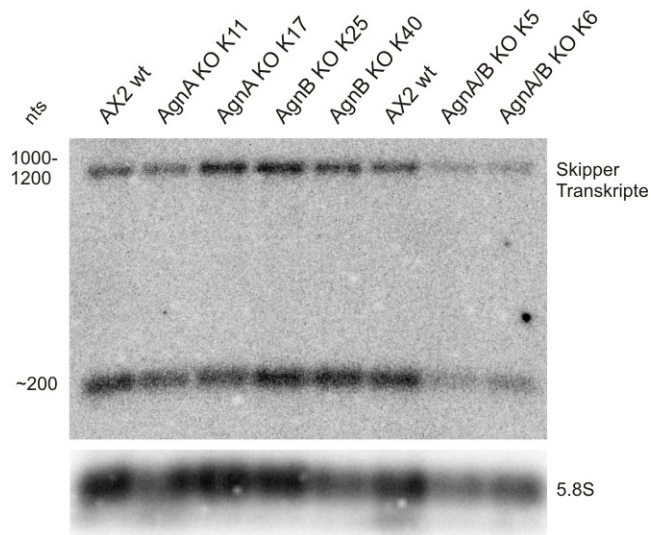


Abb. 22: Detektion von Transkripten des Skipper Retrotransposons in *D. discoideum*

Agarose *Northern Blot* zum Nachweis von Skipper Transkripten im AX2 Wildtyp und verschiedenen Argonauten KO-Stämmen. Totale RNA wurde in einem GTC-Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran gebロットet. Die Detektion von Skipper-spezifischen RNA-Spezies erfolgte durch die ^{32}P -markierten Oligonukleotide Skipper *small RNA-3' stem*, *-5' stem* und *-loop* (vgl. 12.1 Abb. 67). Die Lademengen und Transfer-effizienzen wurden anhand des Nachweises der 5.8S rRNA (Oligonukleotid DD5.8S) kontrolliert. Gezeigt ist ein Ausschnitt des *Blots*.

Bei der Analyse der Skipper Transkripte mit Hilfe von *Northern Blots* konnte weder im Wildtyp noch in den KO-Stämmen das von Leng und Mitarbeitern beschriebene 7000 nts lange Transkript nachgewiesen werden. Unter der Verwendung von Skipper spezifischen Oligonukleotiden konnten jedoch zwei Transkripte mit einer Größe von 200 nts bzw. 1000–1200 nts identifiziert werden (vgl. Abb. 22), bei denen es sich möglicherweise um Produkte einer unvollständigen Skipper Kopie handeln könnte.

Die Menge an Skipper Transkripten wurden anhand von *Northern Blots* und mit *Real-time* RT-PCR quantifiziert. Sie wiesen jedoch keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Argonauten KO-Stämmen auf (vgl. Abb. 22 + Abb. 23).

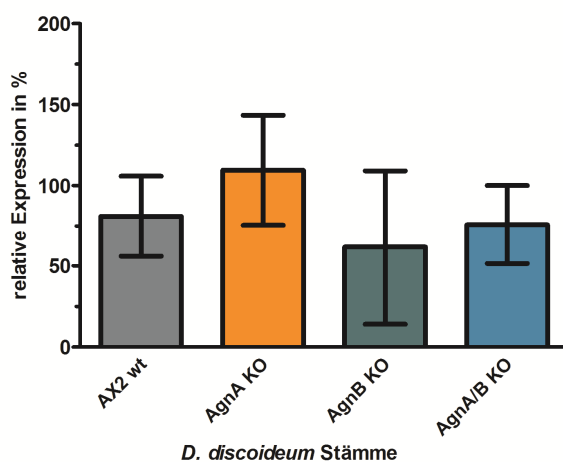


Abb. 23: Vergleich der relativen Transkriptmengen des Skipper Retrotransposons in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Relative Quantifizierung der Skipper Transkriptmengen in den gezeigten *D. discoideum* Stämmen mittels *Real-time* RT-PCR. In der PCR wurde mit den Primern SM70/SM71 (#2776/#2777) ein 218 bp langes Fragment amplifiziert, das in dem Bereich des RT ORFs des Retrotransposons liegt. Die erhaltenen Werte wurden gegen *cinD-1* (Primer #1923/#1924) referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 6. Fehlerbalken: *mean with SD*, gepaarter t-Test: $p = 0,2239$ (ns) (AX2 wt/ AgnA KO), $p = 0,5933$ (ns) (AX2 wt/AgnB KO), $p = 0,6149$ (ns) (AX2 wt/AgnA/B KO).

8.4.2 Nachweis von DIRS-1 siRNAs

Zum Nachweis von DIRS-1 siRNAs wurden *Northern Blots* mit RNA aus dem AX2 wt und verschiedenen Argonauten KO-Stämmen durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe eines Oligonukleotides eine DIRS spezifische *antisense* siRNA, die im 3'-Bereich des DIRS-1 ORF II lokalisiert ist, detektiert (vgl. Abb. 68). Die Signale für die DIRS-1 siRNAs wurden gegen die snoRNA 6 (DdR-6) quantifiziert. In den AgnA KO- und den AgnA/B KO-Stämmen ist eine deutliche Abreicherung dieser kleinen RNA zu erkennen (vgl. Abb. 24 + Abb. 25).

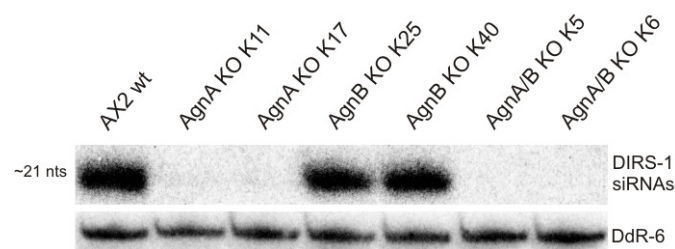


Abb. 24: Nachweis von DIRS-1 siRNAs in verschiedenen Argonauten KO-Stämmen

Northern Blot zur Detektion von DIRS-1 siRNAs in verschiedenen Deletionsstämmen und d AX2 Wildtyp. Gesamt-RNA wurde in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der DIRS-1 spezifischen Sequenzen erfolgte mit dem ^{32}P -markierten Oligonukleotid DIRS *small* RNA (#2599) (vgl. 12.2 Abb. 68). Die Größe der RNA-Spezies wurde anhand eines miRNA Markers (NEB) bestimmt. Die Lademengen und Transfereffizienzen wurden durch den Nachweis von DdR-6 (#2554) kontrolliert.

Im Gegensatz dazu zeigten die untersuchten AgnB KO-Stämme nur eine geringfügig reduzierte Menge. Die Quantifizierung der DIRS-1 siRNAs ergab eine Reduzierung von über 90 % im Fall der AgnA KO- und der AgnA/B KO-Stämme (vgl. Abb. 25).

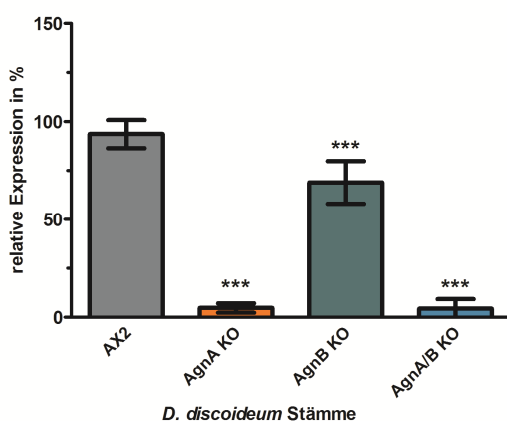


Abb. 25: Relative Quantifizierung der DIRS-1 siRNA Mengen in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Der Nachweis von DIRS-1 spezifischen siRNAs erfolgte mit dem ^{32}P -markierten Oligonukleotid DIRS *small* RNA (#2599). Die erhaltenen Signale für die DIRS-1 siRNAs wurden gegen DdR-6 (#2554) referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 8. Fehlerbalken: mean with SD, gepaarter t-Test: $p = < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA KO), $p = < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnB KO), $p = < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA/B KO).

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden weitere *Northern Blot* Analysen durchgeführt. Diesmal wurden *in vitro* Transkripte als Sonden eingesetzt, mit denen spezifisch *sense* oder *antisense* siRNAs detektiert werden konnten. Die detektierten siRNAs stammen aus einem 300 bp langen Bereich, der sich vom Ende des DIRS-1 ORF I bis zum Anfang des DIRS-1 ORF II erstreckt und in der Folge als DIRS-1 LE bezeichnet wird.

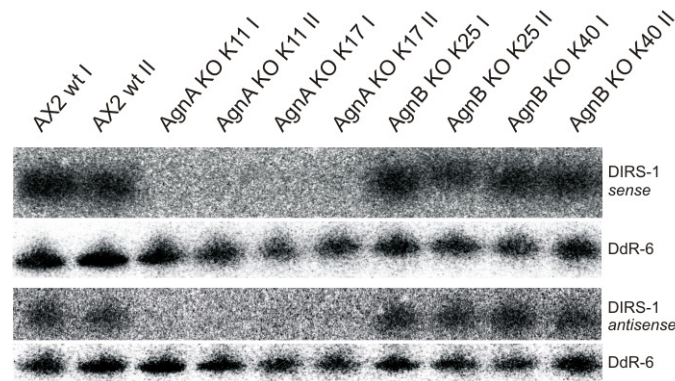


Abb. 26: Strangspezifischer Nachweis von sense und antisense DIRS-1 siRNAs

Northern Blot zum Nachweis von sense und antisense DIRS-1 siRNAs in verschiedenen KO-Stämmen und AX2 Wildtyp. Die Detektion der strangspezifischen DIRS-1 siRNAs erfolgte durch die 32 P-markierten *in vitro* Transkripte DIRS-1 LE sense und DIRS-1 LE antisense. Gesamt-RNA wurde in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Lademengen und Transfereffizienzen wurden durch Nachweis von DdR-6 (#2554) überprüft. I / II = unabhängige RNA Isolierungen.

Es stellte sich heraus, dass sowohl sense als auch antisense siRNAs aus dem untersuchten Bereich in den AgnA KO-Stämmen im Vergleich zum AX2 wt um ca. 90 % abgereichert sind (vgl. Abb. 26 + Abb. 27). Bei den AgnB KO-Stämmen kommt es zu keiner signifikanten Änderung der Menge an DIRS-1 siRNAs.

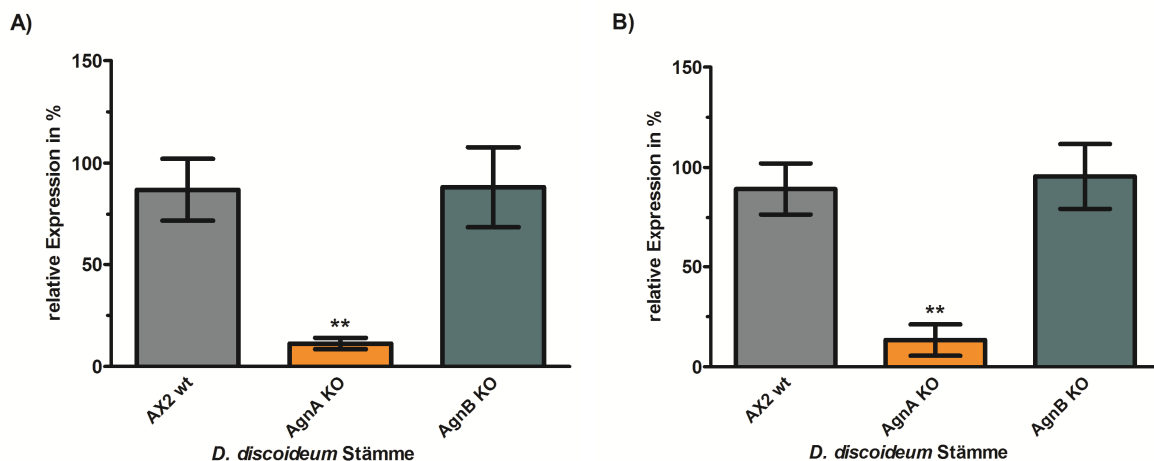


Abb. 27: Relative Quantifizierung der Menge strangspezifischer DIRS-1 siRNAs in verschiedenen D. discoideum Stämmen

- A) Nachweis der sense siRNAs von DIRS-1 an der Position LE mit 32 P-markiertem *in vitro* Transkript DIRS-1 LE sense (vgl. 12.2 Abb. 69). Die erhaltenen Signale für die DIRS-1 siRNAs wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 4. Fehlerbalken: mean with SD, gepaarter t-Test: p = 0,0025 (**) (AX2 wt/ AgnA KO), p = 0,9235 (ns) (AX2 wt/AgnB KO).
- B) Nachweis der antisense siRNAs von DIRS-1 an der Position LE mit 32 P-markiertem *in vitro* Transkript DIRS-1 LE antisense (vgl. 12.2 Abb. 69). Die erhaltenen Signale für die DIRS siRNAs wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 4. Fehlerbalken: mean with SD, gepaarter t-Test: p = 0,0016 (**) (AX2 wt/ AgnA KO), p = 0,6313 (ns) (AX2 wt/AgnB KO).

Die Reduzierung der DIRS-1 siRNAs ist zum überwiegenden Teil abhängig von AgnA. AgnB scheint auf die Generierung von DIRS-1 siRNAs keinen großen Einfluss zu haben (vgl. 9.1).

Es ist bekannt, dass die Expression der DIRS-1 Transkripte im Verlauf der Entwicklung von *D. discoideum* ansteigt (Rosen et al., 1983). Um zu überprüfen, ob gleiches auch für die DIRS-1 siRNAs gilt, wurde zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten RNA aus AX2 wt und AgnA KO isoliert und die Menge der kleinen DIRS-1 siRNAs untersucht. Dabei konnte kein Unterschied bezüglich des Levels der siRNAs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die DIRS-1 siRNAs *Targets* im Nukleus oder im Cytoplasma haben, wurde ihre subzelluläre Lokalisation analysiert. Dazu wurde das Cytoplasma von den Zellkernen getrennt und die RNA separat aus beiden Fraktionen isoliert. In einem *Northern Blot* wurden die siRNAs in der cytoplasmatischen und der nukleären Fraktion von AX2 wt und AgnA KO-Stämmen detektiert (vgl. Abb. 28). Die DIRS-1 siRNAs lokalisieren hauptsächlich im Cytoplasma und sind kaum im Zellkern nachweisbar. Dies gilt auch für die geringen Restmengen von DIRS-1 siRNAs in dem AgnA KO-Stamm.

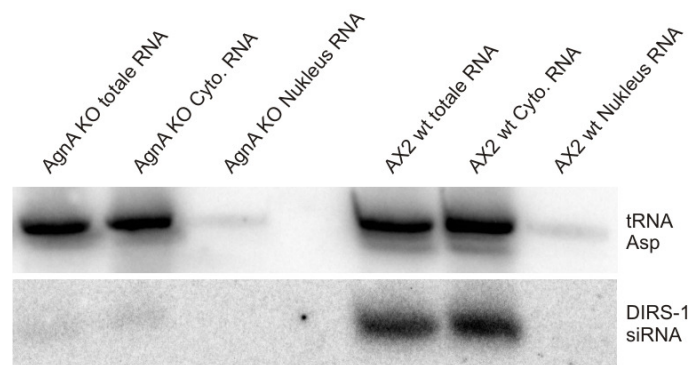


Abb. 28: Lokalisation von DIRS-1 siRNAs in der Zelle

Für die Untersuchung der Lokalisation wurde das Cytoplasma von den Zellkernen getrennt und die jeweilige RNA unabhängig voneinander isoliert. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus ganzen Zellen isoliert. Die RNA wurde auf einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis der DIRS-1 siRNAs erfolgte mit dem Oligonukleotid DIRS *small* RNA (#2599) (vgl. 12.2 Abb. 68). Zur Analyse, ob die Trennung von Cytoplasma und Nukleus erfolgreich war, wurde mit dem Oligonukleotid SM5_tRNA_ASP_mid (#2263) gegen die tRNA Asp hybridisiert. Cyto. = Cytoplasma.

8.4.3 Nachweis von DIRS-1 Transkripten

Volllängetranskripte von DIRS-1 können in *D. discoideum* AX2 wt detektiert werden, wobei die Menge der Transkripte im Entwicklungszyklus und unter Hitzeschock Bedingungen deutlich zunimmt (Rosen et al., 1983). Nach dem Nachweis der DIRS-1 siRNAs sollten nun auch die Transkripte untersucht werden.

In einem ersten Experiment zur Quantifizierung von DIRS-1 Transkripten wurde RNA aus AX2 wt und einem AgnA KO-Stamm verwendet. Dabei sollten die Transkriptmengen aus vegetativ wachsenden Zellen und Zellen, die für 3 h bei 30 °C einem Hitzeschock ausgesetzt waren, verglichen werden. Die Detektion der Transkripte im *Northern Blot* erfolgte mit einer OLB-Sonde, die den kompletten Sequenzbereich von 1002 bp des DIRS-1 ORF I abdeckt. Im AX2 wt und im AgnA KO-Stamm konnten in vegetativ wachsenden Zellen unterschiedliche DIRS-1 Transkripte nachgewiesen werden, die sich in den Mengen und den Größen stark unterscheiden (vgl. Abb. 29).

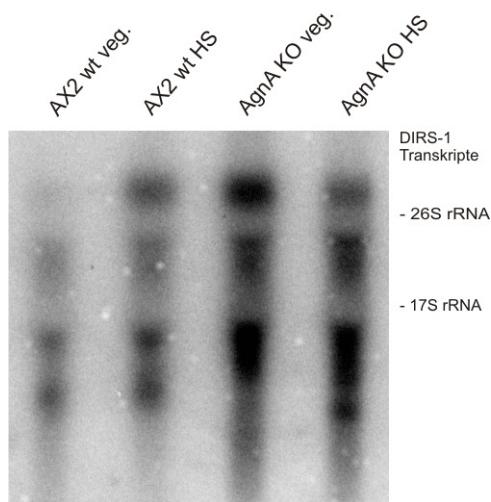


Abb. 29: Nachweis von DIRS-1 Transkripten in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Agarose *Northern Blot* zum Nachweis von DIRS-1 Transkripten in verschiedenen KO-Stämmen und dem AX2 Wildtyp. Gesamt-RNA wurde in einem 1,6%igen GTC-Agarose Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Transkripte erfolgte durch die ³²P-markierte OLB-Sonde DIRS ORF I.

Die DIRS-1 Transkripte sind im AgnA KO-Stamm deutlich angereichert und es konnte ein ~4000 nts großes Transkript nachgewiesen werden, welches im AX2 wt nicht detektiert werden konnte. Nach dem Hitzeschock konnte auch im Wildtyp ein ähnlich großes Transkript detektiert werden. Zudem waren die Unterschiede bezüglich der Menge an DIRS-1 Transkripten zwischen AgnA KO und Wildtyp geringer, nachdem ein Hitzeschock gegeben wurde (vgl. Abb. 29).

Für eine strangspezifische Detektion von *sense* DIRS-1 Transkripten in vegetativen Zellen wurden ³²P-markierte Oligonukleotide verwendet. So konnte das ~4000 nts lange Transkript, das nur im AgnA KO detektierbar ist, dem *sense* Strang zugeordnet werden (vgl. Abb. 30A + B). Im AgnA KO stellt dieses Transkript die prominenteste DIRS-1 RNA-Spezies dar, während aber noch weitere, kleinere Transkripte mit geringerer Signalstärke detektiert werden können. Im Wildtypstamm kann unter vegetativen Wachstumsbedingungen ein DIRS-1 Transkript mit einer Länge zwischen 1600-1800 nts nachgewiesen werden, wobei auch in diesem Stamm zusätzliche, kürzere DIRS-1 Transkripte detektierbar sind (vgl. Abb. 30A + B).

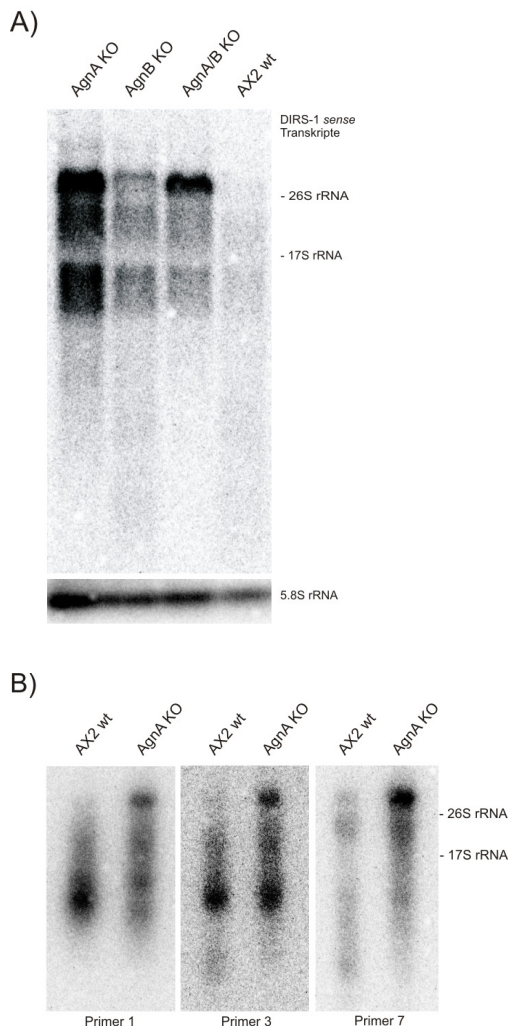


Abb. 30: Nachweis von *sense* DIRS-1 Transkripten in Argonauten KO-Stämmen

- A) Agarose *Northern Blot* zum strangspezifischen Nachweis von DIRS-1 *sense* Transkripten in verschiedenen KO-Stämmen und AX2 Wildtyp. Gesamt-RNA wurde in einem 1,6%igen GTC-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Transkripte erfolgte mit dem ^{32}P -markierten Oligonukleotid BB179 (#2954). Gleiche Lademengen und Transfereffizienzen konnten durch Nachweis von rRNA 5.8S (Oligonukleotid DD5.8S) überprüft werden.
- B) Agarose *Northern Blot* zum strangspezifischen Nachweis von DIRS-1 *sense* Transkripten im AgnA KO-Stamm und AX2 Wildtyp. Gesamt-RNA wurde in einem 1,6%igen GTC-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Transkripte erfolgte mit den ^{32}P -markierten Oligonukleotiden: Primer 1 = BB141 (#2916), Primer 3 = BB145 (#2920) und Primer 7 = BB153 (#2928) (vgl. 12.2 Abb. 70).

Nach Hitzeschock konnte zudem im AX2 wt das 900 nts lange E1 Antisense Transkript von DIRS-1 nachgewiesen werden (Rosen et al., 1983). Um zu untersuchen, ob durch den Verlust des AgnA Proteins Transkripte des *antisense* Stranges auch unter vegetativen Bedingungen vorliegen, erfolgte die Detektion der *antisense* Sequenz mittels spezifischer ^{32}P -markierter Oligonukleotide.

In weiteren *Northern Blots* mit RNA aus vegetativen Zellen von AX2 wt, AgnA KOs und AgnB KOs konnte das 900 nts lange E1 *antisense* Transkript in keinem der Stämme nachgewiesen werden. Dagegen konnte ein ~4000 nts langes *antisense* DIRS-1 Transkript detektiert werden, welches in den AgnA KO-Stämmen angereichert vorliegt (vgl. Abb. 31).

Zusätzlich konnte nur ein schwacher Schmier und keine weiteren kleinen Banden nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der Anreicherung der DIRS-1 Transkripte in den AgnA KO- und AgnB KO-Stämmen wurden *Real-time* PCR Messungen durchgeführt. Für die Experimente wurde *cinD-1* als *housekeeping*-Gen verwendet. Die Quantifizierung der Transkripte, die den DIRS-1 LE Bereich (vgl. 8.4.2 + 12.3 Abb. 75) beinhalten, ergab eine Erhöhung der DIRS-1 Transkripte in den AgnA KOs im

Mittel von 779 % und in den AgnA/B KOs von 277 % im Vergleich zum AX2 wt. Im AgnB KO liegt die Menge der Transkripte bei 49 % (vgl. Abb. 32A).

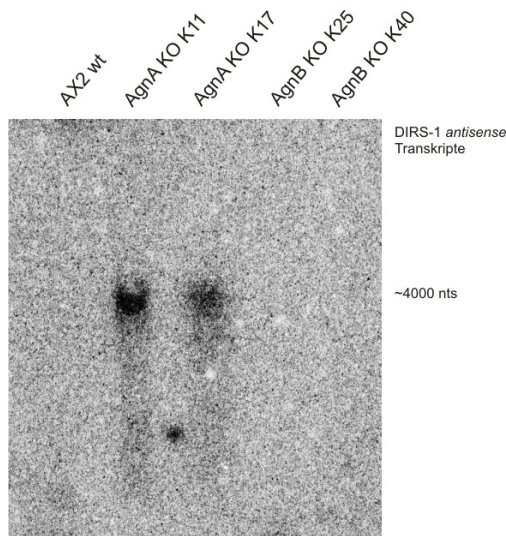


Abb. 31: Nachweis von *antisense* DIRS-1 Transkripten in Argonauten KO-Stämmen

Agarose *Northern Blot* zum strangspezifischen Nachweis von DIRS-1 *antisense* Transkripten in verschiedenen KO-Stämmen und AX2 Wildtyp. Gesamt-RNA wurde in einem 1,6 %igen GTC-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Transkripte erfolgte mit dem ³²P-markierten Oligonukleotid DIRS *small* RNA (#2599) (vgl. 12.2 Abb. 68).

Bei unabhängigen Messungen wurden die Transkripte im Bereich des 3'-Endes von DIRS-1 ORFs II quantifiziert (vgl. 12.3 Abb. 75). Es konnte eine Anreicherung der DIRS-1 Transkripte im AgnA KO und im AgnA/B KO festgestellt werden. Die Menge der Transkripte entsprach für AgnA KO im Mittel 397 % und im Fall von AgnA/B 393 % im Vergleich zum Wildtyp. Im AgnB KO konnte auch bei der zweiten Messung eine leichte Abreicherung der Transkripte auf 61 % festgestellt werden (vgl. Abb. 32B).

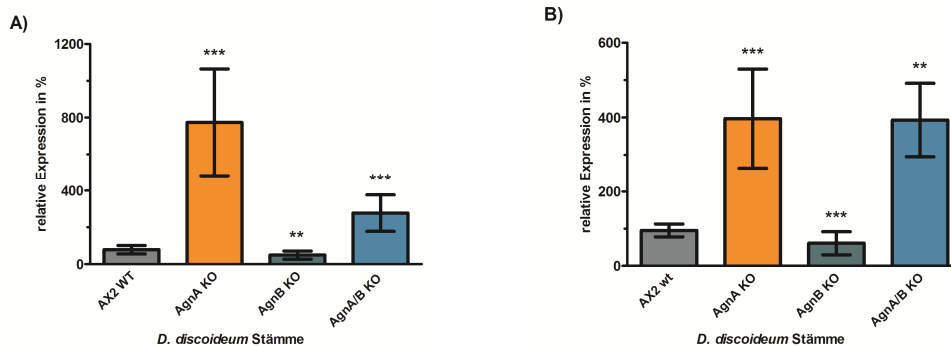


Abb. 32: Relative Quantifizierung der DIRS-1 Transkripte in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Relative Quantifizierung der Menge an DIRS-1 Transkripten in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Real-time* RT-PCR. Die Signale wurden gegen *cinD-1* (Primer #1923/#1924) referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen.

- A) Nachweis der DIRS-1 Transkripte mit den Primern DIRS-1 LE (Primern #2981/#2982). N = 8. Fehlerbalken: *mean with SD*, gepaarter t-Test: $p = 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA KO), $p = 0,0037$ (**) (AX2 wt/AgnB KO), $p = 0,0010$ (***) (AX2 wt/AgnA/B KO) (vgl. 12.3 Abb. 75).
- B) Nachweis der DIRS-1 Transkripte mit den Primern DIRS-1 ORF II (Primer #1927/#1928). N = 14 (AgnA/B KO: N = 4). Fehlerbalken: *mean with SD*, gepaarter t-Test: $p < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA KO), $p = 0,0004$ (***) (AX2 wt/AgnB KO), $p = 0,0093$ (**) (AX2 wt/AgnA/B KO) (vgl. 12.3 Abb. 75).

8.4.4 *De novo* Synthese von DIRS-1 Transkripten

In verschiedenen Modellorganismen sind für die Regulation von Transposons und Retrotransposons unterschiedliche Mechanismen identifiziert worden. So erfolgt in *S. pombe* eine Heterochromatisierung der Genomregionen, in denen Transposons kodiert sind, wodurch die Transkription dieser Sequenzen reguliert wird (vgl. 4.2.2). In *D. melanogaster* hingegen wird die Expression von Transposons auf der posttranskriptionellen Ebene gesteuert, indem die Transkripte gezielt degradiert werden (vgl. 4.2.2). Um einen ersten Einblick zu erhalten, ob die Regulation des DIRS-1 Transposons in *D. discoideum* auf der transkriptionellen oder auf der posttranskriptionellen Ebene erfolgt, wurde die *de novo* Synthese von DIRS-1 spezifischen Sequenzbereichen nachgewiesen. Zunächst wurden Zellkerne von AX2 wt-, AgnA KO- und AgnB KO-Stämmen isoliert und daraufhin die *de novo* Synthese mittels *Run-On* Transkriptionen von DIRS-1 Transkripten detektiert. In allen untersuchten Stämmen konnten *de novo* gebildete *sense* und *antisense* Transkripte detektiert werden, wobei die Mengen, die für die unterschiedlichen DIRS-1 ORFs bestimmt wurden, stärkeren Schwankungen unterlagen (vgl. Abb. 33). Es konnte keine erhöhte Synthese von DIRS-1 spezifischen Transkripten in den AgnA KOs festgestellt werden (vgl. Abb. 32A + B). Die Anreicherung von DIRS-1 Transkripten im AgnA KO bei weitgehend gleicher Transkription der Sequenzen im Vergleich zum Wildtyp lässt auf eine posttranskriptionelle Regulation des Retrotransposons schließen. Die detektierten Schwankungen beruhen vermutlich auf experimentellen Ursachen und daher muss dieses Experiment mindestens ein weiteres Mal wiederholt werden.

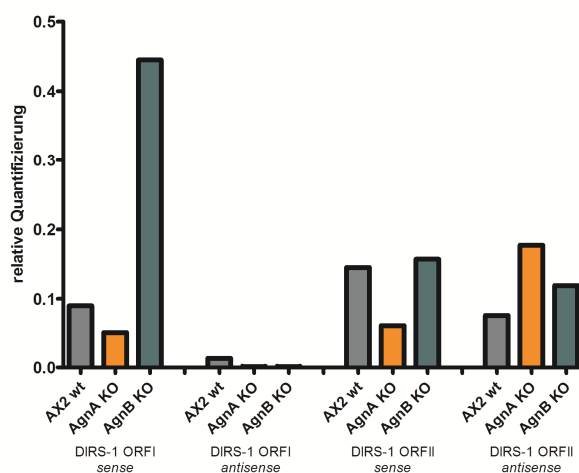


Abb. 33: Detektion der *de novo* Synthese von DIRS-1 Transkripten

Untersuchung der Menge von *de novo* synthetisierten DIRS-1 Transkripten mittels *Run-on* Transkription in dem *D. discoideum* Wildtypstamm (grau) und den AgnA (orange) und AgnB (grün) KO-Stämmen. Vor der Hybridisierung wurden *in vitro* Transkripte komplementär zu DIRS-1 ORFI und DIRS-1 ORFII in *sense* und *antisense* Orientierung auf eine Nylonmembran geblottet. Die Referenzierung erfolgte gegen die Actin mRNA, für deren Detektion ein komplementäres *in vitro* Transkript verwendet wurde. N = 1.

8.4.5 Nachweis von zusätzlichen Integrationen von DIRS-1 in *D. discoideum*

Langzeitkulturen

Der *Knockout* der Methyltransferase DnmA in *D. discoideum* zieht eine erhöhte Integration von Skipper-Elementen in das Genom von Dauerkulturen nach sich und legt eine Beteiligung von DnmA in

der Regulation des Transposons nahe (Kuhlmann et al., 2005). In anderen Organismen, wie z.B. *C. elegans* oder *D. melanogaster*, führt eine erhöhte Menge von transposablen Transkripten zu einer verstärkten Transposition der Elemente in das Genom (Saito und Siomi, 2010). Auf Grund der höheren Anzahl von DIRS-1 Transkripten im AgnA KO sollte in diesem Stamm die Anzahl von DIRS-1 Integrationen in Langzeitkulturen bestimmt werden. Für dieses Experiment wurde der Wildtypstamm AX2 und die Mutanten AgnA KO K11, AgnA KO K17 und AgnB KO K25 für 6 Monate dauerhaft kultiviert. Aus subklonierten Einzelklonen wurde genomische DNA isoliert und für *Southern Blot* Analysen nach *NdeI* Verdau eingesetzt. Eine vollständige DIRS-1 Kopie besitzt eine *NdeI* Schnittstelle im Bereich des ORF I (Cohen et al., 1984). Bei einer erhöhten Transposition sollten zusätzliche Banden im *Southern Blot* erkennbar, da vermutet wird, dass DIRS-1 immer in DIRS-1 Sequenzen integriert und es so zur Fragmentierung von DIRS-1 Kopien kommen kann (Cappello et al., 1984). In den AgnA KO Einzelklonen konnte eine leicht erhöhte Menge von DIRS-1 DNA detektiert werden. Zusätzliche Banden konnten im Bereich von 700 bp und 1 kb in den AgnA KOs nachgewiesen werden, die im AX2 wt und AgnB fehlten (vgl. Abb. 34). Da die komplette DIRS-1 Sequenz in ca. 4 kb umfasst, ist anzunehmen, dass die zusätzlich detektierten Banden in dem Bereich von 700 bp bis 1 kb lediglich Fragmente des Retrotransposons darstellen. Um zu ermitteln, ob diese DIRS-1 Fragmente prädominante Sequenzen enthalten, sollten die Banden in pJet1.2 kloniert und anschließend sequenziert werden, was jedoch fehlschlug.

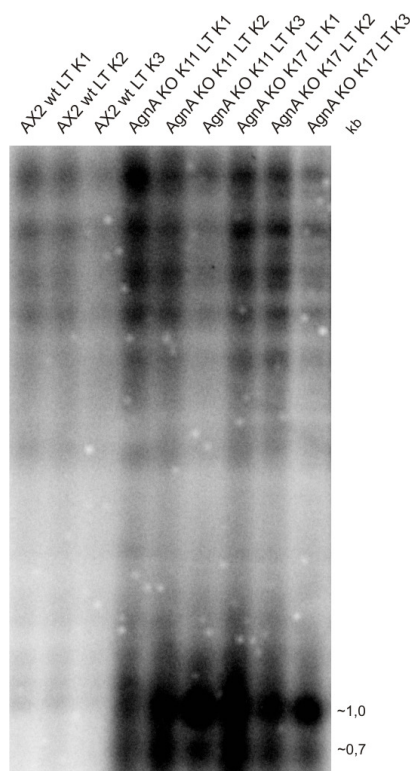


Abb. 34: Nachweis von zusätzlichen DIRS-1 Fragmenten in Langzeitkulturen von AgnA KO-Stämmen

Genomische DNA wurde aus verschiedenen Einzelklonen von AX2 wt und AgnA KO, die für 6 Monate in Dauerkultur gehalten wurden, isoliert. Nach einem Restriktionsverdau mit *NdeI* wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und im Anschluss durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion von DIRS-1 erfolgte durch die Hybridisierung der Membran mit der OLB-Sonde MJD83/DIRS-1 LTR REV (#1927/#897) (vgl. 12.2 Abb. 71). LT = 6 Monate langzeitgewachsene Kultur; K1, K2, K3 = unabhängige Klone.

Zur Bestimmung der Zunahme von DIRS-1 Integrationen wurde die Kopienzahl von DIRS-1 in zwei bis vier Wochen kultivierten Zellen und in Zellen, die ein Jahr in Dauerkultur gehalten wurden, mit Hilfe von *Real-time* PCR untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei unabhängige Bereiche der DIRS-1 Sequenz amplifiziert. Die Quantifizierung des ersten Bereichs, der den DIRS-1 LE umfasst, ergab für den Wildtyp und den AgnA KO beim Vergleich von langzeit- und kurzzeitgewachsenen Kulturen keinen signifikanten Unterschied in der DIRS-1 Integration (vgl. Abb. 35A). DIRS-1 LE ist ein 300 bp langer Bereich, der sich vom Ende des DIRS-1 ORF I bis zum Anfang des DIRS-1 ORF II erstreckt. Die relativen Mengen des zweiten quantifizierten Bereichs, der am 3'-Ende des ORF II liegt, zeigten allerdings in langzeitgewachsenen AgnA KO Kulturen eine Zunahme von DIRS-1 im Vergleich zu kurzzeitgewachsenen AgnA KO Kulturen (vgl. Abb. 35B + 8.4.6). Die Menge von DIRS-1 in langzeitgewachsenen AgnA KO Kulturen ist im Vergleich zum kurzzeitgewachsenen AX2 um 50 % erhöht (vgl. 9.1.3). Vergleicht man die beiden entsprechenden Langzeitkulturen miteinander, so kann eine Anreicherung von 80 % gemessen werden (vgl. Abb. 35B). Im AgnB KO entspricht die relative Menge an DIRS-1 Sequenzen im Genom des Stamms sowohl in langzeit- als auch in kurzzeitgewachsenen Kulturen dem des Wildtyps (vgl. Abb. 35A + B).

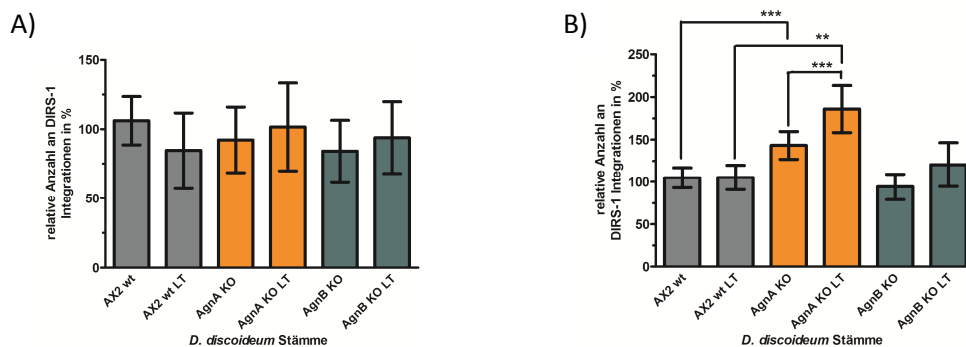


Abb. 35: Bestimmung der Kopienzahl der DIRS-1 Integrationen in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Relative Quantifizierung der Kopienzahl von DIRS-1 Integration in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Real-time* PCR. Genomische DNA wurde aus Populationen isoliert. Die Signale wurden gegen *corA* (Primer #1828/#1829) referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. LT = langzeitgewachsen.

- A) Quantifizierung der DIRS-1 Integrationen mit den Primern DIRS-1 LE (Primer #2981/#2982). N = 6. Fehlerbalken: *mean with SD*.
- B) Quantifizierung der DIRS-1 Integrationen mit den Primern DIRS-1 ORF II (Primer #1927/#1928). N = 6. Fehlerbalken: *mean with SD*, gepaarter t-Test: $p = 0,0004$ (***) (AX2 wt/AgnA KO), $p = 0,0019$ (**) (AX2 wt LT/AgnA KO LT), $p = 0,0001$ (***) (AgnA KO/AgnA KO LT).

In den Kurz- und Langzeitkulturen von AX2 wt, AgnA KO und AgnB KO wurde ebenfalls die Menge der Skipper Integrationen mit *Real-time* PCR quantifiziert, wobei jedoch keine Zunahme an Skipper Integrationen in den Langzeitwachstumskulturen der untersuchten Stämme festgestellt werden konnte (vgl. Abb. 36). Die Anzahl der Skipper Integration nimmt im Laufe der Zeit um ungefähr 20 % ab (vgl. Abb. 36).

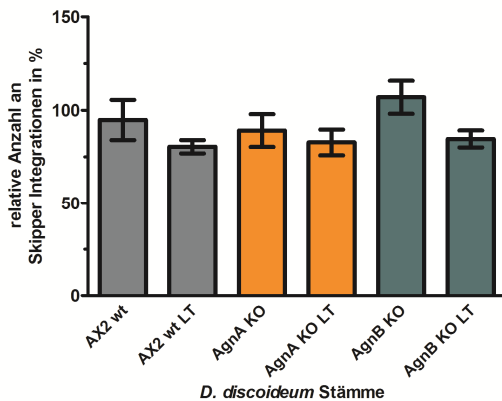


Abb. 36: Bestimmung der Kopienzahl von Skipper Integrationen in Dauerkulturen verschiedener *D. discoideum* Stämme

Relative Quantifizierung der Skipper Kopienzahl im Genom von *D. discoideum* Stämmen erfolgte mittels *Real-time* PCR. Genomische DNA wurde aus Langzeitkulturen von AgnA KO- und AgnB KO-Stämmen sowie AX2 wt isoliert. Der Nachweis der Skipper Integrationen erfolgte durch die Amplifikation eines 218 bp langen Fragments von Skipper mit den Primern #2776/#2777, das im Bereich des RT ORFs des Retrotransposons liegt. Die erhaltenen Werte wurden gegen *corA* (Primer: #1828/#1829) referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 6. Fehlerbalken: *mean with SD*. LT = langzeitgewachsen.

8.4.6 Nachweis von extrachromosomaler DIRS-1 DNA

Das derzeitige Modell der DIRS-1 Amplifikation sieht nach der Synthese eines *sense* Transkripts die Produktion einer einzelsträngigen cDNA vor (Cappello et al., 1985; Poulter und Goodwin, 2005) (vgl. Abb. 37A). Diese cDNA hybridisiert *in cis* und bildet Sekundärstrukturen aus, wodurch die DIRS-1 Sequenz, die *upstream* des Transkriptionsstarts liegt und somit nicht in dem Transkript enthalten ist, amplifiziert werden kann (vgl. Abb. 37C-F). Abschließend erfolgt die Ligation der cDNA-Enden und die Synthese eines komplementären DNA-Stranges, um die Integration der Transposonsequenz in das Genom zu ermöglichen (Poulter und Goodwin, 2005) (vgl. Abb. 37G). Dieses Modell sieht mindestens eine Zwischenstufe in der DIRS-1 Replikation vor, in der die Sequenz in Form einer einzelsträngigen DNA außerhalb des Chromosoms vorliegt.

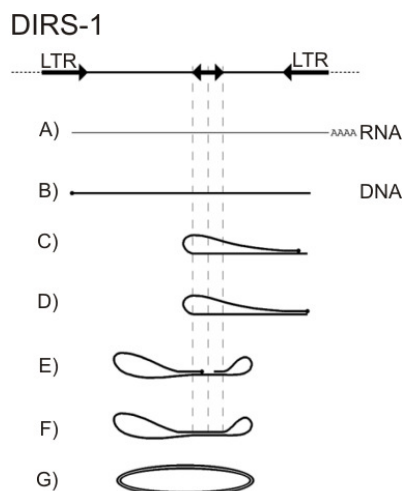


Abb. 37: Amplifikationsmechanismus des DIRS-1 Retrotransposons (modifiziert nach Poulter et al., 2005)

- Transkription der DIRS-1 mRNA.
- Bildung von einzelsträngiger extrachromosomaler cDNA, nach Vorlage der mRNA.
- C-F) Amplifikation der Sequenz der linken LTR und Ligation des Einzelstranges.
- Generierung des komplementären Doppelstranges.

Ausgehend von dieser Annahme sollten *D. discoideum* Zellen auf die Anwesenheit von extrachromosomaler DIRS-1 DNA hin untersucht werden. Zunächst wurde Gesamt-DNA unverdaut in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Detektion

von DIRS-1 Sequenzen wurde die OLB-Sonde DIRS-1 LTR fw/DIRS-1 LTR rev verwendet. Sowohl im Wildtyp als auch in den Argonauten KO-Stämmen wurde mit dieser Sonde die chromosomale DNA im oberen Bereich der Membran identifiziert. Darüber hinaus konnte sowohl in den Stämmen AgnA KO K11 und K17 als auch in dem Stamm AgnA/B KO K5 eine zusätzliche DNA-Spezies detektiert werden, die deutlich schneller im Gel migriert (vgl. Abb. 38A). In den beiden AgnA KO-Stämmen tritt diese zusätzliche Bande deutlich hervor, während sie in dem AgnA/B KO nur schwach detektierbar ist. Die DNA-Spezies, die nur im AgnA KO und AgnA/B KO detektierbar ist, migriert unter denaturierenden Bedingungen als scharfe Bande, die unter nativen Bedingungen breiter wird. Dies kann ein Indiz für mögliche Sekundärstrukturen der DNA sein könnte (vgl. Abb. 38B). In diesem und den folgenden Experimenten konnte weder bei den nativen noch bei den denaturierenden Analysen das Molekulargewicht der detektierten Banden genau angegeben werden. Unter nativen Bedingungen liegt offensichtlich ein Komplex zwischen größeren und kleineren DNA Fragmenten und eine unbekannte Sekundärstruktur vor (vgl. Abb. 38B).

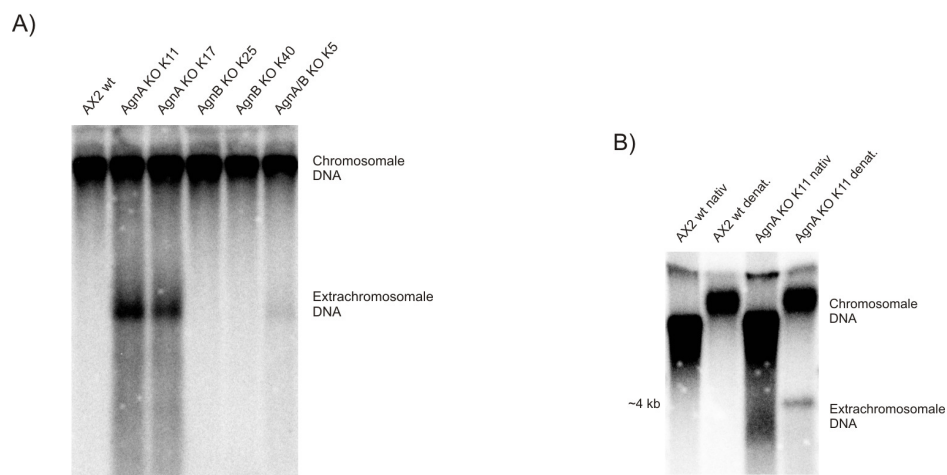


Abb. 38: Nachweis von extrachromosomaler DIRS-1 DNA in *D. discoideum*

Genomische DNA wurde mit Hilfe des GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit aus *D. discoideum* AX2 wt und verschiedenen KO-Stämmen aufgereinigt. Die isolierte DNA wurde in einem Agarosegel unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und danach durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen.

- A) Die Membran mit nativ aufgetrennter DNA wurde mit der OLB-Sonde DIRS-1 LTR fw/DIRS-1 LTR rev (#896/#897) hybridisiert (vgl. 12.2 Abb. 71).
- B) Genomische DNA aus AX2 wt und AgnA KO K11 wurde unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Membran wurde mit einer OLB-Sonden Mischung bestehend aus DIRS-1 LTR fw/DIRS-1 LTR rev (#896/#897) und MJD83/MJD84 (#1927/#1928) hybridisiert (vgl. 12.2 Abb. 71).

Im Gegensatz dazu ist unter denaturierenden Bedingungen der Vergleich der größtenteils einzelsträngigen DNA mit einem dsDNA Marker, der unter nativen Bedingungen im Gel aufgetrennt wurde, nicht angemessen. Der Marker dient deshalb lediglich zur groben Orientierung und zur Abschätzung von Größenordnungen (vgl. Abb. 39).

Um die zusätzliche Bande anzureichern, wurde eine alternative Aufreinigungsmethode durchgeführt, mit dem Ziel, chromosomale DNA abzureichern. Hierfür wurde das Fermentas GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit genutzt, durch dessen Verwendung die chromosomale DNA nahezu vollständig abgetrennt werden konnte (Daten nicht gezeigt; vgl. Abb. 40). Die extrachromosomale DNA kann mit dieser Methode weiterhin aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt; vgl. Abb. 40) und wurde anschließend für weiteren Analysen verwendet.

Zur weiteren Analyse der extrachromosomalen DIRS-1 Spezies wurde die DNA aus den AgnA KO-Stämmen mit unterschiedlichen substratspezifischen Nukleasen behandelt. DNaseI verdaut, wie auch die Micrococcus Nuklease, endonukleolytisch einzelsträngige sowie doppelsträngige DNA, wobei letztere eine höhere Spezifität für einzelsträngige Nukleinsäuren aufweist (Pelham und Jackson, 1976). Die S1 Nuklease hat eine hohe Spezifität für einzelsträngige Nukleinsäuren (Vogt, 1973). Nach der Behandlung mit den Nukleasen wurde ein *Southern Blot* durchgeführt. Zur Detektion der extrachromosomalen DNA wurde eine Mischung aus OLB-Sonden verwendet, die Teile des DIRS-1 ORF II und der rechten LTR erkennen. Es zeigte sich, dass die extrachromosomale DNA anfällig für den Verdau durch alle verwendeten Nukleasen ist (vgl. Abb. 39). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die extrachromosomale DIRS-1 DNA einzelsträngige Bereiche enthält.

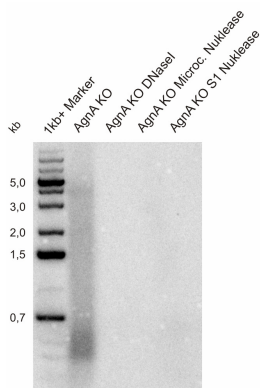


Abb. 39: Verdau der extrachromosomalen DIRS-1 DNA mit unterschiedlichen Nukleasen

Extrachromosomale DNA wurde mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit aus *D. discoideum* AgnA KO K11 isoliert. Die isolierte DNA wurde mit verschiedenen Nukleasen (DNaseI, Micrococcus Nuklease und S1 Nuklease) für 30 min verdaut. Sie wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel aufgetrennt und im Anschluss durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit der OLB-Sonden Mischung bestehend aus DIRS-1 LTR fw/DIRS-1 LTR rev (#896/#897) und MJD83/MJD84 (#1927/#1928) hybridisiert (vgl. 12.2 Abb. 71). Größenabschätzung der einzelsträngigen DNA Fragmente erfolgte mit einem dsDNA Marker.

Zur weiteren Analyse der extrachromosomalen DNA wurden *Southern Blots* mit strangspezifischen Sonden auf DNA aus AX2 wt und AgnA KO Stämmen durchgeführt. Im Folgenden wird jener Strang, der dem DIRS-1 *sense* Transkript entspricht, als Plus-Strang und der DIRS-1 cDNA Strang als Minus-Strang bezeichnet. Mit dem Oligonukleotid DIRS LTR fw (#896), das spezifisch die rechte LTR des Minus-Stranges erkennt, werden im AgnA KO mehrere Signale auf dem *Blot* detektiert (vgl. Abb. 40A). Unter denaturierenden Bedingungen können neben einem Schmier eine dominante größere Bande und drei kleinere Banden detektiert werden. Wird für die Detektion ein Oligonukleotid verwendet, welches im DIRS-1 ORF II auf dem Minus-Strang bindet, so werden nur die größere Bande

und der Schmier detektiert (vgl. Abb. 40B). Die drei kleineren Banden können mit der Sonde nicht nachgewiesen werden. Mit Oligonukleotiden, die spezifisch den Plus-Strang erkennen, konnten im AX2 wt und im AgnA KO keine Signale nachgewiesen werden (vgl. Abb. 40C-E). Im AX2 wt wurden insgesamt keine Banden von den Sonden detektiert.

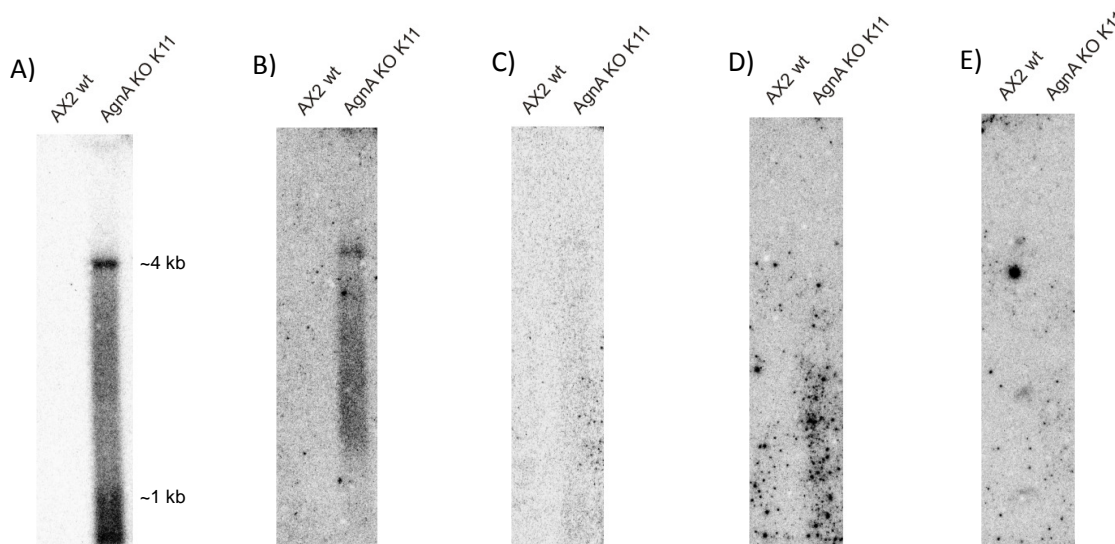


Abb. 40: Strangspezifischer Nachweis der extrachromosomalen DIRS-1 DNA

Extrachromosomale DNA wurde mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit aus *D. discoideum* AX2 wt und AgnA KO K11 isoliert. Die isolierte DNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel aufgetrennt und danach durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Für die Hybridisierung mit den unterschiedlichen Sonden wurde die gleiche Membran verwendet, wobei die Sonden nach jeder Hybridisierung wieder entfernt wurden. Größenabschätzung der einzelsträngigen DNA Fragmente erfolgte mit einem dsDNA Marker.

- A) Nachweis der extrachromosomalen DIRS-1 DNA vom Minus-Strang mit dem Oligonukleotid DIRS-1 LTR fw (#896) (vgl. 12.2 Abb. 72).
- B) Nachweis der extrachromosomalen DIRS-1 DNA vom Minus-Strang mit dem Oligonukleotid MJD83 (#1927) (vgl. 12.2 Abb. 72).
- C) Nachweis der extrachromosomalen DIRS-1 DNA vom Plus-Strang mit dem Oligonukleotid DIRS-1 LTR rev (#897) (vgl. 12.2 Abb. 73).
- D) Nachweis der extrachromosomalen DIRS-1 DNA vom Plus-Strang mit der Oligonukleotid Mischung BB141, BB145 und BB153 (#2916/#2920/#2928) (vgl. 12.2 Abb. 70).
- E) Nachweis der extrachromosomalen DIRS-1 DNA vom Plus-Strang mit der Oligonukleotid-Mischung BB143, BB147, BB149, BB151 und BB155 (#2918/#2922/#2924/#2926/#2930) (vgl. 12.2 Abb. 73).

Zur weiteren Charakterisierung der extrachromosomalen DIRS-1 Fragmente wurde DNA, die mit dem Fermentas GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit aus dem AX2 wt bzw. dem AgnA KO-Stamm isoliert wurde, in Zusammenarbeit mit Dr. Malte Bussiek mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops abgebildet. Die Proben wurden im *Tapping* Mode vermessen. In den Proben des AgnA KO wurden zwei Arten von Strukturen gefunden (vgl. Abb. 41A), die im AX2 wt kaum nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Zum einen wurden zirkuläre, Torus-ähnliche Strukturen mit einem Durchmesser von ~100 nm abgebildet (vgl. Abb. 41A schwarze Pfeile + Abb. 41B). Zum anderen konnten Partikel gefunden

werden, die eine Höhe von ~12-18 nm aufwiesen (Daten nicht gezeigt) und eine halbkugelförmige Struktur besaßen (vgl. Abb. 41A blaue Pfeile).

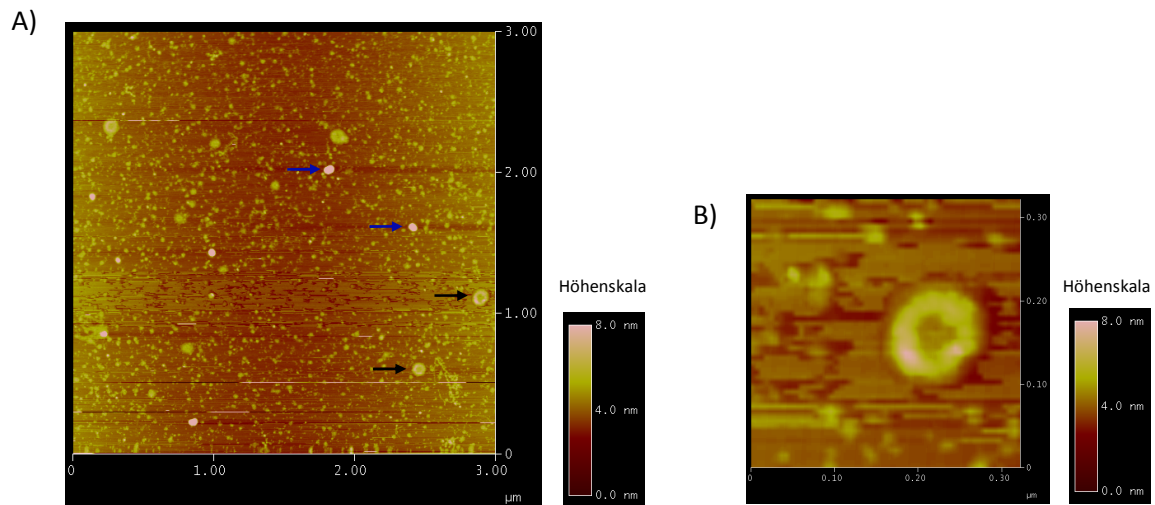


Abb. 41: Strukturen von extrachromosomaler DNA aus dem AgnA KO-Stamm

Extrachromosomale DNA wurde mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit aus *D. discoideum* AgnA KO K11 isoliert. Nach der Zugabe von $MgCl_2$ wurde die DNA auf Glimmer präpariert und mittels Rasterkraftmikroskops im *Tapping Mode* abgebildet.

- A) Rasterkraftmikroskopie eines $3 \times 3 \mu\text{m}$ großen Ausschnitts der Glimmeroberfläche mit extrachromosomaler DNA aus dem AgnA KO-Stamm. Schwarzer Pfeil = torusförmige Struktur; blauer Pfeil = halbkugelförmige Struktur.
- B) Ausschnittsvergrößerung des Bildes 41A. Gezeigt ist eine Torus-ähnliche Struktur, die einen Durchmesser von $10 \mu\text{m}$ besitzt.

In einem weiteren Ansatz wurden die isolierten Proben zunächst bei 60°C mit Proteinase K verdaut und im Anschluss mit Phenol/Chloroform extrahiert. Bei der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung der Proben konnten wieder die halbkugelförmigen Strukturen mit einer Höhe von 12-15 nm (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 42 blauer Pfeil). Die Torus-ähnlichen Strukturen wurden nicht wieder detektiert. Dagegen wurden Strukturen abgebildet, bei denen es sich um einzelsträngige DNA (vgl. Abb. 42A + B gelbe Pfeile) bzw. doppelsträngige DNA handeln könnte (vgl. Abb. 42A + B rote Pfeile). Bei den Strukturen könnte es sich um Virus-ähnliche Partikel (VLPs) handeln, die auch in *S. cerevisiae* von dem Retrotransposon Ty3 gefunden wurden (Kuznetsov et al., 2005). Um das abschließend zu belegen sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

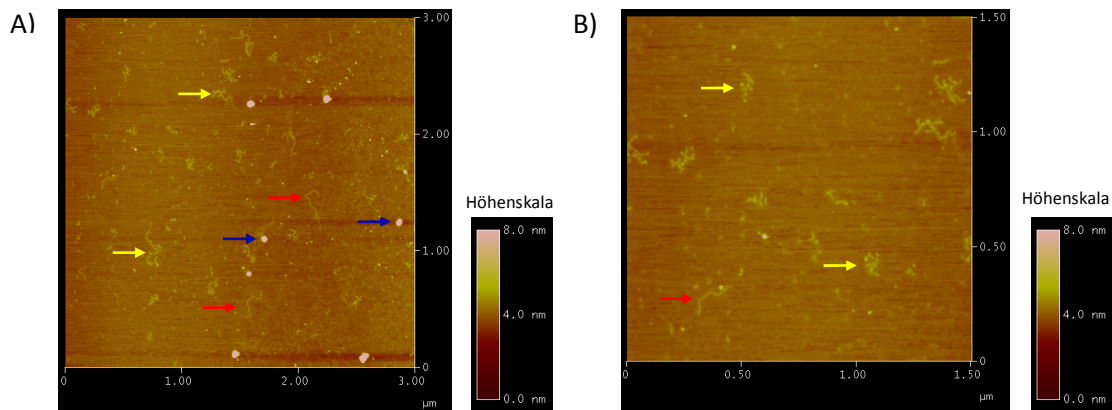


Abb. 42: Strukturen von extrachromosomaler DNA aus dem AgnA KO-Stamm

Extrachromosomale DNA wurde mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit aus *D. discoideum* AgnA KO K11 isoliert. Nach der Behandlung mit Proteinase K und der anschließenden Denaturierung bei 60 °C wurde die extrachromosomale DNA auf Glimmer präpariert und mittels Rasterkraftmikroskops im *Tapping Mode* abgebildet.

- A) Rasterkraftmikroskopie eines 3 x 3 μm großen Ausschnitts der Glimmeroberfläche mit extrachromosomaler DNA aus dem AgnA KO-Stamm. Blauer Pfeil = halbkugelförmige Struktur; roter Pfeil = doppelsträngige DNA; gelber Pfeil = einzelsträngige DNA.
- B) Ausschnittsvergrößerung des Bildes 42A. Die Breite und Strukturen lässt annehmen, dass es sich sowohl um einzelsträngige DNA (gelbe Pfeile) als auch um doppelsträngige DNA (roter Pfeil) handelt.

8.5 Micro RNAs in Argonauten KO-Stämmen

An der Regulation der Genexpression durch miRNAs sind in allen bisher identifizierten Signalwegen Homologe der Argonauten Familie beteiligt. In *D. discoideum* wurden die zwei putativen miRNAs mica1190 und mica1198 identifiziert (vgl. 4.7), deren Lokalisation und Menge im AgnA KO, im AgnB KO und im AgnA/B KO untersucht wurden. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Prozessierung dieser kleinen RNAs von DrnB abhängig ist. Darüber hinaus sind beide putativen miRNAs im RrpC KO-Stamm angereichert (Hinas et al., 2007).

8.5.1 Nachweis und Quantifizierung der miRNAs mica1190 und mica1198 in Argonauten KO-Stämmen

Zum Nachweis der miRNAs wurden *Northern Blots* für kleine RNAs mit totaler RNA aus den *D. discoideum* Stämmen AX2 wt, AgnA KO, AgnB KO und AgnA/B KO durchgeführt. Die Detektion der miRNAs mica1190 und mica1198 erfolgte mit den ³²P-markierten Oligonukleotiden ddi_mir_1176_rc (#2601) und ddi_mir_1177_rc (#2602). Mica1190 konnte in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden, wobei sie in den AgnA KOs und den AgnA/B KOs im Vergleich zum AX2 wt angereichert ist (vgl. Abb. 43). Die untersuchten AgnB KOs zeigten hingegen keine Anreicherung.

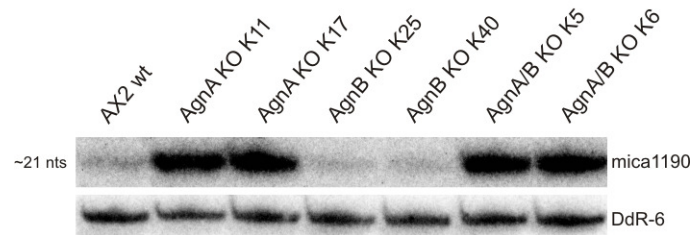


Abb. 43: Nachweis der miRNA mica1190 in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Northern Blot zur Detektion der mica1190 in verschiedenen Argonauten *Knockout*-Stämmen. Gesamt-RNA aus vegetativen Zellen des AX2 Wildtyps und verschiedener KO-Stämme wurden in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der miRNA erfolgte durch die Hybridisierung mit dem ^{32}P -markierten Oligonukleotid ddi-mir-1176_rc (#2601). Die Lademengen und Transfereffizienzen konnten durch Nachweis von DdR-6 (#2554) verglichen werden.

Zur relativen Quantifizierung der Anreicherung wurden mehrere unabhängige *Northern Blots* durchgeführt und die Signalstärke mit Hilfe der Software Multi Gauge quantifiziert. Die Signale für mica1190 wurden gegen die snoRNA 6 (DdR-6) quantifiziert (Aspegren et al., 2004) und relativ zum AX2 wt aufgetragen (vgl. Abb. 44). In den AgnA KO-Stämmen ist die Menge der mica1190 sechsfach erhöht im Vergleich zum AX2 wt. Die miRNA ist in den AgnA/B KOs nicht so stark angereichert wie in den AgnA KOs, aber sie liegt im Vergleich zum AX2 wt immer noch um das Vierfache erhöht vor (vgl. Abb. 44). In den AgnB KOs entspricht die Menge an mica1190 der des Wildtyps.

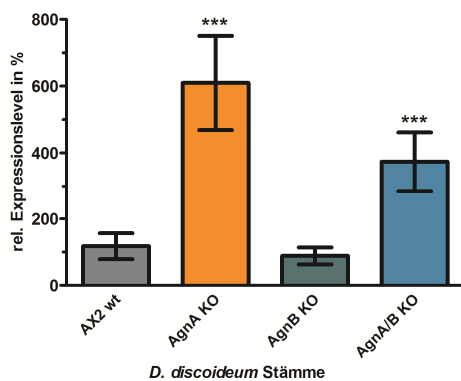


Abb. 44: Vergleich der relativen mica1190 Mengen in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Eine Quantifizierung der relativen Menge von mica1190 in den Argonauten KO-Stämmen und dem Wildtyp erfolgte durch *Northern Blots*. Die Detektion der miRNA erfolgte wie in Abb. 43 beschrieben mit Oligonukleotid ddi-mir-1176_rc (#2601). Die erhaltenen Signale wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 10. Fehlerbalken: mean with SD, gepaarter t-Test: $p = < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA KO), $p = 0,0721$ (ns) (AX2 wt/ AgnB KO), $p = < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA/B KO).

Mica1198 konnte ebenfalls mit *Northern Blots* im AX2 wt und in verschiedenen Argonauten KO-Stämmen nachgewiesen werden, wobei die Expression dieser miRNA im AX2 wt stärker ist als die der mica1190 (Hinas et al., 2007) (vgl. Abb. 43 + Abb. 45).

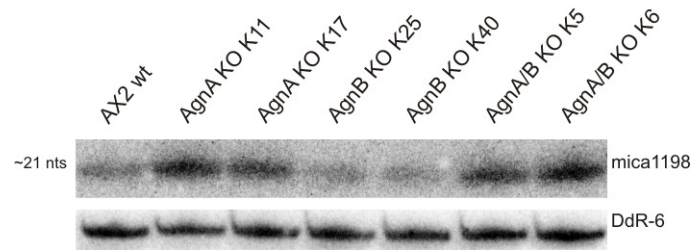


Abb. 45: Nachweis der miRNA mica1198 in verschiedenen *D. discoideum*-Stämmen

Northern Blot zum Nachweis der mica1198 in verschiedenen KO-Stämmen sowie AX2 wt. Die Detektion der mica1198 erfolgte wie in Abb. 43 beschrieben, wobei jedoch das ^{32}P -markierte Oligonukleotid ddi-mir-1177_rc (#2602) verwendet wurde. Die Lademengen und Transfereffizienzen konnten durch Nachweis von DdR-6 (#2554) verglichen werden.

Auch für die zweite miRNA konnte in den AgnA KO und in den AgnA/B KO-Stämmen eine Anreicherung festgestellt werden (vgl. Abb. 45). Die Anreicherung entspricht in etwa dem Zweieinhalbfachen im Vergleich zum AX2 wt (vgl. Abb. 46). In den AgnB KOs kommt es, wie bei der mica1190, zu keiner Anreicherung der mica1198 (vgl. Abb. 45 + Abb. 46). Die Anreicherung beider *D. discoideum* miRNAs korreliert mit dem *Knockout* des *agnA* Gens (vgl. 9.3).

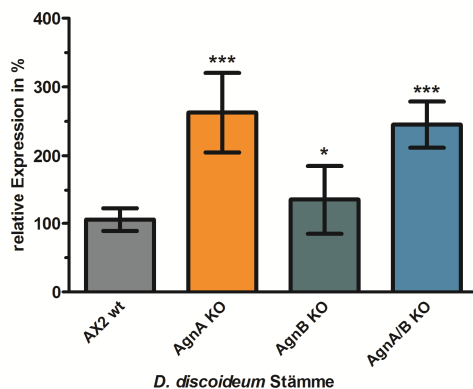


Abb. 46: Vergleich der relativen mica1198 Mengen in verschiedenen *D. discoideum*-Stämmen

Die Detektion der relativen Menge von mica1198 erfolgte wie zuvor in Abb. 44 beschrieben mittels *Northern Blot*. Die erhaltenen Signale wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 10. Fehlerbalken: mean with SD, gepaarter t-Test: $p < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA KO), $p = 0,0163$ (*) (AX2 wt/ AgnB KO), $p < 0,0001$ (***) (AX2 wt/ AgnA/B KO).

8.5.2 Lokalisation und Modifikation der *D. discoideum* miRNAs

Die Funktion der miRNAs und die genaue Wirkweise des miRNA Signalwegs ist in *D. discoideum* noch ungeklärt (Hinas et al., 2007). In den durchgeführten *Northern Blot* Analysen konnten nur die reifen miRNAs mica1190 und mica1198 nachgewiesen werden, ohne jedoch Signale von etwaigen Vorläufermolekülen, wie pri- oder pre-miRNA, zu erhalten, was mit zuvor beschriebenen Beobachtungen übereinstimmt (Hinas et al., 2007).

Um erste Rückschlüsse auf den Wirkungsort der miRNAs zu bekommen, sollte deren Lokalisation in *D. discoideum* Zellen untersucht werden. In den meisten untersuchten Organismen sind die reifen miRNAs im Cytoplasma lokalisiert (Carthew und Sontheimer, 2009). Für eine Analyse der Lokalisation

der beiden oben genannten miRNAs wurden die cytoplasmatische Fraktion und die Zellkerne voneinander getrennt, um anschließend die RNA aus jeder Fraktion gesondert isolieren zu können. Die Detektion der mica-RNAs erfolgte wie zuvor in Kapitel 8.5.1 beschrieben. Dabei zeigte sich, dass mica1190 sowie mica1198 nahezu vollständig im Cytoplasma von *D. discoideum* vorliegen und nur geringe Mengen dieser RNA-Spezies im Nukleus vorhanden sind (vgl. Abb. 47). Trotz der Anreicherung der miRNAs in den AgnA KO weist dieser Stamm keine abweichende Verteilung im Vergleich zum Wildtyp auf (vgl. Abb. 47).

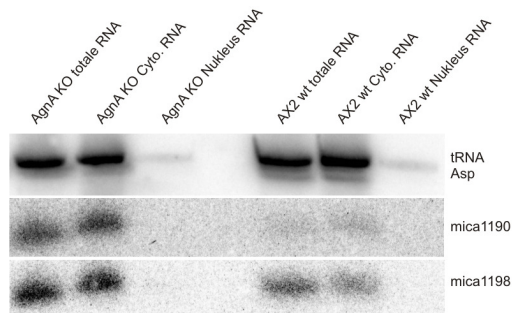


Abb. 47: Lokalisation der miRNAs in der Zelle

Für die Untersuchung der miRNA Lokalisation in *D. discoideum* Zellen wurde RNA separat aus Cytoplasma und dem Nukleus isoliert. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus ganzen Zellen verwendet. Der Nachweis von mica1190 und mica1198 erfolgte wie zuvor in Abb. 43 und Abb. 45 beschrieben. Zum Nachweis der erfolgreichen Trennung von Cytoplasma und Nuklei wurde zudem die tRNA Asp mit Oligonukleotid SM5_tRNAAsp_mid (#2263) detektiert.

In vielen Organismen, wie z.B. in *D. melanogaster* und in *A. thaliana*, werden die reifen miRNAs durch HEN1 oder deren Homologe am 3'-Ende methyliert, um sie vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen (Yang et al., 2006). Obwohl die *in silico* Suche nach einem HEN1 Homolog in *D. discoideum* keine Treffer ergab, sollten die miRNAs nichtsdestotrotz auf eine mögliche 2'-O Methylierung des 3'-Endes hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde auf die β -Eliminierung mit Periodat zurückgegriffen, bei der die 3'-terminale Base angegriffen und bei der Reaktion zerstört wird. Dadurch laufen die Nukleinsäuren schneller in einer elektrophoretischen Auftrennung. Tragen die miRNAs eine 3'-terminale 2'-O Methylgruppe, dann sind sie vor der β -Eliminierung geschützt (Hutvagner et al., 2001) und zeigen ein unverändertes Migrationsverhalten in der Gelelektrophorese. Die β -Eliminierung wurde mit RNA aus AX2 wt, AgnA KO K11 und AgnA KO K17 durchgeführt. Die behandelten Proben zeigten weitgehend ein schnelleres Laufverhalten als die Negativkontrollen, was ein Indiz dafür ist, dass das 3'-Nukleotid sensitiv für die β -Eliminierungsreaktion war. Daher ist davon auszugehen, dass die miRNAs keine 2'-O Methylgruppe am 3'-Ende tragen (vgl. Abb. 48).

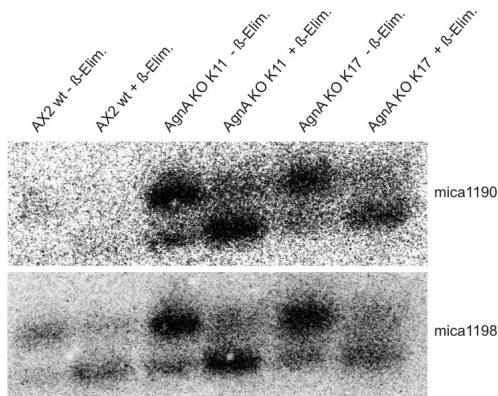


Abb. 48: Untersuchung einer möglichen 3'-terminalen Methylierung der miRNAs mica1190 und mica1198

Für die β -Eliminierung wurde Gesamt-RNA aus den zwei AgnA KO-Stämmen K11 und K17 sowie dem AX2 wt Stamm verwendet. Die unbehandelte (- β -Elim.) und behandelte RNA (+ β -Elim.) wurde in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gebロットet. Der Nachweis der miRNAs erfolgte mit den 32 P-markierten Oligonukleotiden ddi_mir_1176_rc (#2601) bzw. ddi_mir_1177_rc (#2602).

8.5.3 Stabilisierung der miRNAs durch ektopische Expression von Argonauten Proteinen

In Untersuchungen an menschlichen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass durch die ektopische Expression von Argonauten Proteinen die Stabilität von miRNAs gesteigert wird. Die Argonauten Proteine binden die miRNAs und schützen sie so vor dem Abbau (Winter und Diederichs, 2011).

Die bisherigen Ergebnisse zeigten zwar eine Anreicherung von miRNAs im AgnA KO-Stamm, dennoch sollte untersucht werden, ob eine Überexpression der beiden Argonauten eine weitere Anreicherung bewirken kann.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die Überexpression von AgnA- und AgnB-Fusionsproteinen im Wildtyp Hintergrund von *D. discoideum* ein ähnliches Phänomen beobachtet werden kann. Für die Generierung von GFP- und HA-markierten Proteinen wurden Vektoren der pDneo2a-Serie verwendet (Dubin et al., 2010). Die Stärke der Expression variiert in Abhängigkeit der Position des *Tags*. Bei der N-terminalen Fusion von GFP bzw. HA werden die rekombinanten Proteine, wie oben beschrieben, drei-fünffach stärker exprimiert als bei der C-terminalen Fusion (Daten nicht gezeigt). Ein Vergleich mit der endogenen Proteinexpression ist aus Ermangelung eines funktionierenden scFvs (vgl. 8.3.1) bzw. Antikörper nicht möglich.

Zunächst wurde aus Stämmen, die GFP Fusionsproteine von AgnA und AgnB exprimieren, RNA isoliert und für *Northern Blots* verwendet, um das Expressionslevel der miRNAs zu untersuchen. In den Stämmen, die GFP-AgnA und GFP-AgnB exprimieren, kam es zu einer deutlichen Anreicherung von mica1190 (vgl. Abb. 49A) und mica1198 (vgl. Abb. 50A) im Vergleich zum Wildtyp und dem AX2 GFP Stamm. Die Anreicherung ist stärker als die, die in den AgnA KO und in den AgnA/B KO-Stämmen beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Expression der C-terminalen Fusionen (AgnA-GFP und AgnB-GFP) die Menge der untersuchten miRNAs nicht.

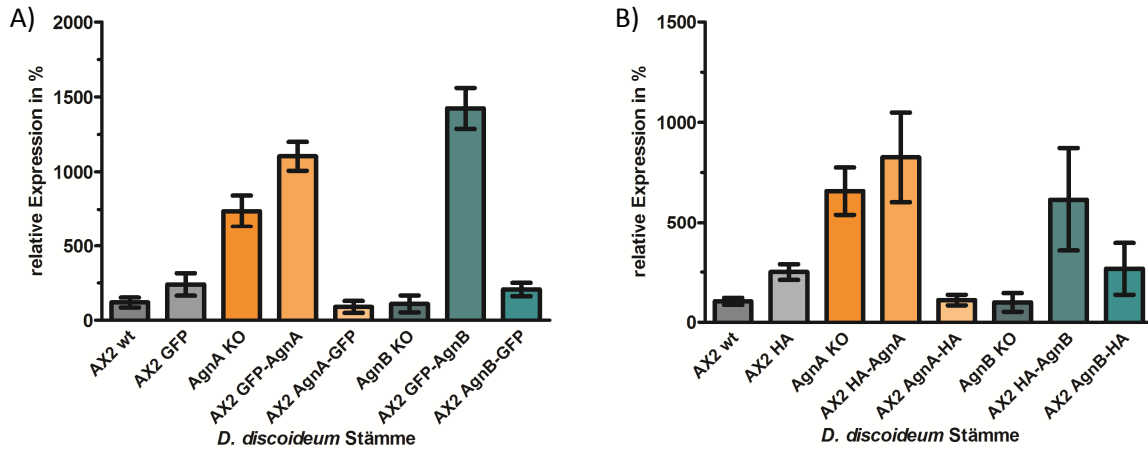


Abb. 49: Quantifizierung der Menge von mica1190 in verschiedenen Argonauten Überexpressionsstämmen

Relative Quantifizierung der Menge von mica1190 in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Northern Blots*. Die Signale für mica1190 wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. Fehlerbalken: *mean with SD*.

- A) Relative Quantifizierung der Menge von mica1190 in *D. discoideum* Stämmen, die GFP-markierte Argonauten Proteine überexprimieren. Es wurden sowohl N- als auch C-terminale Fusionsproteine im *D. discoideum* AX2 wt Hintergrund exprimiert. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm verwendet, der nur GFP überexprimiert. N = 4.
- B) Relative Quantifizierung der Menge von mica1190 in *D. discoideum* Stämmen, die HA-markierte Argonauten Proteine überexprimieren. Es wurden sowohl N- als auch C-terminale Fusionsproteine im *D. discoideum* AX2 wt Hintergrund exprimiert. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm verwendet, der nur HA überexprimiert. N = 4.

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde das Experiment mit HA-markierten Argonauten Proteinen wiederholt. Auch in den Stämmen, die HA-AgnA- und HA-AgnB Fusionsproteine überexprimieren, zeigte sich eine starke Anreicherung von mica1190 (vgl. Abb. 49B) und von mica1198 (vgl. Abb. 50B). Werden hingegen die Argonauten Proteine mit einem C-terminalen HA-Tag im Wildtyphintergrund exprimiert, entspricht das miRNA Level auch, wie bei den GFP-Fusionen, dem von AX2 wt (vgl. Abb. 49B + Abb. 50B).

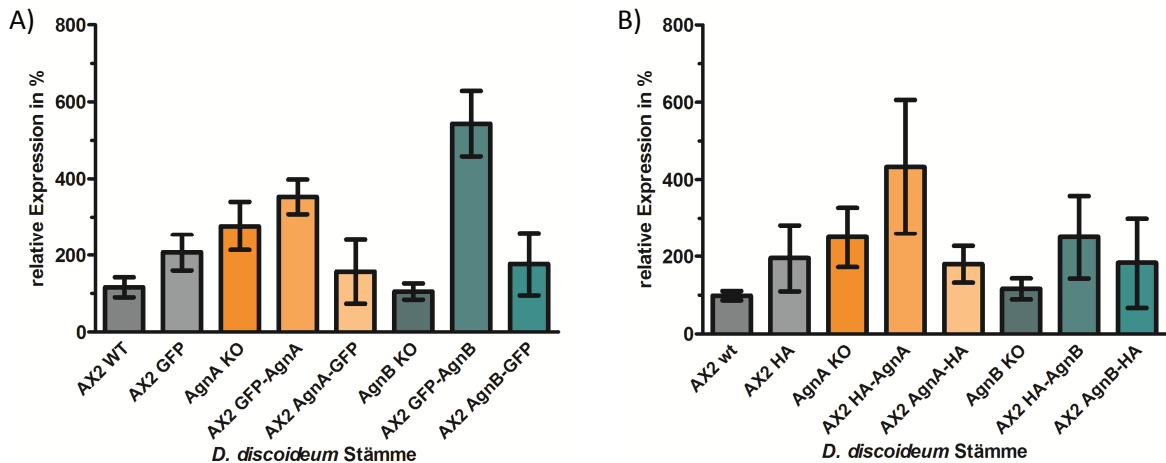


Abb. 50: Bestimmung der Menge von mica1198 in verschiedenen Argonauten Überexpressionsstämmen

Relative Quantifizierung der Menge von mica1198 in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Northern Blots*. Die Signale für mica1198 wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. Fehlerbalken: mean with SD.

- A) Quantifizierung der Menge von mica1198 in *D. discoideum* Stämmen, die GFP-markierte Argonauten Proteine überexprimieren. Es wurden sowohl N- als auch C-terminale Fusionsproteine im *D. discoideum* AX2 wt Hintergrund exprimiert. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm verwendet, der nur GFP überexprimiert. N = 4.
- B) Quantifizierung der Menge von mica1198 in *D. discoideum* Stämmen, die HA-markierte Argonauten Proteine überexprimieren. Es wurden sowohl N- als auch C-terminale Fusionsproteine im *D. discoideum* AX2 wt Hintergrund exprimiert. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm verwendet, der nur HA überexprimiert. N = 4.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Überexpression von Argonauten Proteinen mit N-terminalem Tag eine Anreicherung der miRNAs zur Folge hat. Auch wenn sich die relativen Werte zwischen HA- und GFP-Fusionsproteinen unterscheiden, so ist die Tendenz die gleiche (vgl. Abb. 51 + Abb. 52).

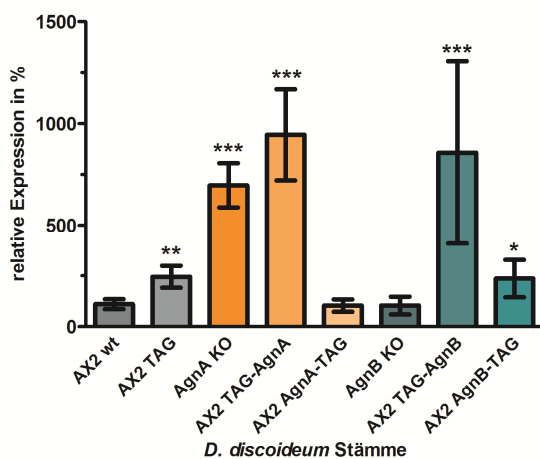


Abb. 51: Menge von mica1190 in verschiedenen Argonauten Überexpressionsstämmen

Relative Quantifizierung der Menge von mica1190 in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Northern Blots*. Die Signale für mica1190 wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. Fehlerbalken: mean with SD.

Zusammenfassung der Werte aus Abb. 49A und Abb. 49B. „TAG“ zeigt die Position des Protein-Tag (N- oder C-terminal) an. N = 8. gepaarter t-Test: p = 0,0051 (**) (AX2 wt/AX2 TAG), p = < 0,0001 (***) (AX2 wt/AgnA KO), p = < 0,0001 (***) (AX2 wt/AX2 TAG-AgnA), p = 0,0005 (***) (AX2 wt/AX2 TAG-AgnB), p = 0,0430 (*) (AX2 wt/AX2 AgnB-TAG).

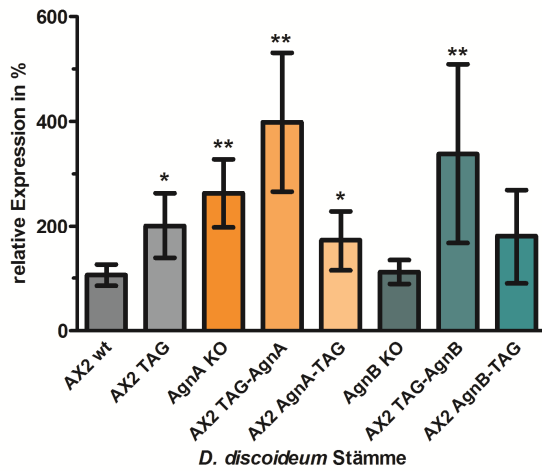


Abb. 52: Menge von mica1198 in verschiedenen Argonauten Überexpressionsstämmen

Relative Quantifizierung der Menge von mica1198 in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Northern Blots*. Die Signale für mica1198 wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. Fehlerbalken: *mean with SD*.

Zusammenfassung der Werte aus Abb. 50A und Abb. 50B. „TAG“ zeigt die Position des Protein-Tag (N- oder C-terminal) an. N = 8. gepaarter t-Test: p = 0,0305 (*) (AX2 wt/AX2 TAG), p = 0,0046 (**) (AX2 wt/AgnA KO), p = 0,0015 (**) (AX2 wt/AX2 TAG-AgnA), p = 0,0430 (*) (AX2 wt/AX2 AgnA-TAG), p = 0,0015 (**) (AX2 wt/AX2 TAG-AgnB).

8.5.4 Rescues von AgnA KO Phänotypen

Mit der Generierung von *Rescue* Stämmen sollte die Frage beantwortet werden, ob rekombinante Argonauten Proteine, die im *Knockout*-Hintergrund überexprimiert werden, die Funktionen des endogenen Proteins kompensieren können. Dazu wurden mehrere AgnA KO Einzelklone mit dem Vektor pDneo2a-AgnA-HA, der für das AgnA Protein mit C-terminaler HA-Markierung kodiert, transformiert. Es wurde ein C-terminales Fusionsprotein verwendet, da die Expression dieses die Menge der miRNAs im Wildtyp Hintergrund kaum beeinflusst (vgl. Abb. 49B + Abb. 50B + Abb. 53). Im Fall der N-terminal markierten Fusionsproteinen kommt es, wie oben beschrieben, zu einer starken Anreicherung beider miRNAs (vgl. Abb. 49B + Abb. 50B). Daher wurde auf die Verwendung von Fusionsproteinen mit N-terminaler Markierung zur Wiederherstellung der endogene Argonauten Funktion verzichtet (vgl. Diskussion 9.3). Nach der Subklonierung erfolgte die Analyse der erhaltenen Klone. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde zunächst mit Hilfe eines *Western Blots* und dem anschließenden immunologischen Nachweis des HA-Tags kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde das Expressionslevel der miRNAs und der DIRS-1 siRNAs in den putativen *Rescue* Stämmen untersucht.

Die nachgewiesene Anreicherung von mica1190 und mica1198 im AgnA KO konnte in den putativen *Rescue* Stämmen wieder auf das Wildtypellevel reduziert werden (vgl. Abb. 53). Allerdings nimmt die Menge an DIRS-1 siRNAs, die im AgnA KO um ca. 95 % angereichert sind, in den analysierten Stämmen nur leicht zu und erreicht bei weitem nicht das AX2 wt Level (vgl. Abb. 53). Es sind lediglich 10 % der Wildtyp DIRS-1 siRNAs detektierbar. Bei den generierten Stämmen handelt es sich somit um partielle *Rescues*, was möglicherweise auf die Präsenz des Tags oder auf die hohe Expressionsstärke zurückgeführt werden könnte (vgl. Diskussion 9.3).

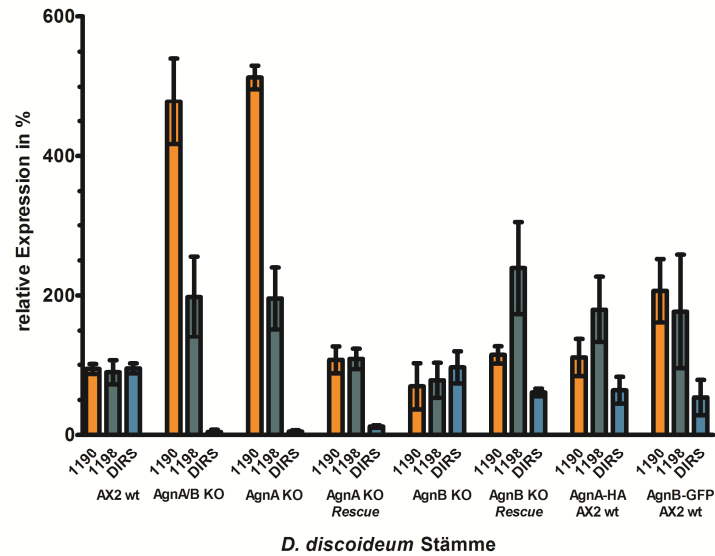


Abb. 53: Vergleich der Menge von miRNAs und DIRS siRNAs in AgnA und AgnB Rescue Stämmen

Quantifizierung der relativen Menge der miRNAs mica1190 und mica1198 sowie der DIRS-1 siRNAs in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Northern Blots*. Die Detektion der Sequenzen erfolgte mit den ^{32}P -markierten Oligonukleotiden ddi-mir-1176_rc (#2601), ddi-mir-1177_rc (#2602) und DIRS-1 *small* RNA (#2599). Die erhaltenen Signale wurden gegen DdR-6 (#2554) referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 4. Fehlerbalken: *mean with SD*.

8.6 Identifizierung von Interaktionspartnern der Argonauten Proteine

Bei der Prozessierung von kleinen RNAs und während der Regulierung von Ziel-RNAs interagieren Argonauten Proteine mit verschiedenen weiteren Proteinen, wie zum Beispiel dem Exosom oder GW182 (vgl. 4.5). Zur Identifikation solcher Interaktionspartner in *D. discoideum* wurden *Pull-Down* Experimente mit GFP-markierten Argonauten Proteinen durchgeführt und die aufgereinigten Proteine massenspektrometrisch analysiert (vgl. Abb. 54).

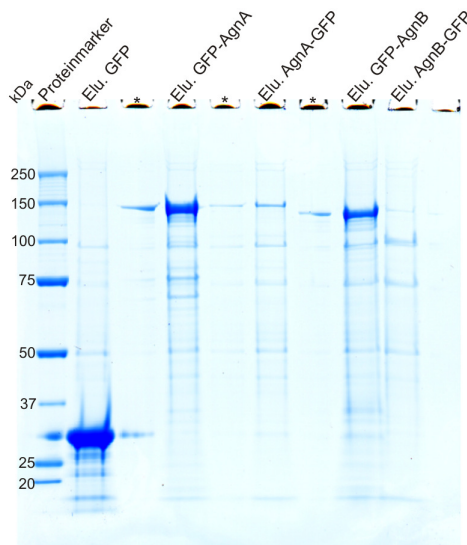


Abb. 54: Identifizierung potentieller Interaktionspartner von GFP-markierten AgnA und AgnB

Nach der *in vivo* Quervernetzung mit dem chemischen *Crosslinker* DTBP erfolgte die Proteinaufreinigung von GFP-markierten AgnA und AgnB Proteinen mittels Nanotrap. Die Auftrennung der eluierten Proteine erfolgte in einer 4-12%igen SDS-PAGE. Die markierten Spuren wurden komplett gestanzt, um die darin enthaltenen Proteine mit Trypsin zu verdauen und anschließend die entstandenen Peptide massenspektrometrisch zu identifizieren. * = Proben bei Probenauftrag übergelaufen. Elu. = Elutionsfraktion

Für die *Pull-Down* Experimente wurden Stämme verwendet, die die Proteine AgnA und AgnB als N- bzw. als C-terminale GFP Fusion überexprimieren. Zur Kontrolle wurde das Experiment außerdem mit dem Stamm AX2 GFP durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde vor der Aufreinigung mit Hilfe der GFP Nanotrap (Chromotek) der chemische *Crosslinker* Dimethyldithiobispropionimidat (DTBP) eingesetzt. Die Proteinproben wurden tryptisch verdaut und auf dem Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL der Firma Thermo Scientific in der Abteilung *Bioanalytical Mass Spectrometry* von Prof. Dr. H. Urlaub am MPI für biophysikalische Chemie (Göttingen) analysiert. Bei der Auswertung wurden neben den *Bait*-Proteinen weitere zusätzliche Proteine gefunden, die in Tab. 20 und Tab. 21 aufgeführt sind. Bei den AgnA *Pull-Downs* weisen die Proteine DDB_G0268914 und DDB_G0269138 eine hohe Abdeckung und die meisten gemessenen Peptide auf (vgl. Tab. 20). Bei der Aufreinigung mit AgnB-GFP konnten die Proteine DetA und RepE mit hoher Abdeckung und den meisten gemessenen Peptiden identifiziert werden (vgl. Tab. 21).

Tab. 20: Auswertung der massenspektrometrischen Analyse putativer Interaktionspartner von AgnA

Nach der *in vivo* Quervernetzung mit chemischem Crosslinker DTBP erfolgte die Proteinaufreinigung von GFP-markiertem AgnA mittels Nanotrap. Die eluierten Proteine wurden in einer 4-12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend tryptisch verdaut, um die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch zu identifizieren. In der Tabelle sind die Proteine aufgeführt, für die mindestens drei einzigartige Peptide (mit 95 %) identifiziert wurden und die nicht in der Negativkontrolle AX2 GFP und bei GFP-AgnB bzw. AgnB-GFP auftauchten.

Protein	Genebank Accession Number	Molekulargewicht kDa	GFP-AgnA	AgnA-GFP
Green fluorescent protein	gi 55724863	27	293	101
AgnA	gi 66819117	111	749	223
Hypo. protein DDB_G0268914 (Similar to <i>D. discoideum</i> adenylyl cyclase)	gi 66827407	520	38	4
Hypo. Protein DDB_G0269138 (FttB)	gi 111218960	29	4	3
S60 Ribosomal protein L27	gi 66824623	16	4	-
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	gi 66809283	21	-	3
Cysteine desulfurase, mito. precursor	gi 66815513	50	-	3
Cell division cycle protein 48	gi 66806375	89	3	-
Tyrosine-tRNA ligase	gi 66818755	44	-	3
Glutamate-ammonia ligase	gi 66815105	83	3	-
Hypo. protein DDB_G0285591 (carboxymethylenebutenolidase homolog)	gi 66808843	29	3	-
Hypo. protein DDB_G0275519	gi 66819923	34	-	3

Tab. 21: Auswertung der massenspektrometrischen Analyse putativer Interaktionspartner von AgnB

Nach der *in vivo* Quervernetzung mit chemischem Crosslinker DTBP erfolgte die Proteinaufreinigung von GFP-markiertem AgnB mittels Nanotrap. Die eluierten Proteine wurden in einer 4-12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend tryptisch verdaut, um die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch zu identifizieren. In der Tabelle sind die Proteine aufgeführt, für die mindestens drei einzigartige Peptide (mit 95 %) identifiziert wurden und die nicht in der Negativkontrolle AX2 GFP und bei GFP-AgnA bzw. AgnA-GFP auftauchten.

Protein	Genebank Accession Number	Molekulargewicht kDa	GFP-AgnB	AgnB-GFP
Green fluorescent protein	gi 55724863	27	245	165
AgnB	gi 66803755	104	487	47
DetA	gi 66818539	169	-	73
RepE	gi 1399512	128	-	28
Heat shock protein Hsp70 family protein	gi 66809009	57	7	-
Hypo. protein DDB_G0268848 (putative ATP binding protein)	gi 66827319	308	9	-
Methylmalonate-semialdehyde dehydrog.	gi 66805325	57	-	3
Hypo. protein DDB_G0271848 (Porin3)	gi 66824163	30	4	5
Hypo. protein DDB_G0281913 (contains a Von Willebrand factor type A domain)	gi 111226564	57	6	-
Counting factor associated protein (<i>cfaD</i>)	gi 66812702	59	3	3

Dihydrolipoamide acetyltransferase	gi 458426	64	-	3
Tetratricopeptide-like helical domain-containing protein	gi 66808361	75	7	-
Myb domain-containing protein (DNAJ heat shock N-terminal domain-containing)	gi 66816347	73	3	6
Heat shock protein Ddj1	gi 3859851	46	3	-
Prolyl-tRNA synthetase	gi 66809829	62	3	3
GTP-binding nuclear protein Ran (ranA)	gi 66802506	24	3	-
RNaseL inhibitor-like protein	gi 66803577	67	-	5
Acyl-CoA oxidase	gi 166240322	75	10	-
Malate dehydrogenase	gi 66801181	38	-	4
Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	gi 66809487	34	-	3
Citrate synthase, mitochondrial	gi 66820508	51	-	3
Pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit	gi 66800847	42	3	3
SNO Glutamine amidotransferase family protein	gi 66806155	28	4	-
Phospholipid-binding protein	gi 66822059	59	-	3
Hypo. protein DDB_G0291970 (cofB)	gi 66801703	15	-	4
40S Ribosomal protein S23	gi 66823621	16	4	-
Hypo. protein DDB_G0287851	gi 66806755	112	-	5
p34-cdc2 Protein (Cell division control protein 2 homolog CDK1)	gi 66823249	34	3	-
40S Ribosomal protein S15a	gi 66818863	15	3	-
Mito. processing peptidase beta subunit	gi 111226358	53	-	3
Oxysterol binding family protein, member 8	gi 66810540	46	-	4
RabB	gi 304604	24	-	4
2-Oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit	gi 66806367	114	-	4
40S Ribosomal protein S12	gi 66809885	15	3	-
Serine racemase	gi 66804961	35	-	3
Amine oxidase (Putative sarcosine oxidase)	gi 66802512	121	-	4
Rab2	gi 414967	22	5	-
Hypo. protein DDB_G0287587 (Small aggregate formation protein)	gi 66806787	33	3	-
Hypo. protein DDB_G0277993	gi 66816087	59	4	-
Hypo. protein DDB_G0272765	gi 66823197	190	6	-
Hypo. protein DDB_G0270618	gi 66825699	52	5	-
RNA-binding region RNP-1 domain-containing protein (Polyadenylate-binding protein 1-B)	gi 111226286	91	5	-
SH2 domain-containing protein (Dual specificity protein kinase shkB)	gi 66805827	74	4	-

Zur Verifizierung der in der ersten Aufreinigung erhaltenen putativen Interaktionspartner wurde der Protein *Pull-Down* mit einem alternativen Protokoll wiederholt. Für die Quervernetzung der Proteine wurde anstatt eines chemischen *Crosslinkers* UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm eingesetzt (vgl. Abb. 55). Zusätzlich wurden stringenter Waschbedingungen während der Aufreinigung

verwendet, um unspezifische Proteininteraktionen zu vermeiden. Die in diesem *Pull-Down* identifizierten Proteine sind für AgnA und AgnB in Tab. 22 aufgeführt.

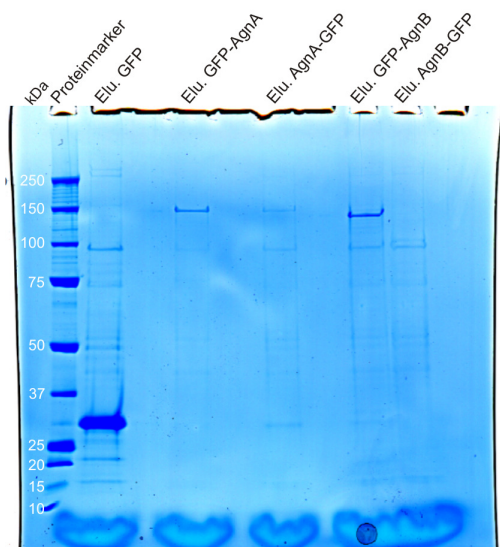


Abb. 55: Aufreinigung von GFP-markierten Argonauten Proteinen zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner

Nach der *in vivo* Quervernetzung mit UV 256 nm erfolgte die Proteinaufreinigung von GFP-markiertem AgnA und AgnB mittels Nanotrap nach stringenter Waschprotokoll. Die Auftrennung der eluierten Proteine erfolgte in einer 4-12%igen SDS-PAGE. Die markierten Spuren wurden komplett gestanzt, um die darin enthaltenen Proteine mit Trypsin zu verdauen und anschließend die entstandenen Peptide massenspektrometrisch zu identifizieren.

Für AgnA konnten keine der im ersten *Pull-Down* gefundenen Proteine erneut identifiziert werden. Es wurden vor allem ribosomale Proteine nachgewiesen, die bei der ersten Aufreinigung kaum vorhanden waren (vgl. Tab. 22). Die Schnittmenge an putativen Interaktionspartner aus beiden Aufreinigungen im Fall von AgnB ist relativ gering. Neben einigen ribosomalen Proteinen konnten die Proteine DetA und RepE erneut in der Elutionsfraktion von AgnB-GFP identifiziert werden (vgl. Tab. 22).

Tab. 22: Auswertung der massenspektrometrischen Analyse putativer Interaktionspartner von GFP-markierten AgnA- und AgnB-Stämmen

Nach der *in vivo* Quervernetzung mit UV 256 nm erfolgte die Proteinaufreinigung von GFP-markiertem AgnA und AgnB mittels Nanotrap nach stringenter Waschprotokoll. Die eluierten Proteine wurden in einer 4-12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend tryptisch verdaut, um die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch zu identifizieren. In der Tabelle sind die Proteine aufgeführt, für die mindestens zwei einzigartige Peptide (mit 95 %) identifiziert wurden und die nicht in der Negativkontrolle AX2 GFP auftauchten.

Protein	Genebank Accession Number	Molekulargewicht kDa	GFP-AgnA	AgnA-GFP	GFP-AgnB	AgnB-GFP
Green fluorescent protein	gi 55724863	27	117	49	177	173
AgnA	gi 66819117	111	477	298	25	-
AgnB	gi 66803755	104	-	4	604	5
DetA	gi 66818539	169	-	-	-	94
Discoidin I Chain A	gi 292659503	28	-	24	15	-
60S Ribosomal protein L8	gi 66821423	28	3	8	12	6
40S Ribosomal protein S6	gi 66813638	26	-	3	13	3

Ribosomal protein S2	gi 66800083	29	-	3	15	-
Glutamate-ammonia ligase	gi 66815105	83	-	2	9	5
S60 Ribosomal protein L35a	gi 66826879	12	-	-	4	4
Glucosamine-6-phosphate isomerase	gi 66828881	31	3	5	4	4
Phosphoglucomutase A	gi 66805963	63	2	4	2	3
Propionyl-CoA carboxylase	gi 66819037	61	2	-	3	4
Discoidin li chain A	gi 193506579	29	-	5	-	3
S60 Ribosomal protein L15	gi 66823419	24	-	-	7	-
Hypo. protein DDB_G0280877 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase)	gi 66813560	81	-	9	-	-
Hypo. protein DDB_G0287013 (Proline iminopeptidase)	gi 66807437	39	-	2	2	-
RNaseL inhibitor-like protein	gi 66803577	67	-	-	-	4
TIM beta/alpha-barrel domain- containing protein	gi 268637472	84	-	-	3	-
Hypo. protein DDB_G0290473	gi 66803843	77	-	-	7	-
Short-chain dehydrog./reductase family protein	gi 66812052	29	-	-	-	4
S60 Ribosomal protein L10a	gi 66818615	24	-	-	3	-
Hypo. protein DDB_G0275611 (Meth.- tRNA synthetase β -subunit)	gi 66819575	51	-	-	2	2
Unknown (similar to CeIA)	gi 2081633	127	-	3	-	-
26S Proteasome regulat. subunit S14	gi 66821987	30	-	-	-	2
Short-chain dehydrogen./reductase family protein	gi 66803633	32	-	3	-	-
Mito. substrate carrier family protein	gi 66799991	33	-	-	2	-
Hypo. protein DDB_G0283871	gi 66810299	30	-	-	2	-
Hypo. protein DDB_G0286959	gi 66807537	66	-	-	-	2
Hypo. protein DDB_G0276681	gi 66818739	88	-	-	3	-
RepE	gi 1399512	128	-	-	-	3

8.7 Deep Sequencing Analyse vom AX2 wt und dem AgnA KO-Stamm

Um potentielle regulatorische RNAs zu identifizieren, an deren Regulation AgnA beteiligt ist, wurden kleine RNAs (20–50 nts) aus AX2 wt und dem AgnA KO sequenziert. Die RNAs wurden mit dem Kit NucleoSpin® miRNA der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt und mittels *Illumina*®-Technologie in der Arbeitsgruppe RNA Biologie von Prof. Dr. J. Vogel am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg sequenziert. Die Zuordnung der identifizierten Sequenzen und die Normalisierung der Daten wurde von Dr. Konrad Förstner durchgeführt. Die Auswertung der Daten

erfolgte mit dem Programm *Integrated Genome Browser* (Nicol et al., 2009), wobei der Wildtypstamm AX2 mit AgnA KO verglichen wurde. Für die Auswertung wurden Sequenzen ausgewählt, deren Anzahl der normalisierten *Reads* deutlich, d.h. mindestens mit Faktor 3 voneinander abwichen.

8.7.1 Nachweis von Retrotransposons, miRNAs und Class 1 RNAs im AgnA KO-Stamm

Mit Hilfe von *Deep Sequencing* Analysen konnte nachgewiesen werden, dass der Großteil der kleinen RNAs (~21 nts) in *D. discoideum* AX2 wt von dem Retrotransposon DIRS-1 abstammt (Hinas et al., 2007). Bei den durchgeführten *Deep Sequencing* Analysen konnten kurze RNA-Fragmente, die ihren Ursprung in DIRS-1 Sequenzen besitzen, als Hauptspezies der kleinen RNAs in *D. discoideum* bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In dem AgnA KO sind die kleinen DIRS-1 RNAs im Vergleich zum AX2 wt deutlich abgereichert, teilweise um Faktor 50.

Tab. 23: Relative Menge von mica1190 und mica1198 in der *Deep Sequencing* Analyse

miRNA	Häufigkeit der Sequenzen im AX2 wt (normalisiert)	Häufigkeit der Sequenzen im AgnA KO (normalisiert)
mica1190	15	1000
mica1198	3	33

Bei der weiteren Auswertung der *Deep Sequencing* Daten konnten die miRNAs mica1190 und mica1198 ebenfalls in beiden untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Im Vergleich zum AX2 wt ist im AgnA KO mica1190 mehr als 60fach und mica1198 ungefähr zehnfach angereichert (vgl. Tab. 23). Weiterhin konnte eine Anreicherung der Sequenzen der Class 1a RNA r60 um Faktor 6 und der Class 1b RNA r35 um Faktor 10 im AgnA KO festgestellt werden (vgl. Abb. 56) (Aspegren et al., 2004; Avesson et al., 2011). Die U5-snRNA (DdR39A) lag um den Faktor 10 angereichert im AgnA KO vor (vgl. Abb. 56).

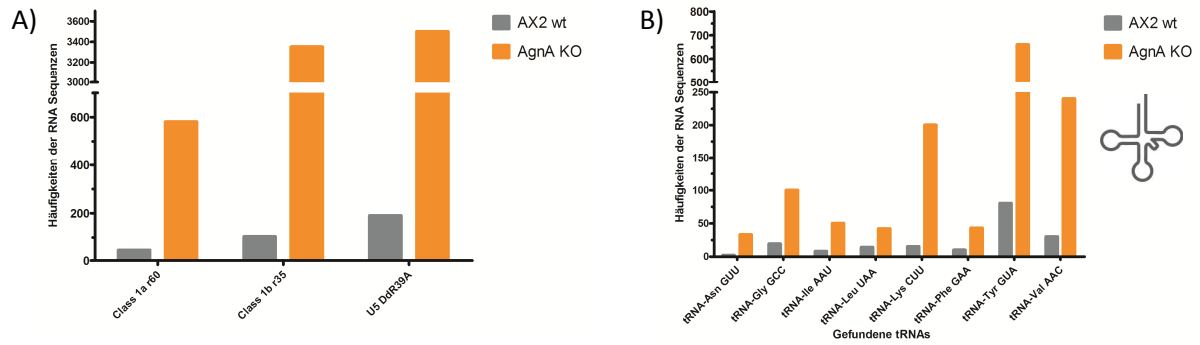


Abb. 56: Vergleich der Deep Sequencing Analysen von AX2 wt und AgnA KO I

Nach dem Alignment der ermittelten Sequenzen erfolgte die Normalisierung der Sequenzen in Bezug auf die absolute Anzahl an erhaltenen Sequenzen durch Dr. Konrad Förstner, Uni Würzburg. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm *Integrated Genome Browser* ausgewertet. Es wurden dabei An- bzw. Abreicherung > Faktor 3 berücksichtigt und die normalisierten Werte in den Diagrammen aufgetragen.

- A) Diagramm mit den Anreicherungen der Class 1a r60, Class 1b r35 und der U5 (DdR39A) im AgnA KO.
 B) Angereicherte Volllänge tRNAs in den sequenzierten Stämmen AX2 wt und AgnA KO.

Zur Bestätigung der *Deep Sequencing* Ergebnisse wurde die Expression ausgesuchter RNA-Spezies mittels *Northern Blots* untersucht. Die Abreicherung der DIRS-1 siRNAs konnte in dem AgnA KO und dem AgnA/B KO für *sense* und *antisense* RNAs mit Oligonukleotiden und strangspezifischen *in vitro* Transkripten bereits gezeigt werden (vgl. 8.4.2 und Abb. 57).

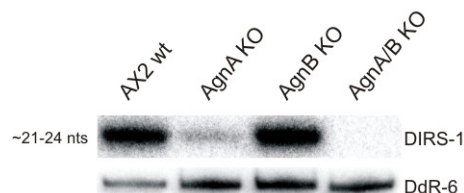


Abb. 57: Bestätigung der Expression von DIRS-1 siRNAs aus der Deep Sequencing Analyse

Totale RNA wurde aus verschiedenen KO-Stämmen und AX2 wt isoliert. Nach der Auftrennung in einem 11%igen PAA-Gel wurde die RNA elektrophoretisch auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die Membran mit den ^{32}P -markierten Oligonukleotiden BB179 (#2954) hybridisiert, um die in *Deep Sequencing* Analysen ermittelte Abreicherung dieser RNA-Spezies zu überprüfen. Die Lademenge und die Transfereffizienz wurde durch den Nachweis von DdR-6 mit Oligonukleotid DDSno6 (#2554) kontrolliert (vgl. 12.2 Abb. 74).

Die Anreicherung der miRNAs mica1190 und mica1198 konnte mittels *Northern Blots* in den AgnA KOs und den AgnA/B KOs bestätigt werden (vgl. 8.5.1). Unterschiede ergeben sich in der Höhe der Anreicherung. Bei der *Deep Sequencing* Analyse konnte für mica1190 eine 66fache Anreicherung gemessen werden, wohingegen mittels *Northern Blot* nur eine sechsfache Anreicherung detektiert wurde. Für mica1198 wurde im *Northern Blot* eine zweieinhalbfache Anreicherung der miRNA im AgnA KO im Vergleich zum AX2 wt gemessen, der eine zehnfache Anreicherung in der *Deep Sequencing* Analyse gegenüber steht (vgl. 8.5.1).

Die durch die Sequenzierung erwartete Anreicherung der Class 1a RNA r60 und der Class 1b RNA r35 in den AgnA KOs konnte bei der Quantifizierung durch *Northern Blots* nicht bestätigt werden, da die relative Menge dieser RNA-Spezies der des Wildtyps entspricht (Daten nicht gezeigt). Die Anreicherung der U5-snRNA DdR39A wurde nicht untersucht.

8.7.2 Nachweis von tRNAs und tRNA-Fragmenten im AgnA KO-Stamm

Bei *High Throughput* Sequenzierung von RNAs aus Mäuse Oocyten wurden, neben siRNAs und piRNAs, Fragmente von tRNAs entdeckt (Babiarz et al., 2008). In den *Deep Sequencing* Analysen von AX2 wt und AgnA KO wurden ebenfalls tRNAs und tRNA Fragmenten gefunden, deren Mengen in den untersuchten Stämmen stark variierten. Im AgnA KO lagen unter anderen die tRNAs Lys CUU, Tyr GUA und Val AAC um mind. 400 % angereichert vor (vgl. Abb. 56). Zusätzlich konnte auch eine Anreicherung von tRNA Fragmenten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 58A + B). Die stärkste Akkumulierung zeigte dabei ein Fragment der tRNA Asp GUC und ein Fragment der tRNA Leu AAG. Beide sind ~35 nts lang und stammen vom 5'-Ende der tRNAs ab (vgl. Abb. 58A + Tab. 24).

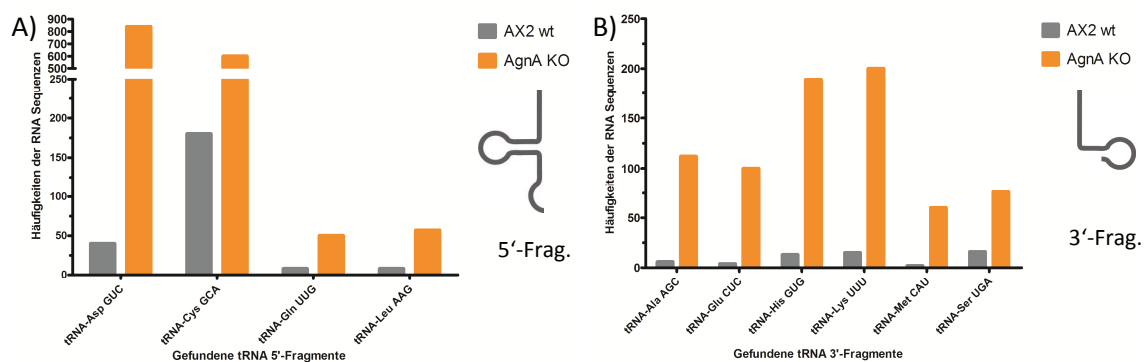


Abb. 58: Vergleich der *Deep Sequencing* Analysen von AX2 wt und AgnA KO II

Nach dem Alignment der ermittelten Sequenzen erfolgte die Normalisierung der Sequenzen in Bezug auf die absolute Anzahl an erhaltenen Sequenzen durch Dr. Konrad Förstner, Uni Würzburg. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm *Integrated Genome Browser* ausgewertet. Es wurden dabei An- bzw. Abreicherungen > Faktor 3 berücksichtigt und die normalisierten Werte in den Diagrammen aufgetragen. Frag. = Fragment.

- A) Gefundene 5'-tRNA Fragmente, die zumeist im AgnA KO-Stamm angereichert vorlagen.
- B) Häufigkeiten der 3'-tRNA Fragmente, die zumeist im AgnA KO-Stamm angereichert vorlagen.

Die 3'-Fragmente der tRNAs können in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden, die sich in ihrer Größe unterscheiden. Es wurden für die tRNAs Ala AGC, His GUG und Met CAU 3'-Fragmente mit einer Länge von ~20 nts identifiziert, die im AgnA KO angereichert vorliegen. Zu der zweiten Gruppe von 3'-tRNA Fragmenten gehören die Stücke von tRNA Lys UUU, Glu CUC und Ser UGA, die eine Länge von ~30-40 nts aufweisen (vgl. Abb. 58B + Tab. 24).

Tab. 24: Gefundene tRNA Fragmente in den *Deep Sequencing* Analysen

tRNA	5'-Fragmente		3'-Fragmente	
	Länge in nts	Position	Länge in nts	Position
Ala AGC			19	54-73
Asp GUC	35	1-35		
Cys GCA	53	1-53		
Gln UUG	20	1-20		
Glu CUC			40	32-72
His GUG			19	52-71
Leu AAG	34	1-34		
Lys UUU			29	44-73
Met CAU			20	53-73
Ser UGA			40	42-82

Im Fall der angereicherten tRNAs wurde lediglich tRNA Val und im Fall der tRNA Fragmente, die von tRNA Asp im *Northern Blot* untersucht. Die Anreicherung der tRNA Val konnte im *Northern Blot* nicht bestätigt werden, da die Signalstärke der des Wildtyps entspricht (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse der Menge an tRNA Asp Fragmenten konnten viele spezifische Abbau- oder Prozessierungsprodukte der tRNA detektiert werden (vgl. Abb. 59). In den AgnA KO-Stämmen ist eine zusätzliche Bande nachweisbar, die eine Größe von ~34-36 nts besitzt und im AX2 wt kaum nachzuweisen ist. Diese Bande entspricht vermutlich dem Fragment, das bei der *Deep Sequencing* Analysen angereichert im AgnA KO gefunden wurde.

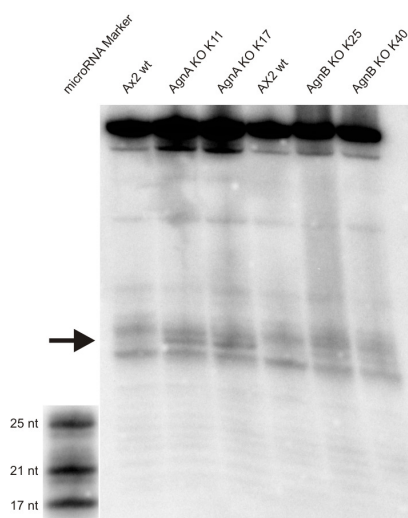


Abb. 59: Nachweis eines zusätzlichen tRNA Asp Fragments in AgnA KO-Stämmen

Totale RNA aus AX2 wt und verschiedenen KO-Stämmen wurde in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis der tRNA Asp erfolgte mit dem Oligonukleotid SM5_tRNAAsp_mid (#2263). Zur Größenabschätzung wurde der microRNA Marker (NEB) aufgetragen. Die zusätzliche Bande in den AgnA KO-Stämmen ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

8.7.3 Nachweis von intergenischen Bereichen und RNAs aus Introns

In den *Deep Sequencing* Analysen wurden noch weitere RNAs gefunden, die in dem AgnA KO zumeist angereichert vorlagen. Es handelte sich dabei um intergenische Bereiche, Teile von Introns und kurze Stücke von ORFs, die in Tab. 25 aufgeführt sind:

Tab. 25: RNAs von intergenischen Bereichen und RNAs aus Introns

Nr.*	Chr.	Position auf dem Chr.#	Position auf dem Chr.#	Länge#	Beschreibung
1A	1	22961	23034	73	Teil eines Pseudogens
1B	1	141695	141767	72	keine Annotation
1C	1	157900	157973	73	keine Annotation
1D	1	1883131	1883226	95	DDB_G0268662 DNA2/NAM7 Helicase Teil des Exons
1E	1	4913296	4913362	66	Intron des Gens DDB0241004
4A	4	1706374	1706395	21	Intron des DDB0247588
4B	4	4667110	4667160	50	Intron des DDB0218844
5A	5	4800274	4800344	60	Teil des Contigs DDB232784
5B	5	4871887	4871908	21	Teil des Contigs DDB232785
6A	6	3669	3690	21	Teil des Gens DDB0251096
6B	6	1618393	1618413	20	Teil des Introns von DDB0251727
6C	6	1618423	1618446	23	Teil des Introns von DDB0251727
6D	6	2022190	2022262	72	Teil des Contigs DDB0232858
6E	6	3208935	3208954	19	Teil des Gens DDB0252359; Sequenz liegt im Intron
6F	6	3209046	3209065	19	Teil des Gens DDB0252359; Sequenz liegt im Intron
6G	6	3278472	3278495	23	liegt in der 3'-UTR des Gens rps2

* Nummerierung der gefundenen Position auf dem jeweiligen Chromosom. Chr. = Chromosom.

Reale Längen der Fragmente können um wenige Nukleotide von den angegebenen Längen abweichen.

Für die Untersuchung der gefundenen RNA Sequenzen von intergenischen Bereichen, Introns und Teilen von ORFs wurden *Northern Blots* auf bestimmt Genorte durchgeführt, wobei RNA aus den Stämmen AX2 wt, AgnA KO, AgnB KO und AgnA/B KO Verwendung fand.

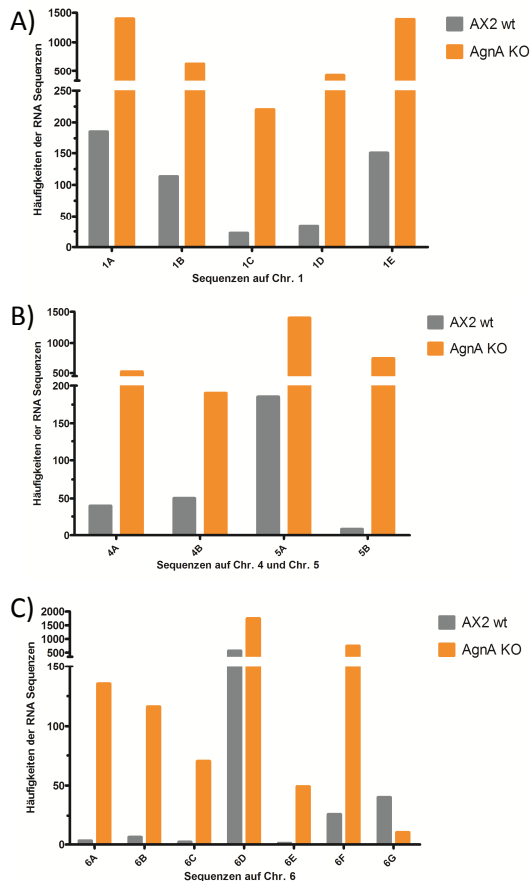


Abb. 60: RNAs von intergenischen Bereichen und RNAs von Introns

Nach dem Alignment der ermittelten Sequenzen erfolgte die Normalisierung der Sequenzen in Bezug auf die absolute Anzahl an erhaltenen Sequenzen durch Dr. Konrad Förstner, Uni Würzburg. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm *Integrated Genome Browser* ausgewertet. Es wurden dabei An- bzw. Abreicherungen > Faktor 3 berücksichtigt und die normalisierten Werte in den Diagrammen aufgetragen.

- A) Gefundene Sequenzen auf Chromosom 1, die zumeist im AgnA KO-Stamm angereichert vorlagen.
- B) Gefundene Sequenzen auf Chromosom 4 und 5, die zumeist im AgnA KO-Stamm angereichert vorlagen.
- C) Gefundene Sequenzen auf Chromosom 6, die zu meist im AgnA KO-Stamm angereichert vorlagen.

Im Fall der Sequenz des Contigs DDB232785 (vgl. Tab. 25 5B) auf Chromosom 5, konnte eine ~21-24 nts lange RNA spezifisch angereichert im AgnA KO nachgewiesen werden. Ein Hybridisierungssignal wurde nur mit dem Oligonukleotid, welches den Plus-Strang detektiert, erhalten (Daten nicht gezeigt). Für die Sequenz 6F auf Chromosom 6 (vgl. Tab. 25) konnte ebenfalls eine ~21-24 nts lange RNA spezifisch im AgnA KO detektiert werden, die auch vom Plus-Strang stammt (vgl. Abb. 61A). Die Hybridisierung mit einem zum Minus-Strang komplementären Oligonukleotid ergab kein spezifisches Signal (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der RNA des Contigs DDB232784 (5A) auf Chromosom 5 (vgl. Tab. 25 5A) ergab eine Doppelbande zwischen 70 und 100 nts. Die Menge der detektierten RNAs entsprach der des AX2 wt und die Anreicherung der RNA in der *Deep Sequencing* Analyse konnte experimentell nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Für die Sequenz des Introns des Gens DDB0241004 (1E) konnte eine ~70 nts lange RNA in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Die Menge dieser RNA entsprach bei allen Stämmen mehr oder weniger der des AX2 wt. Zusätzlich konnte im AX2 wt und dem AgnB KO ein Schmier im Bereich von 20-30 nts detektiert werden, der in dem AgnA KO und AgnA/B KO nicht vorhanden war (vgl. Abb. 61B).

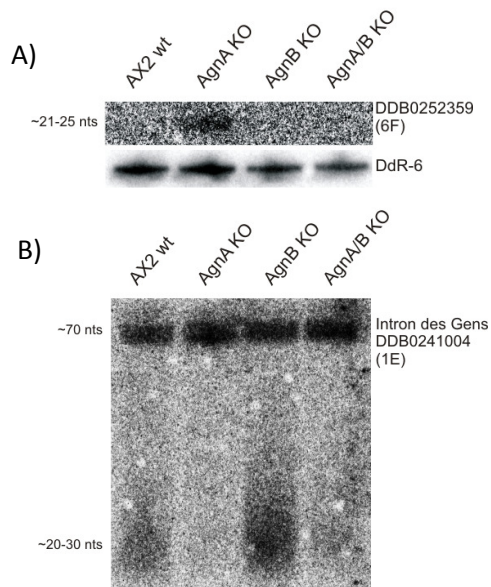


Abb. 61: Untersuchung von RNA von intergenischen Bereichen und Introns

Totale RNA wurde aus verschiedenen *Knockout*-Stämmen und AX2 wt isoliert. Nach der Auftrennung in einem 11%igen PAA-Gel wurde die RNA elektrophoretisch auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die Membran mit den ^{32}P -markierten Oligonukleotiden A: BB175 (#2950) (6F) und B: BB167 (#2942) (1E) hybridisiert, um die in den *Deep Sequencing* Analysen ermittelte Anreicherung dieser RNA-Spezies zu überprüfen. Die Lademenge und die Transfereffizienz wurde durch den Nachweis von DdR-6 mit Oligonukleotid Ddsno6 (#2554) kontrolliert.

8.8 Test eines RNAi Reportersystems in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Zur Analyse von möglichen RNAi Deletionsmutanten werden in verschiedenen Modellorganismen Reportersysteme eingesetzt, um so die Funktionen der ausgeschalteten Proteine in dem zugrunde liegenden Mechanismus näher zu charakterisieren (Zhuang und Liu, 2006; Liu et al., 2009). Dazu werden häufig Konstrukte in die Zelle eingebracht, die über eine *Hairpin*-RNA und deren Prozessierungsprodukte exogene bzw. endogene Gene mit Hilfe des RNAi Mechanismus regulieren sollen.

Zum Test von möglichen RNAi Komponenten in *D. discoideum* hat Stehan Wiegend (Abt. Ribogenetics, TU Darmstadt) ein System entwickelt, bei dem ein endogenes Gen als Reporter genutzt wird. Für das System wurden Teile des *cadA* Gens so in den Vektor pDM304 kloniert, dass es zur Expression der benötigten *Hairpin*-RNA kommt. Diese RNA bildet das Substrat, aus dem siRNAs generiert werden, die wiederum die postranskriptionelle Stilllegung des *cadA* Gens vermitteln. Das *cadA* Gen kodiert für das Protein *Calcium-dependent cell adhesion molecule-1* (CadA). Es wurde deshalb als Ziel-Gen für das Reportersystem ausgewählt, weil das Protein für *D. discoideum* nicht essentiell ist. Der Deletionsstamm von CadA zeigt lediglich einen schwachen Entwicklungsphänotyp, bei dem eine verzögerte Kulmination und eine verringerte Sporulation zu beobachten ist. In vegetativ wachsenden Zellen können keine Phänotypen nachgewiesen werden (Wong et al., 2002). Da das Reportersystem nur in vegetativ wachsenden Zellen angewendet werden soll, ist davon auszugehen, dass die Entwicklungsphänotypen und ihre Folgen keinen größeren Einfluss auf die Wirkweise des System haben.

Die *Hairpin*-RNA enthält ungefähr 80 % des 830 bp langen Gens und bildet nach der Transkription einen doppelsträngigen Bereich von ca. 500 bp aus (Wiegand, 2012). Der Vektor pDM304 cad hp II, der die entsprechende *Hairpin*-RNA kodiert, wurde in den AX2 wt und die Stämme AgnA KO, AgnB KO, AgnA/B KO und Xrn1 KO (Moog, 2012) transformiert. Der Xrn1 KO-Stamm wurde ausgewählt, da es sich bei dem ausgeschalteten Xrn1 in *D. discoideum* um eine putative 5'-3' Exonuklease handelt, die an der Degradation von mRNAs beteiligt sein könnte. Diese Funktion konnte für das Homolog aus *D. melanogaster* nachgewiesen werden (Jinek et al., 2011). Darüber hinaus wurde der Leervektor pDM304 in den AX2 wt transformiert, um auszuschließen, dass die alleinige Transformation des Vektors bereits die CadA Expression beeinflusst. Anschließend wurde in den unterschiedlichen Stämmen das mRNA- und Proteinlevel des *cadA* Reportergens untersucht. Außerdem wurden die *cadA* siRNAs quantifiziert. Pro Stamm wurden jeweils zwei Einzelklone transformiert und die erhaltenen Werte zusammengefasst, um biologische Varianzen zu mitteln.

CadA wurde in den verschiedenen Stämmen mit Hilfe von *Western Blots* und durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers (Sriskanthadevan et al., 2009) detektiert. Anschließend wurde die CadA Proteinmenge von transformierten und untransformierten Stämmen miteinander verglichen. Die Referenzierung erfolgte mit dem Nachweis des Proteins CoroninA (CorA), welches ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 62). Für die Auswertung der *Western Blots* wurden die Banden für CadA und CorA mit der Software ImageJ vermessen und vergleichend in einem Diagramm aufgetragen (vgl. Abb. 65A).

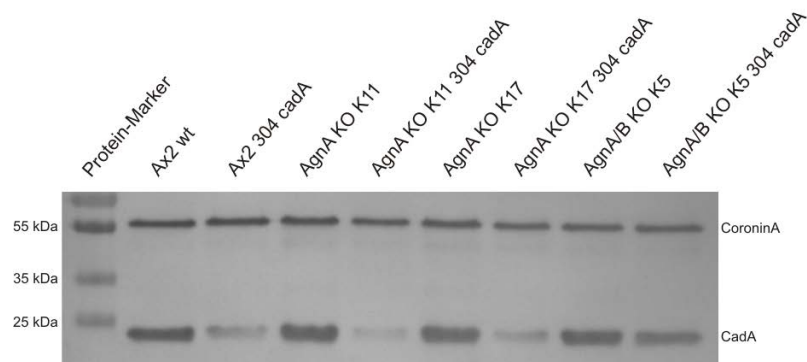


Abb. 62: Nachweis der Reduktion von CadA durch das CadA Reportersystem

Die Expression des CadA Proteins nach der Transformation der Zellen mit dem Vektor pDM304 cad hp II sollte mittels *Western Blot* und anschließendem immunologischen Nachweis erfolgen. Proteinproben aus verschiedenen *D. discoideum* Stämmen wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des CadA Proteins erfolgte mit einem spezifischen CadA Antikörper. Gleiche Lademengen und Transfereffizienzen konnten durch Nachweis von CorA mit einem spezifischen Antikörper überprüft werden.

Die Auswertung der Proteinmengen ergab, dass die Transformation des Leervektors pDM304 zu keiner Veränderung der CadA Proteinmenge führt. Im Gegensatz dazu ist die CadA Menge bei der Transformation mit dem Vektor pDM304 cad hp II im AX2 wt durchschnittlich um 70 % reduziert. Auch in den Einzel-KOs von AgnA und AgnB (Daten nicht gezeigt) ist die Proteinmenge im Durchschnitt um über 60 % verringert. Im Xrn1 KO-Stamm (Daten nicht gezeigt) und im AgnA/B KO-Stamm konnte eine Derepression von CadA nachgewiesen werden. So ist im Xrn1 KO-Stamm lediglich eine Reduktion des Reporterproteins von 50 % feststellbar, während sie im AgnA/B KO-Stamm mit 35 % noch geringer ausfiel (vgl. Abb. 62 + Abb. 65A). Die Derepression der CadA Proteinmenge ist jedoch nur beim transformierten AgnA/B KO Stamm im Vergleich zum AX2 304 cadA Stamm statistisch signifikant (**) (vgl. Abb. 65A).

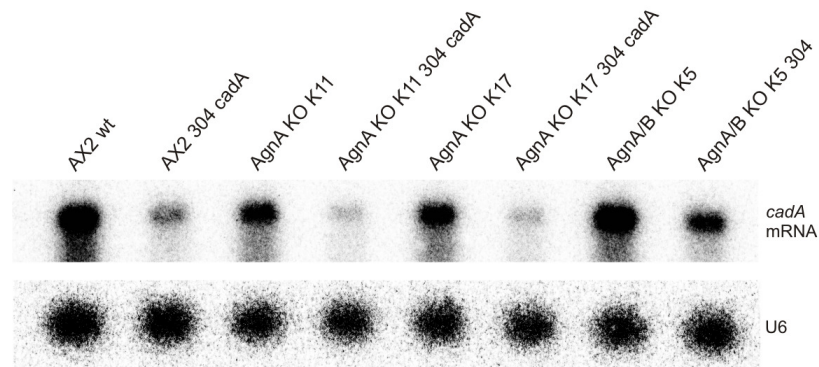


Abb. 63: Nachweis der Reduktion der *cadA* mRNA durch das CadA Reportersystem

Agarose Northern Blot zum Nachweis von *cadA* mRNA in verschiedenen KO-Stämmen und dem AX2 wt. Gesamt-RNA wurde in einem 1,6%igen GTC-Agarose Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Transkripte erfolgte durch das ^{32}P -markierte Oligonukleotid SW101. Die Lademenge und die Transfereffizienz wurden durch den Nachweis von U6 RNA kontrolliert.

Um zu überprüfen, inwieweit die *cadA* mRNA Angriffspunkt der Genregulation durch den RNAi Mechanismus in den untersuchten Stämmen ist, wurde das mRNA Level durch Northern Blots untersucht. Zur Detektion wurde das Oligonukleotid SW101 eingesetzt. Die Referenzierung der Blots erfolgt gegen die U6 RNA (vgl. Abb. 63). Mit Hilfe der Software Multi Gauge wurden die Signale anschließend ausgewertet und relativ zu dem untransformierten AX2 wt in dem Graph aufgetragen (vgl. Abb. 65B). Die *cadA* mRNA Mengen variierten stärker als die Werte der CadA Proteinmenge. Im AX2 wt Stamm mit dem transformierten Vektor pDM304 *cadA* hp II ist die Menge der mRNA um 70 % reduziert. Gleiches gilt auch für die AgnA KO- und AgnB KO-Stämme (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu kann die mRNA im Xrn1 KO (Daten nicht gezeigt) und im AgnA/B KO nur um ungefähr 35 % reduziert werden (vgl. Abb. 65B). Die geringer ausgeprägte Reduzierung der *cadA* mRNA ist nur beim AgnA/B KO 304 *cadA* im Vergleich zu dem AX2 304 *cadA* statistisch signifikant (*).

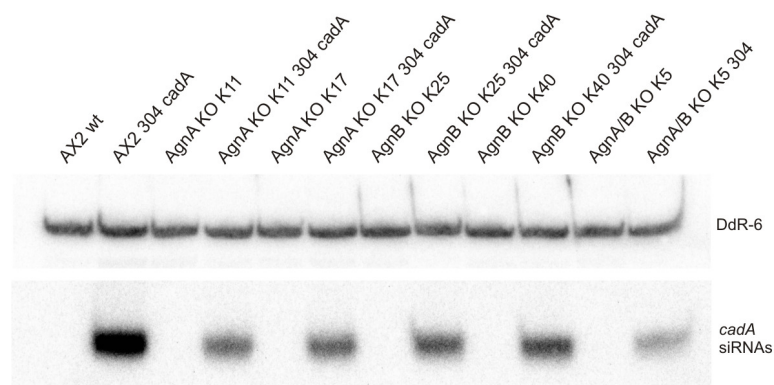


Abb. 64: Nachweis von *cadA* siRNAs in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Zum Nachweis der *cadA* siRNAs in den transformierten *D. discoideum* Stämmen wurde Gesamt-RNA isoliert und in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt. Im Anschluss wurde die RNA auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis der *cadA* siRNA erfolgte mit der ^{32}P -markierten OLB-Sonde SW116/SW117 (Wiegand, 2012). Gleiche Lademengen und Transfereffizienzen konnten durch Nachweis von DdR-6 (#2554) überprüft werden.

Abschließend erfolgte die Quantifizierung der *cadA* siRNAs, die ihren Ursprung in dem *Hairpin*-Bereich des transformierten Konstrukts haben. In *D. discoideum* Stämmen, die nicht mit dem

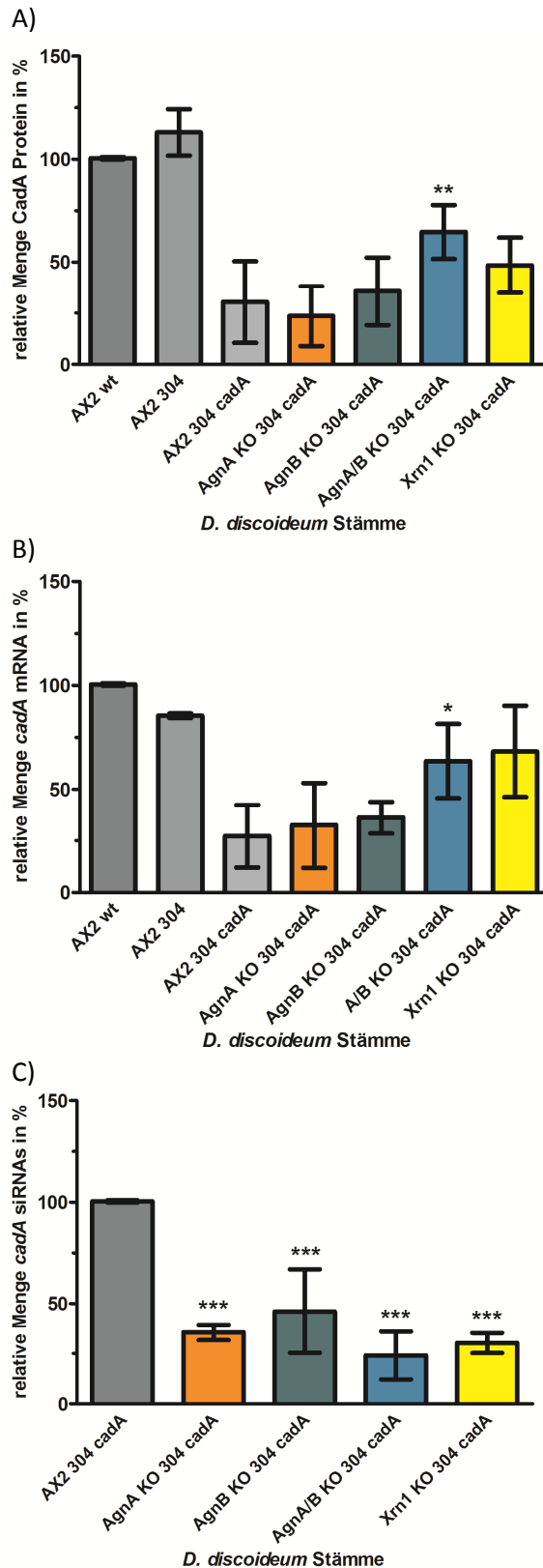


Abb. 65: Analyse des CadA Reportersystems in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen

Auswertung der Daten von zwei unabhängigen Transformationen des Vektors pDM304 *cadA* HP II in unterschiedliche *D. discoideum* KO-Stämme und AX2 wt. Zur Kontrolle wurde der Leervektor pDM304 in AX2 wt transformiert. Pro Transformation wurden mind. drei technische Replikate angefertigt. Fehlerbalken: *mean with SD*.

- A) Relative Quantifizierung des CadA Proteins mittels *Western Blot* und immunologischem Nachweis in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen. Die Signale für das CadA Protein wurden gegen CoroninA referenziert und relativ zum AX2 wt aufgetragen. N = 8. gepaarter t-Test: $p = 0,0037$ (**) (AX2 304 *cadA*/AgnA/B KO 304 *cadA*).
- B) Relative Quantifizierung der Menge von *cadA* mRNA in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Agarose Northern Blots*. Die Signale für die *cadA* mRNA wurden gegen U6 RNA referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 wt aufgetragen. N = 6. gepaarter t-Test: $p = 0,0166$ (*) (AX2 304 *cadA*/AgnA/B KO 304 *cadA*).
- C) Relative Quantifizierung der Menge von *cadA* siRNAs in verschiedenen *D. discoideum* Stämmen mittels *Northern Blots*. Die Signale für die *cadA* siRNAs wurden gegen DdR-6 referenziert und relativ zum *D. discoideum* AX2 304 *cadA* aufgetragen. N = 6. gepaarter t-Test: $p < 0,0001$ (***) (AX2 304 *cadA*/AgnA KO 304 *cadA*), $p = 0,0002$ (***) (AX2 304 *cadA*/AgnB KO 304 *cadA*), $p < 0,0001$ (***) (AX2 304 *cadA*/AgnA/B KO 304 *cadA*), $p = 0,0001$ (***) (AX2 304 *cadA*/Xrn1 KO 304 *cadA*).

Vektor pDM304 *cadA hp II* transformiert wurden, konnten keine siRNAs von *cadA* nachgewiesen werden (vgl. Abb. 64). Die *cadA* siRNAs konnten mit einer OLB-Sonde in allen Stämmen, die das *Hairpin*-Konstrukt exprimierten, detektiert werden, wobei die Menge der siRNAs von Stamm zu Stamm sehr unterschiedlich war. Unprozessierte *Hairpin*-RNA konnte in keinem der transformierten Stämme nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Referenzierung wurden die Blots mit einem Oligonukleotid gegen DdR-6 hybridisiert und die Banden mit Multi Gauge ausgewertet. Die ermittelten Werte wurden relativ zu dem AX2 304 *cadA* in dem Graphen aufgetragen (vgl. Abb. 65C). Im AgnA KO- und im AgnB KO-Stamm ist die siRNA Menge um 60 % bzw. um 50 % im Vergleich zum AX2 304 *cadA* reduziert. Beim AgnA/B KO-Stamm sind sie um 75 % verringert (vgl. Abb. 65C). Nach statistischer Auswertung weichen die Werte der siRNAs in allen untersuchten KO-Stämmen signifikant (***) von denen des AX2 304 *cadA* Stammes ab.

9 Diskussion

Argonauten Proteine übernehmen in RNAi Mechanismen wichtige Aufgaben, indem sie u.a. für die endonukleolytische Spaltung von Transposontranskripten verantwortlich sind. Weiterhin werden sie für die translationale Kontrolle von mRNAs im miRNA Signalweg benötigt (vgl. 4.2 + 4.3). Die Funktion der Argonauten Proteine in *D. discoideum* war zu Beginn der vorliegenden Arbeit weitgehend unbekannt. Zentrales Ziel war die molekularbiologische Charakterisierung der Argonauten Proteine AgnA und AgnB aus *D. discoideum* innerhalb RNA vermittelter Genregulationsmechanismen. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe von AgnA und AgnB KO-Stämmen erste Daten generiert werden, die zeigen, dass AgnA und AgnB an der Regulation des LTR Retrotransposon DIRS-1 in *D. discoideum* beteiligt sind (vgl. 8.4). Während AgnA für die Stilllegung des Transposons benötigt wird, tritt AgnB eher als Gegenspieler auf und fördert eine mögliche Transposition. AgnA ist weiterhin in den miRNA Signalweg der Amöbe involviert, da es beim Verlust des Proteins zu einer Anreicherung dieser regulativen RNAs kommt (vgl. 8.5). Durch Protein *Pull-Downs* konnten putative Interaktionspartner der beiden Argonauten Proteine identifiziert werden (vgl. 8.6).

Zunächst werden in der Diskussion die Regulationsmechanismen der Retrotransposons DIRS-1 und Skipper im Hinblick auf die Beteiligung der Argonauten Proteine erörtert. Die *Deep Sequencing* Daten für den AX2 Wildtyp und den AgnA KO-Stamm sowie deren Evaluierung werden im Anschluss diskutiert. Abschließend werden die Daten der Protein *Pull-Down* Experimente von AgnA und AgnB getrennt interpretiert.

9.1 Regulation des DIRS-1 Retrotransposons in Abhängigkeit von AgnA

9.1.1 AgnA wird für die Biogenese von DIRS-1 siRNAs benötigt

Argonauten Proteine übernehmen in verschiedenen Organismen die Regulation von Retrotransposons, indem sie siRNAs binden und anhand dieser zu den Ziel-Transkripten geleitet werden, die sie endonukleolytisch spalten. In *D. discoideum* sind siRNAs von den Retrotransposons DIRS-1 und Skipper bekannt, deren Mengen in den AgnA und AgnB KO-Stämmen mit Hilfe von *Northern Blots* untersucht wurden. Die verschiedenen DIRS-1 siRNAs weisen charakteristische Eigenschaften auf, da sie in der Regel ~21 nts lang sind und gleichmäßig der *sense* bzw. *antisense* Sequenz des Retrotransposons zugeordnet werden können (Hinas et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl DIRS-1 siRNAs mit einem Monophosphat am 5'-Ende als auch mit einem 5'-terminalen Triphosphat in *D. discoideum* existieren. Erstere sind typisch für eine Dicer abhängige Generierung, während Letztere für die Aktivität einer RdRP sprechen (Hinas et al., 2007). Die Existenz von DIRS-1 siRNAs mit einem 5'-terminalen Triphosphat legt nahe, dass es wahrscheinlich zu einer

primerunabhängigen *de novo* Synthese des komplementären RNA Stranges kommt. Als *Template* könnten Transkripte dienen, die von DIRS-1 Elementen abstammen. Da der überwiegende Teil der DIRS-1 siRNAs jedoch ein 5'-Monophosphat aufweist, ist davon auszugehen, dass die RdRP längere doppelsträngige Vorläufermoleküle generiert, die anschließend von einem Dicer Homolog prozessiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DIRS-1 siRNAs hauptsächlich im Cytoplasma der Zelle vorliegen (vgl. Abb. 28). Diese Ergebnisse konnten von einer anderen Arbeitsgruppe unabhängig bestätigt werden (Avesson, 2011).

Der AgnA KO zeigt eine Reduzierung der DIRS-1 siRNAs um bis zu 95 % (vgl. Abb. 25 + Abb. 26). Ein vergleichbarer Verlust der siRNAs konnte auch im *Knockout* der RrpC beobachtet werden (Wiegand, 2012). Trotz des dramatischen Verlusts von DIRS-1 siRNAs im AgnA oder RrpC KO ist ein verbleibendes siRNA Level von mindestens 5 % detektierbar. *Deep Sequencing* Analysen, in denen der Pool von kleinen RNAs aus dem AgnA KO mit dem Wildtyp verglichen wurde, bestätigten den Verlust der Hauptmenge der DIRS-1 siRNAs (Daten nicht gezeigt). Bei den verbleibenden siRNAs könnte es sich um primäre siRNAs handeln, die unabhängig von AgnA oder RrpC generiert werden. DIRS-1 wird, wie in dieser Arbeit gezeigt, über die gesamte Länge bidirektional transkribiert (vgl. Abb. 30 + Abb. 31). DrnA könnte die Spaltung dieser hybridisierten DIRS-1 Transkripten übernehmen und somit die primären siRNAs generieren (vgl. Abb. 66 1B-C + 2B-C). DrnB übernimmt diese Funktion vermutlich nicht, da es im DrnB KO zu keiner Veränderung in der Menge der DIRS-1 siRNAs kommt (Hinas et al., 2007). Die *Knockouts* von AgnA und RrpC weisen einen vergleichbaren Phänotyp für die Abwesenheit von DIRS-1 siRNAs auf, weshalb eine Funktion der beiden Proteine im gleichen Regulationsmechanismus, insbesondere in der Generierung der sekundären DIRS-1 siRNAs naheliegt. Zur Unterstützung dieser Hypothese müsste auch untersucht werden, ob sich am 5'-Ende der primären DIRS-1 siRNAs ein Monophosphat befindet, da dies ein Indiz für die Produktion durch ein Dicer Protein wäre.

Aus anderen Organismen ist bekannt, dass Argonauten Proteine für die Biogenese von kleinen RNAs benötigt werden. Argonauten Proteine der Piwi Unterfamilie, zu der auch die hier untersuchten Homologe aus *D. discoideum* gehören, sind beispielsweise an der Produktion von sekundären piRNAs in *D. melanogaster* beteiligt (Brennecke et al., 2007). In diesem Fall ist die *Slicer*-Aktivität der Piwi Proteine notwendig. In *N. crassa* wird *QDE-2*, das keiner Argonauten Unterfamilie zugeordnet werden kann, für die Produktion einer miRNA Klasse benötigt, indem das Homolog Faktoren rekrutiert, die die Biogenese der reifen miRNAs übernehmen (Lee et al., 2010; Xue et al., 2012).

Da es nicht möglich war, rekombinante AgnA Proteine für funktionelle Analysen zu isolieren (vgl. 8.3), bleibt unklar, ob AgnA *Slicer*-Aktivität besitzt und ob diese für die Biogenese der sekundären siRNAs benötigt wird.

9.1.2 Initiiert AgnA die Bildung von sekundären DIRS-1 siRNAs?

Die Untersuchung von langen DIRS-1 *sense* Transkripten mit Hilfe von *Northern Blot* Analysen zeigt, dass diese im AgnA KO im Vergleich zum Wildtyp und zum AgnB KO signifikant angereichert sind (vgl. Abb. 32 + Abb. 66 2E). Auffällig ist, dass im AgnA KO nicht nur die Menge an *sense* Transkripten zunimmt, sondern auch längere Transkripte detektiert werden können, die im Wildtyp nicht nachweisbar sind (vgl. Abb. 30). Das größte und gleichzeitig häufigste *sense* Transkript im AX2 wt weist eine Länge von ca. 1800 nts auf. Dagegen ist das dominante *sense* Transkript im AgnA KO ca. 4000 nts groß (vgl. Abb. 66 1E + 2E). Durch die sequenzielle Hybridisierung mit Sequenz-spezifischen Sonden konnte gezeigt werden, dass das größte Transkript im AgnA KO im Vergleich zum Wildtyp einen zusätzlichen 3'-terminalen Bereich des ORF II enthält und somit nahezu die komplette DIRS-1 Sequenz umfasst (vgl. Abb. 30B).

Zusätzlich zu den *sense* Transkripten wurde ein ca. 4000 nts langes *antisense* Transkript detektiert, das im AgnA KO angereichert vorliegt (vgl. Abb. 31). Die linke LTR scheint im Vergleich zur rechten LTR in Bezug auf die *sense* und *antisense* Transkriptmenge eine höhere Transkriptionsrate zu haben. Weiterhin weisen die *sense* Transkripte eine höhere Heterogenität in Bezug auf Größe und Zahl auf (vgl. Abb. 30).

Die Anreicherung der DIRS-1 Transkripte im AgnA KO konnte anschließend durch *Real-time* RT-PCR verifiziert werden, indem zwei unabhängige Regionen des Transposons relativ quantifiziert wurden (vgl. Abb. 32). Es ist zu beachten, dass die Amplifikationsreaktion dieser Methode keine Differenzierung zwischen *sense* und *antisense* Strang ermöglicht. Im Bereich DIRS-1 LE, in dem sich die offenen Leserahmen überschneiden, zeigt der AgnA KO eine achtfache Anreicherung der Transkriptmenge (vgl. Abb. 32A). In einer weiteren Analyse, bei der die verwendeten Primer im 3'-Bereich des DIRS-1 ORF II hybridisierten, konnte nur eine vierfache Anreicherung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 32B). Der erste Messbereich liegt unmittelbar *downstream* der linken LTR, sodass alle *sense* Transkripte sowie das Volllänge *antisense* Transkript berücksichtigt werden. Der zweite Bereich detektiert jedoch nur lange *sense* Transkripte (>3000 nts) und das *antisense* Transkript. Kürzere *sense* Transkripte dienen nicht als *Template*, was die Unterschiede in der Anreicherung erklären kann.

Die beschriebene Anreicherung von *sense* und *antisense* Transkripten im AgnA KO könnte zwei Ursachen haben. Zum einen könnte die reduzierte Kontrolle des Retrotransposons eine verstärkte Transkription zur Folge haben: Die Ursache könnte entweder im Verlust der DNA-Methylierung im Bereich der LTRs oder im Verlust der posttranskriptionellen Regulation liegen (vgl. 9.1.3). Zum anderen werden bei der Produktion von sekundären siRNAs bestehende Transkripte prozessiert und auf diese Weise abgebaut (vgl. Abb. 66 1D-G). Die Reduktion der siRNA Menge bei gleichzeitiger

Zunahme von langen Transkripten könnte durch eine solche Wirkungsweise erklärt werden. Die Tatsache, dass im AgnA KO neben den kürzeren Transkripten ein ~4000 nts großes Haupttranskript vorkommt (vgl. Abb. 30), weist auf einen bestimmten Mechanismus zur Produktion von sekundären siRNAs hin. Im AX2 wt tritt nur ein ~1800 nts langes Haupttranskript auf (vgl. Abb. 30). Im Fall von DIRS-1 ist ein tasiRNA ähnlicher Mechanismus denkbar, in dem AgnA die Spaltung der längeren Transkripte, die im *Knockout* akkumulieren, initiiert (vgl. Abb. 66 1D-E). Aus Pflanzen ist bekannt, dass Argonauten Proteine durch eine miRNA zu einem Transkript geleitet werden, das sie daraufhin spalten. Anschließend rekrutiert das Argonauten Protein eine RdRP, die einen Teil des geschnittenen Transkripts doppelsträngig macht und so ein Substrat für Dicer bereitstellt, welcher daraufhin tasiRNAs prozessiert (vgl. 4.2.3). Die RrpC aus *D. discoideum* könnte diese Aufgabe übernehmen (vgl. Abb. 66 1F), da es im *Knockout* ebenfalls zu einer Anreicherung von ~4000 nts langen DIRS-1 Transkripten kommt (Kuhlmann et al., 2005). Jedoch konnte bisher nicht experimentell geklärt werden, ob AgnA katalytische Aktivität besitzt. Alternativ könnte AgnA weitere Proteine zu DIRS-1 *sense* Transkripten rekrutieren, wie z.B. QDE-2 in *N. crassa* (Lee et al., 2010), die ihre Spaltung übernehmen können. Weitere Analysen sind notwendig, um zu klären, ob AgnA die Transkripte endonukleolytisch spaltet oder zusätzliche Faktoren wie z.B. die RrpC rekrutiert (vgl. Abb. 66 1D-E). Des Weiteren ist zu untersuchen, ob primäre siRNAs notwendig sind, um AgnA und mögliche andere Faktoren zu den DIRS-1 Transkripten zu leiten.

Die primären DIRS-1 siRNAs könnten aus bidirektionalen Transkripten hervorgehen, da sowohl die linke als auch die rechte DIRS-1 LTR Promotoraktivität besitzen (Földesi, 2010). Die komplementären Transkripte könnten einen Doppelstrang ausbilden, der von DrnA zu siRNAs prozessiert wird, wie oben beschrieben (vgl. Abb. 66 1B-C + 2B-C). In *D. discoideum* konnte bereits gezeigt werden, dass doppelsträngige bzw. *Hairpin*-Transkripte effektiv zu siRNAs prozessiert werden (vgl. Abb. 64) (Novotny et al., 2001; Wiegand, 2012). Aus verschiedenen Organismen ist bekannt, dass Retrotransposons bidirektional transkribiert und infolgedessen reguliert werden. Vom Retrotransposon Micropia aus *D. hydei* wird beispielsweise ein testisspezifisches *antisense* Transkript gebildet, das komplementär zur mRNA der vom Transposon kodierten Reversen Transkriptase ist (Lankenau et al., 1994).

9.1.3 Reguliert die RNAi Maschinerie DIRS-1 transkriptionell oder posttranskriptionell?

Transposons und Retrotransposons werden in verschiedenen Organismen durch unterschiedliche Regulationsmechanismen kontrolliert (vgl. 4.2). In *A. thaliana* werden Transposons durch die RNAi Maschinerie transkriptionell reguliert. Dabei vermitteln die *cas*iRNAs eine DNA-Methylierung und die Modifikation von Histonen, wodurch die Kompaktierung des Genoms an diesem Genort eingeleitet wird (vgl. 4.2.3). In *S. pombe* sorgt die RNAi vermittelte Methylierung von Histonen für die

Funktionalität der Centromere. Dabei kommt es durch die Modifikation von Histonen und durch die Rekrutierung Chromatin modifizierender Proteine zur Kompaktierung der Centromere und zur Ausbreitung von Heterochromatin (vgl. 4.2.2). In beiden Beispielen werden für diese Regulationsmechanismen RdRP- und Argonauten Homologe benötigt. Für das Tnt1 Retrotransposon aus *Nicotiana tabacum* konnte gezeigt werden, dass die LTRs als Promotor für das Transposon fungieren. Die LTRs werden durch transkriptionelle Genregulationsmechanismen methyliert, was zur Inaktivierung der Promotoraktivität führt (Hernandez-Pinzon et al., 2012). Das zuvor beschriebene Modell der DIRS-1 Regulation sieht vor, dass die Prozessierung von Volllänge-Transkripten in siRNAs bei Abwesenheit von AgnA beeinträchtigt ist (vgl. Abb. 66 2D-H), was auf eine posttranskriptionelle Regulation hindeutet.

Das Genom von *D. discoideum* kodiert lediglich für die DNA-Methyltransferase DnmA, die zur Gruppe 2 der DNA-Methyltransferasen gehört. Die genomische DNA von *D. discoideum* weist nur einen geringen Methylierungsgrad auf, wobei im Bereich der rechten LTR von DIRS-1 methylierte Cytosine identifiziert werden konnten (Kuhlmann et al., 2005). Auch in *D. discoideum* kommt es trotz der Methylierung der rechten LTR zur Bildung von *antisense* RNAs (vgl. Abb. 31 + Abb. 33). Ob die Zunahme der *antisense* Transkriptmenge im AgnA KO durch eine mangelnde Heterochromatisierung verursacht wird, bleibt zu untersuchen. Zu diesem Zweck ist geplant, den Methylierungsstatus der rechten DIRS-1 LTR zu bestimmen und zu untersuchen, ob der Verlust von AgnA auch einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulierung des Retrotransposons nimmt.

Die Centromere in *D. discoideum* sind, wie auch in anderen Organismen, heterochromatisch. Die HP1 Homologe HcpA und HcpB sowie die centromerspezifische Histonvariante CenH3 sind mit ihnen assoziiert (Kaller et al., 2006; Dubin et al., 2010). DIRS-1 Elemente lokalisieren ausschließlich in Centromerregionen und bilden den Großteil dieser heterochromatischen Bereiche (Glockner und Heidel, 2009). Die beobachtete Methylierung der DNA sowie die Anwesenheit Centromer-spezifischer Histonvarianten lassen darauf schließen, dass die DIRS-1 Sequenzen weitestgehend transkriptionell inaktiv sind. Überraschenderweise haben CHIP-Experimente gezeigt, dass die DIRS-1 Elemente nicht nur mit dem Heterochromatinmarker H3K9me sondern auch mit dem Euchromatinmarker H3K4me assoziiert sind (Dubin, 2010). Ebenfalls können eine Vielzahl an *sense* Transkripten im AX2 wt und AgnA KO detektiert werden (vgl. Abb. 30) (Rosen et al., 1983), was gegen eine komplette Inaktivierung der DIRS-1 Elemente bzw. der Centromere spricht. Ergebnisse der *Run-On* Transkriptionen zeigen darüber hinaus, dass der Verlust von AgnA keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate des DIRS-1 Transposons hat, da im AgnA KO und im AX2 wt gleiche Mengen an *de novo* synthetisierten Transkripten vorliegen (vgl. Abb. 33 + Abb. 66 1A + 2A). Diese Ergebnisse indizieren ebenfalls, dass AgnA vermutlich in die posttranskriptionelle Regulation des

Retrotransposons, insbesondere in die Degradation der Volllängetranskripte, involviert ist. Auch wenn die molekulare Funktion von AgnA experimentell nicht eindeutig determiniert werden konnte, ist klar, dass das Proteine eine hohe Relevanz für den posttranskriptionellen Regulationsmechanismus des Retrotransposons hat: Im AgnA KO nimmt die Menge und Heterogenität der DIRS-1 Transkripte zu, während das Level der DIRS-1 siRNAs dramatisch reduziert ist. Darüber hinaus kann in dem KO-Stamm auch die Existenz von extrachromosomalen DIRS-1 DNA-Intermediaten nachgewiesen werden, die im Wildtyp vermutlich vorhanden, aber nicht nachweisbar sind (vgl. Abb. 66 2F-H).

9.1.4 AgnA unterdrückt die Bildung extrachromosomaler DIRS-1 DNA

Neben der Anreicherung von langen DIRS-1 Transkripten konnte im AgnA KO- sowie im AgnA/B KO-Stamm die Existenz von extrachromosomaler DIRS-1 DNA nachgewiesen werden (vgl. Abb. 38), die im Wildtypstamm AX2 oder im AgnB KO nicht detektiert wurde. Mit Hilfe von strangspezifischen Sonden und dem selektiven Verdau durch Exonukleasen wurde gezeigt, dass diese DNA-Spezies größtenteils einzelsträngig vorliegt und dem *antisense* Strang des DIRS-1 Retrotransposons entspricht (vgl. Abb. 39 + Abb. 40). Es handelt sich folglich um ein reverses Transkript einer *sense* RNA, die den größten Teil des Elements umfasst (vgl. Abb. 66 2G). Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um das große *sense* Transkript handelt, das im AgnA KO-Stamm akkumuliert (vgl. Abb. 30). Unter denaturierenden Bedingungen konnten ein längeres und eine Familie kleinerer DNA Fragmente detektiert werden, die unter nativen Bedingungen vermutlich miteinander hybridisieren, da sich nur eine Bande im Gel zeigt (vgl. Abb. 38 + Abb. 40 + Abb. 66 2G). Die kleineren Fragmente beinhalten Teile der rechten LTR und des 3'-Bereichs des DIRS-1 ORF II, während das große Fragment vermutlich den kompletten DIRS-1 Bereich umfasst (vgl. Abb. 40).

Die in dem AgnA KO detektierte extrachromosomale DIRS-1 DNA und das *sense* Transkript weisen eine vergleichbare Länge auf (vgl. Abb. 30 + Abb. 38), sodass das Transkript eine Matrize für die Synthese der komplementären DNA-Intermediate darstellen könnte. Im AX2 wt ist die Bildung der DIRS-1 DNA vermutlich unterdrückt, da die Transkripte verkürzt sind und so möglicherweise der Primer für die reverse Transkription nicht hybridisieren kann (vgl. Abb. 37 + Abb. 66 1E).

Des Weiteren umfasst das *sense* DIRS-1 Transkript bis auf die linke LTR die komplette DIRS-1 Sequenz und kodiert seinerseits für eine Reverse Transkriptase, die die Synthese der cDNA im AgnA KO übernehmen könnte (vgl. Abb. 30 + Abb. 66 2F). Im Wildtyp enthält das entsprechende *sense* Transkript nur einen unvollständigen RT-kodierenden ORF (vgl. Abb. 30 + Abb. 66 1E), sodass die Translation der Reversen Transkriptase ausgeschlossen werden kann. Diese beiden Mechanismen könnten die Bildung der extrachromosomalen DIRS-1 DNA im Wildtyp unterbinden.

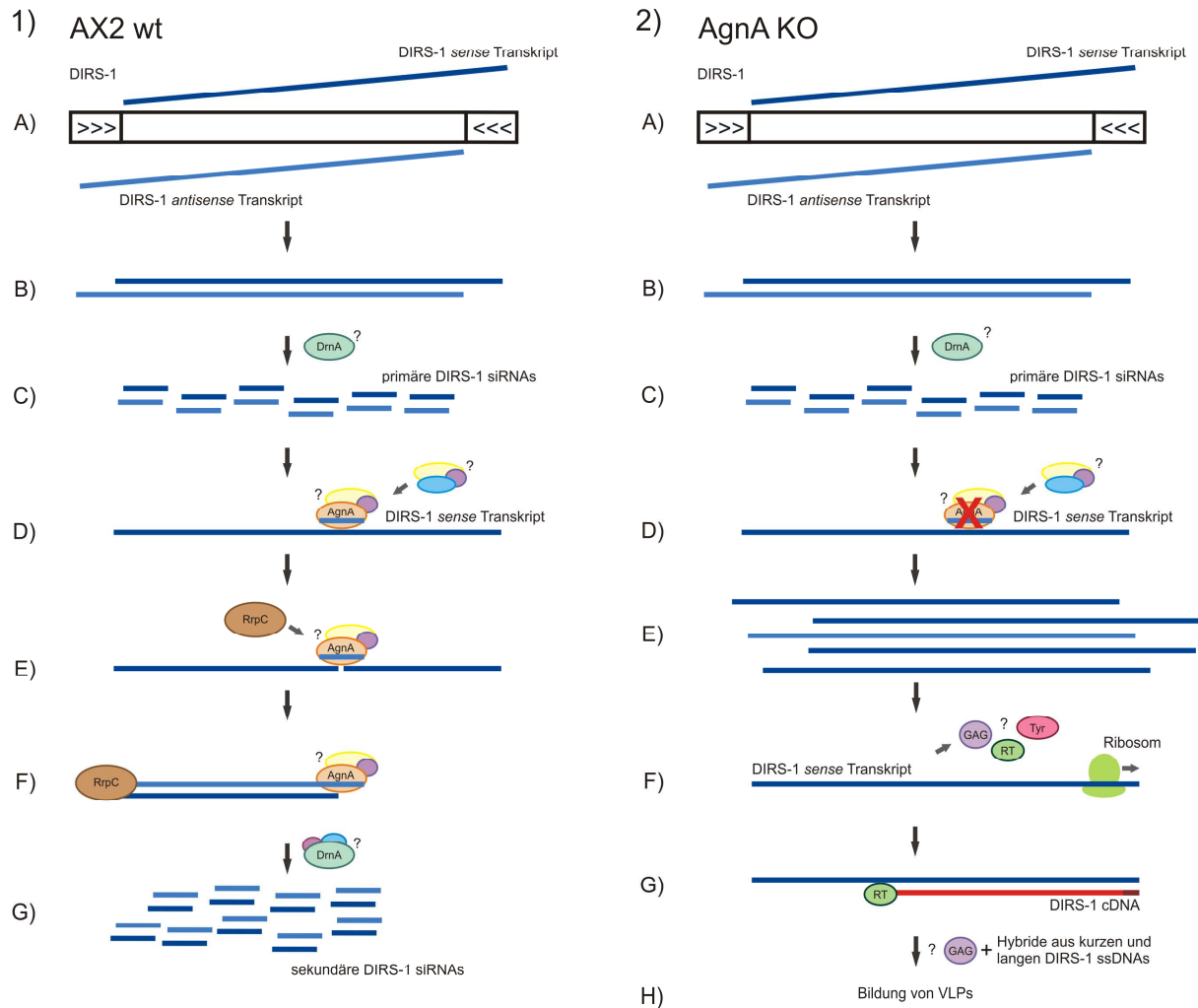


Abb. 66: Regulation des DIRS-1 Retrotransposons in *D. discoideum* AX2 wt und AgnA KO

Modell der möglichen Regulation des DIRS-1 Retrotransposons in *D. discoideum* AX2 wt und AgnA KO. Zunächst kommt es zur bidirektionellen Transkription des *sense* und *antisense* Transkripts (vgl. 1A + 2A) und zur anschließenden Hybridisierung der komplementären Stränge (vgl. 1B + 2B). Der entstehende Doppelstrang wird vermutlich von DrnA zu primären DIRS-1 siRNAs prozessiert (vgl. 1C + 2C).

Im AX2 wt bindet AgnA eine siRNA und wird durch diese zum DIRS-1 *sense* Transkript geleitet, wo er entweder die endonukleolytische Spaltung des Transkripts vermittelt oder weitere Proteine rekrutiert, die diese Prozessierung übernehmen (vgl. 1D). Durch diese initiale Spaltung wird RrpC zu den verkürzten Transkripten geleitet (vgl. 1E). Das Protein synthetisiert den komplementären Strang (vgl. 1F) und der gebildete Doppelstrang wird vermutlich durch DrnA zu sekundären DIRS-1 siRNAs prozessiert (vgl. 1G). Die Vermutung liegt nahe, dass DrnA den Doppelstrang nur dann effektiv prozessieren kann, wenn er von der RrpC rekrutiert wird. Womöglich dient RrpC oder ein assoziiertes Protein als Cofaktor für DrnA. Die sekundären siRNAs werden zum Abbau von weiteren DIRS-1 Transkripten in *D. discoideum* genutzt.

Durch den Verlust des AgnA Proteins im AgnA KO ist die Regulation von DIRS-1 eingeschränkt. Es kommt zu keiner Spaltung der DIRS-1 *sense* Transkripte (vgl. 2D) und dadurch zu einer Akkumulation der Vollängen-Transkripte (vgl. 2E). Anhand der vollständigen *sense* Transkripte werden das GAG Protein, die Tyrosin Rekombinase (Tyr) und die Reverse Transkriptase (RT) translatiert (vgl. 2F). Die RT synthetisiert einzelsträngige DIRS-1 cDNA (vgl. 2G) und die extrachromosomale DNA bildet mit GAG Proteinen Virus-ähnliche Partikel (VLP) (vgl. 2H). Durch weitere Regulationsmechanismen wird die Integration der DIRS-1 cDNA verhindert.

Es stellt sich die Frage, ob das Fehlen der Hauptmenge an DIRS-1 siRNAs bzw. das Auftreten von längeren DIRS-1 Transkripten im AgnA KO zur Bildung der extrachromosomalen DIRS-1 Intermediate führt oder ob AgnA zusätzliche Funktionen in der weiteren Regulation übernimmt. Für die letztere Hypothese spricht die Beobachtung, dass im RrpC KO (Wiegand, 2012), in dem die sekundären DIRS-1 siRNAs ebenfalls reduziert und die *sense* Transkripte angereichert sind, eine weitaus geringere Menge an extrachromosomalen DIRS-1 Intermediaten detektierbar ist (Daten nicht gezeigt).

In Langzeitkulturen des AgnA KOs konnten zusätzliche DIRS-1 spezifische Signale im *Southern Blot* detektiert werden (vgl. Abb. 34). Dabei handelt es sich vermutlich um die extrachromosomale DNA-Intermediate, da sie ungefähr die gleiche Größe aufweisen und nur mit einer Sonde nachweisbar sind, die spezifisch für das 3'-Ende des DIRS-1 ORF II und die rechte LTR ist (vgl. Abb. 34 + Abb. 38 + Abb. 71). Trotz der Bildung von beträchtlichen Mengen der extrachromosomalen DNA konnten kaum zusätzliche DIRS-1 Integration im AgnA KO detektiert werden (vgl. Abb. 35). Eine mögliche Erklärung für die geringe Integration von DIRS-1 in Dauerkulturen von AgnA KO-Stämmen könnte sein, dass die gebildete DIRS-1 DNA nur einzelsträngig vorliegt (vgl. Abb. 66 2G-H) und für Integration in das Genom ein Doppelstrang benötigt wird. Möglicherweise existiert eine weitere Regulationsebene, die die Synthese eines komplementären Strangs verhindert und so die Transposition unterbindet. In diesem Fall wäre die Bildung der extrachromosomalen DIRS-1 DNA eine notwendige aber keine hinreichende Voraussetzung für die Transposition.

In *D. melanogaster* konnte extrachromosomale DNA des copia Transposons nachgewiesen werden, die durch eine Reverse Transkriptase anhand eines Transkriptes gebildet wird (Flavell, 1984; Strand und McDonald, 1985). Die von dem Transposon gebildeten VLPs sind vermutlich der Ort der cDNA Synthese, da sie copia Transkripte und Reverse Transkriptasen beinhalten (Shiba und Saigo, 1983; Flavell, 1984).

In Pflanzen konnte die stressinduzierte Bildung extrachromosomaler DNA, die von Transposons abstammt, nachgewiesen werden. Im Fall des Retrotransposons ONSEN, das zur Gruppe der Ty1/copia-Typ Transposons gehört, kommt es nach einem Hitzeschock zur Bildung von extrachromosomaler ONSEN DNA, die jedoch nicht in das Genom von *A. thaliana* integrieren kann (Ito et al., 2011). Erst der Verlust von Proteinen des siRNA vermittelten Regulationsmechanismus ermöglicht eine Transposition des Retrotransposons (Ito et al., 2011).

Möglicherweise unterdrücken andere RNAi Komponenten aus *D. discoideum* die Synthese des komplementären DIRS-1 DNA Stranges bzw. die Transposition des Retrotransposons (vgl. Abb. 66 2G). Dies wurde noch nicht untersucht. Jedoch scheint die Bildung der DIRS-1 DNA-Intermediate spezifisch für AgnA zu sein, da in anderen *Knockouts*, mit Ausnahme des RrpC KO, keine extrachromosomalen DNA-Intermediate detektiert werden konnten.

9.1.5 Verstärkt AgnB die Bildung extrachromosomaler DIRS-1 DNA in Abwesenheit von AgnA?

In Pflanzen, wie z.B. *A. thaliana*, können unterschiedliche Argonauten Proteine gleiche Aufgaben übernehmen. Im Fall des *D. discoideum* spezifischen RNAi Reportersystems CadA, welches ein proteinkodierendes Gen über siRNAs stilllegen soll, scheinen AgnA und AgnB kompensatorisch wirken zu können (vgl. 8.8). Dagegen gehen die beiden Proteine bei der Regulation des DIRS-1 Retrotransposons unterschiedlichen Aufgaben nach. Bei der Analyse der AgnA/B KOs zeigten diese zum Teil weniger starke Effekte bezüglich des Verlustes der DIRS-1 Regulation als die AgnA KO-Stämme (vgl. 8.4).

Auf der Ebene der sekundären DIRS-1 siRNAs ist eine nahezu identische Abnahme in dem AgnA Einzel-KO und dem AgnA/B Doppel-KO festzustellen. Im AgnB KO ist die Menge der DIRS-1 siRNAs im Vergleich zum Wildtyp lediglich um ca. 15 % reduziert (vgl. Abb. 27).

Weiterhin zeigt die relative Quantifizierung der langen DIRS-1 Transkripte mittels *Real-time* RT-PCR im AgnA Einzel-KO für den DIRS-1 LE Bereich eine achtfach erhöhte Transkriptmenge, während der Doppel-KO nur eine zweifache Anreicherung aufweist (vgl. Abb. 32A). Wird die Transkriptmenge im 3'-Bereich von DIRS-1 ORF II bestimmt, kann in beiden Stämmen eine vierfache Anreicherung im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (vgl. Abb. 32B). Der AgnB KO zeigt in beiden Detektionsbereichen eine Reduktion der Transkriptmenge im Vergleich zum AX2 wt um ca. 20 %, was mit der milden Abnahme der siRNA Menge korreliert (vgl. Abb. 32A + B).

Argonauten Proteine können den Replikationszyklus von transposablen Elementen unterstützen. So interagiert z.B. das humane Ago2 Homolog mit den GAG Proteinen des HIV- und des PFV-1 Virus und wird durch diese zu viralen Transkripten rekrutiert. Dort fördert Ago2 die Expression der viralen Proteine durch eine verstärkte Translation der viralen mRNA (Bouttier et al., 2012). In *D. discoideum* könnte AgnB eine ähnliche Funktion bei der Transkription von DIRS-1 übernehmen, da im AgnB KO weniger DIRS-1 siRNAs bzw. Transkripte nachweisbar sind (vgl. Abb. 27 + Abb. 32). Möglicherweise wird AgnB durch das GAG Protein rekrutiert und führt dadurch zu einer verstärkten Transkription bzw. Stabilisierung der Transkripte von DIRS-1. Im Fall des AgnB KOs und des AgnA/B KOs könnte dies eine Erklärung für die geringeren Mengen an DIRS-1 siRNAs bzw. Transkripten sein. Dies ist spekulativ, da die Expression der von DIRS-1 kodierten Proteine in den entsprechenden Stämmen nicht untersucht (vgl. Abb. 66 2F) und bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Interaktionspartner von AgnB keine GAG Proteine gefunden wurden.

Die deutlichsten Abweichungen zwischen dem AgnA KO und dem AgnA/B KO zeigen sich auf der Ebene der extrachromosomalen DIRS-1 DNA-Intermediate. Diese DIRS-1 DNA-Spezies ist, wie zuvor

beschrieben, im AgnA KO deutlich angereichert, wohingegen im Doppel-KO nur eine geringe Menge nachweisbar ist (vgl. Abb. 38). Weder im Wildtyp noch im AgnB KO konnten solche Intermediate detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust von AgnB die Bildung der extrachromosomalen DIRS-1 DNA beeinträchtigt, da im AgnA/B KO eine geringere Menge dieser Intermediate im Vergleich zum AgnA KO nachweisbar ist. Da im AgnB KO keine Intermediate nachweisbar sind, wird der postulierte Effekt von AgnB vermutlich vollständig durch die Anwesenheit von AgnA kompensiert wird.

Die detektierte extrachromosomale DIRS-1 DNA stellt vermutlich eine der Zwischenstufen in dem Amplifikationsmechanismus des Retrotransposons dar (vgl. Abb. 37).

Retrotransposons und Retroviren weisen Ähnlichkeiten in ihrem Replikationszyklus auf, da sie für GAG Proteine kodieren und für ihre Vervielfältigung eine RNA- bzw. DNA-Zwischenstufen nutzen. Es konnte beobachtet werden, dass diese transposablen Zwischenstufen mit den GAG Proteinen interagieren und Virus-ähnliche Partikel (VLPs) bilden (Kuznetsov et al., 2005). Auch DIRS-1 kodiert in ORF I für ein GAG Homolog, das möglicherweise zur Ausbildung von VLPs benötigt wird (vgl. Abb. 66 2F + H). Die Bildung von VLPs ist im bisherigen Amplifikationsmodell des DIRS-1 Retro-transposons nicht vorgesehen (vgl. Abb. 37). Bei der Untersuchung der extrachromosomalen DIRS-1 DNA mittels Rasterkraftmikroskopie wurden Torus-ähnliche Strukturen nachgewiesen, die im AgnA KO im Vergleich zum Wildtyp wesentlich häufiger zu finden waren (Zusammenarbeit mit Dr. M. Bussiek) (vgl. Abb. 41). Diese Partikel ähneln in ihrer Form den Zwischenstufen des Ty3 Retrotransposons aus *S. cerevisiae* (Kuznetsov et al., 2005). Es könnte sich bei den Partikeln um Strukturen aus Protein und DNA handeln (vgl. Abb. 66 2H), da diese nach Proteinase K Verdau und Hitzedenaturierung nicht mehr nachweisbar sind (vgl. Abb. 41 + Abb. 42). Die vermutlichen VLPs scheinen sich nach dieser Behandlung in Netzwerke einzelsträngiger DNA aufzulösen. Zur Verifizierung dieser Annahmen müssen noch abschließende Experimente, wie z.B. eine weitere Charakterisierung der VLPs durch Gradientenzentrifugation, durchgeführt werden.

9.2 Regulation des Skipper Retrotransposons in *D. discoideum*

Neben den DIRS-1 Retrotransposons wurde im Rahmen dieser Arbeit die Regulation des Skipper Retrotransposons untersucht. Bei *Northern Blot* Analysen konnte das von Leng und Mitarbeitern beschriebene Skipper Transkript von 7000 nts weder im Wildtyp noch in den untersuchten Argonauten KO-Stämmen detektiert werden (Leng et al., 1998). Auch Kuhlmann und Mitarbeiter konnten in AX2 Wildtypzellen keine vollständigen Skipper Transkripte nachweisen. Erst nach längerer Kultivierung des Wildtyps und des DnmA *Knockout*-Stammes waren Volllängetranskripte nachweisbar, wobei diese im *Knockout* signifikant angereichert waren (Kuhlmann et al., 2005). Trotz

der beachtlichen Anzahl von Skipper Kopien im Genom von *D. discoideum* identifizierten *Deep Sequencing* Analysen lediglich acht spezifische siRNAs, die alle einer unvollständigen Skipper Kopie auf Chromosom 2 zugeordnet werden können (Hinas et al., 2007). Dieses unvollständige Element ist vermutlich durch Rekombination mehrerer Skipper Elemente entstanden, da die Sequenz in keiner vollständigen Kopie wieder zu finden ist (T. Winckler, persönliche Mitteilung). Die Entstehung von siRNAs aus dieser unvollständigen Skipper Kopie ermöglicht es dem Organismus vermutlich das Retrotransposon mit Hilfe von siRNAs zu regulieren, ohne dass transpositionsfähige Transkripte entstehen können. Der Verlust möglicher RNAi Komponenten oder assoziierter Faktoren führt zu einer Anreicherung der Skipper siRNAs. Im Helf KO (Moog, 2012) und im DnmA KO (Müller, 2011) ist die Anreicherung moderat ausgeprägt, während sie im Xrn1 KO (Moog, 2012) etwas stärker ist. In keinem dieser Stämme wird allerdings das siRNA Level erreicht, das im AgnA KO nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt). Lediglich der Verlust von RrpC hat eine noch stärkere Akkumulierung der Skipper siRNAs zur Folge (Hinas et al., 2007).

Der Verlust von funktionsfähigem AgnA Protein führt zu einer Anreicherung der Skipper siRNAs. Im Gegensatz dazu zeigt der AgnB KO im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede im siRNA Level. Die Skipper siRNAs sind mit drei verschiedenen Oligonukleotiden detektierbar, die zum Nachweis der acht individuellen Skipper siRNAs genutzt wurden (Daten nicht gezeigt). Sie zeigen damit Ähnlichkeiten zu den miRNAs, die ebenfalls im AgnA KO deutlich angereichert sind (vgl. Abb. 44 + Abb. 46).

Die 250 nts und 1200 nts langen Skipper Transkripte wurden das erste Mal im Rahmen dieser Arbeit detektiert. Der *Knockout* von AgnA bzw. AgnB hat keine Akkumulierung der detektierten Skipper Transkripte bei 250 nts und bei 1200 nts zur Folge (vgl. Abb. 22 + Abb. 23). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um zwei Vorläuferstufen der Skipper siRNAs handelt, die von der ~3400 bp langen unvollständigen Kopie auf Chromosom 2 abstammen. Es bleibt zu klären, ob diese beiden RNA-Spezies sequentiell aus der unvollständigen Skipper Kopie hervorgehen oder ob eine individuelle Prozessierung dieser RNAs stattfindet. Für die Aufklärung dieses Signalwegs sind noch weitere Experimente, wie z.B. *Primer Extension* Analysen zur Bestimmung der 5'-Enden der Transkripte, notwendig. Weiterhin könnten die Transkripte kloniert und sequenziert werden, um deren Basenabfolge zu bestimmen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust von AgnA und AgnB keine vermehrte Bildung dieser RNA-Spezies nach sich zieht.

Eine Hypothese, die die Anreicherung erklärt, wäre, dass die gebildeten siRNAs im Wildtyp Hintergrund während dem *Silencing* von Skipper verbraucht werden, da sie möglicherweise als Primer für eine RdRP dienen. Fehlt eine der zur Regulierung von Skipper notwendigen Komponenten, kommt es zu einer Akkumulierung der siRNAs, da diese nicht mehr aufgebraucht werden. Dafür

würde zudem sprechen, dass sich die Transkriptmenge der möglichen siRNA Vorläufermoleküle in den untersuchten KO-Stämmen nicht ändert (vgl. Abb. 22 + Abb. 23). Da Argonauten Proteine in allen bisher bekannten RNA-abhängigen Regulationsmechanismen zentrale Komponenten des Effektor-Komplexes sind, könnte so auch die starke Anreicherung der kleinen siRNAs im AgnA KO-Stamm erklärt werden.

Unter Umständen lässt sich die erhöhte Menge an siRNAs in den *Knockouts* auf zellulären Stress zurückführen. Für diese Annahme spricht, dass die Akkumulierung der siRNAs in unterschiedlichen AgnA KO-Einzelklonen (Daten nicht gezeigt) und in den oben genannten *Knockouts* relativ stark schwankt. Durch Transformationen können in *D. discoideum* Stressantworten ausgelöst werden, da es nach Transformationen zur Anreicherung von Hitzeschock Proteinen kommt (W. Nellen, persönliche Mitteilung).

Die beschriebenen Skipper siRNAs ähneln in ihrer Entstehung miRNAs, da distinkte Sequenzen aus einem langen, einzelsträngigen Transkript prozessiert werden. Dass siRNAs von *Hairpin*-Strukturen abstammen können, ist aus *D. melanogaster* bekannt (vgl. 4.2.2). Jedoch werden hier wiederum Dicer Proteine für die Prozessierung benötigt (Okamura et al., 2004). Auch wenn die Biogenese der Skipper siRNAs noch nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte eine Beteiligung von DrnB ausgeschlossen werden (Hinas et al., 2007). Die Entstehung der Skipper siRNAs aus zwei unabhängig transkribierten und anschließend hybridisierten Einzelsträngen erscheint unwahrscheinlich, da keine bidirektionalen Transkripte vom Skipper Element gebildet werden: Zum einen weisen die flankierenden LTRs in die gleiche Richtung (Leng et al., 1998) und zum anderen besitzt die rechte LTR keine Promotoraktivität (Földesi, 2010). Zudem ist keines der RdRP Homologe an der Generierung der kleinen siRNAs beteiligt, da in keinem KO-Stamm ein Verlust dieser RNA Spezies nachgewiesen werden konnte (Hinas et al., 2007).

Da der Verlust von AgnA und anderen untersuchten RNAi Komponenten zwar zur Akkumulierung von siRNAs führt aber keine vermehrte Integration des Retrotransposons in das Genom von *D. discoideum* nach sich zieht, sind die angesprochenen RNAi Komponenten vermutlich nicht an der Regulation von Skipper beteiligt (vgl. Abb. 23). Der Verlust von DnmA hingegen führt zu einer erhöhten Transkription von vollständigen Skipper Elementen (Kuhlmann et al., 2005). Zusätzlich konnten erhöhte Mengen von Skipper LTRs im Genom von DnmA KO-Stämmen nachgewiesen werden, wobei die Menge der Skipper ORFs nicht zu nimmt. Diese Mobilisierung wurde auf den Verlust von DNA-Methylierung im Bereich des Transposons zurückgeführt (Kuhlmann et al., 2005; Müller, 2011). Es existiert somit eine transkriptionelle Regulationsebene, die jedoch unabhängig von AgnA und AgnB zu sein scheint.

9.3 Der Einfluss von Argonauten Proteinen auf das miRNA Level in *D. discoideum*

Micro RNAs sind eine Klasse von kleinen regulativen RNAs, die grundlegenden Einfluss auf die Expression von Genen nehmen und zelluläre Prozesse sowie die Entwicklung von Organismen steuern. Argonauten Proteine bilden in diesen Mechanismen nicht nur zentrale Komponenten des Effektor-Komplexes, sondern sind auch an der Biogenese, der Stabilisierung und dem Umsatz von miRNAs beteiligt.

Die beiden bisher identifizierten miRNAs aus *D. discoideum*, mica1190 und mica1198, sind in vegetativ wachsenden Wildtyp Zellen schwach exprimiert. Wie einleitend bereits beschrieben, nimmt ihre Expression aber während der Entwicklung zu (Hinas et al., 2007). Ziel-Gene, die durch die miRNAs reguliert werden, sind noch nicht identifiziert worden (Hinas et al., 2007).

Der Einfluss von AgnA und AgnB auf die miRNAs wurde in den KO-Stämmen sowie den Überexpressionsstämmen untersucht. In *Northern Blot* Analysen wurde nachgewiesen, dass die Mengen der reifen miRNAs sowohl in KO-Stämmen von AgnA und AgnA/B als auch in Überexpressionsstämmen von AgnA und AgnB variieren (vgl. 8.5). Im AgnA KO und im AgnA/B KO kommt es zu einer deutlichen Anreicherung von mica1190 und mica1198, während der *Knockout* von AgnB keinen sichtbaren Einfluss auf die miRNA Menge hat (vgl. Abb. 44 + Abb. 46). Die miRNA Akkumulation im AgnA und im AgnA/B KO steht im Gegensatz zu den Beobachtungen aus anderen Organismen. In höheren Eukaryoten führt der Verlust von Ago2 zu einer Reduzierung der muren miRNAs und zu einer Anreicherung der *Precursor*-Spezies (Diederichs und Haber, 2007; O'Carroll et al., 2007). Hingegen existieren nur wenige Beispiele, bei denen der Verlust einer RNAi Komponente zu einer Anreicherung von kleinen RNAs führt. So akkumulieren im *Knockout* der RdRP RDR2 aus *A. thaliana* mehrere untersuchte miRNAs (Lu et al., 2006). Diese Anreicherung ist vermutlich nur indirekt, da gleichzeitig viele siRNAs in dem KO-Stamm angereichert sind und so mehr Komponenten des RNAi Mechanismus für die Biogenese von miRNAs zur Verfügung stehen (Lu et al., 2006).

Ein vergleichbares Modell könnte die betreffenden Beobachtungen im AgnA KO und im AgnA/B KO erklären. Durch den Verlust der Hauptmenge an DIRS-1 siRNAs könnten ebenfalls mehr RNAi Komponenten für die Produktion bzw. die Stabilisierung der miRNAs zur Verfügung stehen. Im Fall der Skipper siRNAs könnte dies auch zutreffend sein, da es auch zur Anreicherung der entsprechenden kleinen RNAs in den KOs kommt (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung damit konnte in den angesprochenen KO-Stämmen keine Anreicherung der miRNA und der Skipper siRNA Precursor beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Erklärung für die Anreicherung der miRNAs in den besagten KO-Stämmen ist, dass AgnA am Abbau der miRNAs beteiligt ist oder diese bei der Regulation von Ziel-RNAs verbraucht. Weitere

Experimente, wie z.B. *in silico* Vorhersagen von möglichen miRNA Bindestellen oder *High Throughput* Sequenzierungen der Transkriptome der unterschiedlichen *D. discoideum* Stämme, könnten die Frage klären, welche Gene durch die miRNAs reguliert werden.

Um eine mögliche Funktion des AgnA Proteins beim miRNA-Umsatz nachzuweisen, wurden die Menge der miRNAs in Überexpressionsstämmen untersucht. Basierend auf der genannten Hypothese sollte es in AgnA Überexpressionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp zu einem schnelleren Umsatz der miRNAs kommen. Folglich wurden in verschiedenen Stämmen, die AgnA oder AgnB Fusionsproteine überexprimieren, mittels *Northern Blot* Analysen die Menge der miRNAs bestimmt. Entgegen der Erwartung wiesen diese Stämme keine Abreicherung der reifen miRNAs auf (vgl. Abb. 51 + Abb. 52).

Über die Funktionalität der rekombinanten Proteine, die in den Überexpressionsstämmen exprimiert wurden, kann nur spekuliert werden, da es in Abhängigkeit von der Lage der Markierung und der Expressionsstärke zu unterschiedlichen Wirkweisen kam. Ektopische Wirkweisen der Argonauten Proteine bei Überexpression, wie z.B. die Übernahme von Funktionen, die im Wildtyp nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt sind, können nicht ausgeschlossen werden. Deshalb sind die folgenden Überlegungen mit großer Vorsicht und kritisch zu betrachten.

In Stämmen, die AgnA bzw. AgnB mit einem C-terminalen *Tag* exprimieren, entsprach das miRNA Level dem Wildtyp, während die Anwesenheit N-terminal fusionierter Argonauten Proteine eine Zunahme des miRNA-Levels hervorrief. Da die Überexpression von GFP ohne Fusion keinen Einfluss auf die Menge der beiden miRNAs hat, scheinen die beobachteten Phänotypen spezifisch für die beiden Argonauten Proteine zu sein (vgl. Abb. 51A + Abb. 52A).

Da die N-terminalen Fusionsproteine stärker exprimiert werden, könnten in diesen Stämmen die miRNAs durch die Bindung der ektopisch exprimierten Argonauten Proteine stabilisiert werden. Weiterhin könnte die Anreicherung auf eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion durch die Lage des *Tags* zurückzuführen sein. Durch die N-terminale Fusion des *Tags* könnte die Aktivität des Proteins so beeinträchtigt sein, dass das Protein die miRNAs möglicherweise noch binden, aber ihren Abbau nicht mehr einleiten kann.

Die ektopische Expression von AgnA mit einer N-terminalen Markierung hätte somit einen stabilisierenden Effekt auf die miRNAs. Wenn dieses Fusionsprotein nicht in der Lage ist, den Abbau der miRNAs zu vermitteln, könnte dadurch ihre Anreicherung erklärt werden. Möglicherweise schützt der N-terminal markierte AgnA die miRNAs so vor dem Abbau durch endogene Nukleasen. Im Gegensatz dazu ist der C-terminal markierte AgnA funktionell, da keine Anreicherung der miRNAs nachgewiesen werden konnte. Diese Annahme wird zudem durch die *Rescue* Experimente gestützt:

Nur wenn AgnA Fusionsproteine mit C-terminaler Markierung im *Knockout* exprimiert werden, kann die KO-bedingte Anreicherung der miRNAs aufgehoben werden (vgl. Abb. 53).

Im Fall von AgnB, wo keine Veränderung in den miRNA Mengen im KO-Stamm detektierbar ist, könnte die Anreicherung der miRNAs im Überexpressionsstamm mit N-terminal markiertem AgnB durch einen stabilisierenden Effekt des Proteins bei entsprechender Expressionsstärke des Fusionsproteins erklärt werden (vgl. Abb. 51 + Abb. 52). Möglicherweise werden die miRNAs vom Fusionsprotein gebunden, aber es erfolgt kein Umsatz derselbigen. Die Bindung von miRNAs durch Argonauten Proteine schützt die RNAs, was u.a. mit Hilfe von ektopisch exprimiertem humanen Ago2 gezeigt werden konnte (Diederichs et al., 2008; Winter und Diederichs, 2011). Allerdings darf man bei diesem Vergleich nicht außer Acht lassen, dass es im Ago2 *Knockout*, wie oben bereits erwähnt, zu einer Abreicherung der reifen miRNAs kommt. Weitere Experimente sind nötig, um diese Hypothese zu untersuchen.

9.4 Eigenschaften von miRNAs in *D. discoideum*

Micro RNAs lösen im Cytoplasma der Zelle die Regulation bestimmter proteinkodierender Gene aus. In vielen Organismen werden miRNAs posttranskriptionell modifiziert, um sie u.a. vor Abbau zu schützen. Im Rahmen der Arbeit wurden die miRNAs aus *D. discoideum* im Hinblick auf die Lokalisation in der Zelle und auf posttranskriptionelle Modifikationen hin untersucht.

Die reifen miRNAs liegen in den meisten untersuchten Organismen im Cytoplasma der Zelle vor. Gleiches konnte für die miRNAs von *D. discoideum* gezeigt werden, da sie fast ausschließlich im Cytoplasma der Zellen nachweisbar waren (vgl. Abb. 47). Trotz der Zunahme der miRNA Mengen in den AgnA KOs kommt es zu keiner abweichenden Verteilung der miRNAs in der Zelle. Die fast ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation der reifen miRNAs lässt darauf schließen, dass eine posttranskriptionelle Genregulation spezifischer Transkripte im Cytoplasma erfolgt, was auch aus anderen Organismen bekannt ist.

In humanen Zellen ist Ago2 in die finale Reifung von miRNAs involviert, da es bei einem Verlust dieses Proteins zu einer Anreicherung der Zwischenstufe ac-pre-miRNA kommt, die ein Intermediat zwischen der pre-miRNA und der reifen miRNA darstellt (Diederichs et al., 2008). In keinem der untersuchten Argonauten KO-Stämme aus *D. discoideum* konnten Vorstufen von miRNAs identifiziert werden, sodass AgnA und AgnB vermutlich keine Funktionen bei der Prozessierung der miRNAs übernehmen.

In Pflanzen und *D. melanogaster* werden miRNAs durch eine 2'-O Methylierung am 3'-Ende vor der Degradation geschützt. Im Gegensatz dazu sind die miRNAs aus *D. discoideum* nicht 2'-O methyliert,

da sie anfällig für β -Eliminierung sind und nicht durch eine Methylierung am 3'-Ende vor dem Abbau geschützt werden. (vgl. Abb. 48) (Avesson, 2011). In Übereinstimmung damit ergab die *in silico* Suche nach Homologen der Methyltransferase HEN1, die in einigen Organismen miRNAs und siRNAs methyliert, in *D. discoideum* keine Treffer.

9.5 Expression von rekombinanten Argonauten Proteine

Für die Durchführung von *in vitro* Experimenten und für die Gewinnung von scFvs, die unter anderem für die Immunpräzipitation von endogenen Proteinen genutzt werden können, sollten Argonauten Proteine rekombinant exprimiert werden. *D. discoideum* ist schlecht für eine Überexpression von Fusionsproteinen geeignet, da die Expression meist nicht sehr hoch ist. Für die Expression von rekombinanten Proteinen können eukaryotische Organismen, wie z.B. Hefe (*Pichia pastoris*), verwendet werden. Im Fall von *D. discoideum* ist dies jedoch nicht möglich, da die Gene sehr A/T-reich sind (Eichinger et al., 2005) und Hefe Systeme bei hohem A/T-Gehalt kontrainduziert sind. Daher sollten die Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert werden. Die Isolierung von funktionell aktiven Argonauten Proteinen aus prokaryotischen Expressionssystemen gelang erstmals im Fall des humanen Ago2, das mit einem GST-Tag fusioniert wurde. Für eine Aufreinigung war es jedoch erforderlich, dass das Heat Shock Protein HSP90 koexprimiert wurde (Rivas et al., 2005). In späteren Studien konnte das murine Ago2 Homolog als MBP Fusion auch ohne die Anwesenheit von weiteren Heat shock Proteinen oder Chaperonen exprimiert werden. Allerdings traten bei der anschließenden affinitätschromatographischen Aufreinigung des Fusionsproteins viele Degradationsprodukte auf (vgl. Abb. 21) (Salvatore et al., 2010).

Für die Expression von Volllänge His₆-AgnA und His₆-AgnB Fusionsproteinen wurde BL21 Rosetta2, ein für die Expression von eukaryotischen Proteinen optimierter *E. coli* Stamm, verwendet. Dennoch war die Expression der Fusionsproteine sehr gering und der Großteil des rekombinanten Proteins lag zudem unlöslich in den Zellen vor (Daten nicht gezeigt). Ein Grund dafür könnte das hohe Molekulargewicht der basischen Argonauten Proteine sein, das in der Regel über 100 kDa liegt. Die lösliche Fraktion der Fusionsproteine konnte zudem kaum durch die Affinitätschromatographie angereichert werden.

Eine Vielzahl von strukturellen und funktionellen Untersuchungen erfolgte mit einzelnen Domänen oder verkürzten Formen der Argonauten Proteine, da deren Isolierung aus bakteriellen Expressionssystemen weit erfolgreicher verlief. Das gilt z.B. für die PAZ-Domänen der *D. melanogaster* Argonauten Proteine (Lingel et al., 2003) und für die PAZ-PIWI-Domäne von QDE-2 aus *N. crassa* (Boland et al., 2011).

Entsprechend wurden für AgnA und AgnB His₆-markierte Fusionsproteine konzipiert, deren N-Terminus deletiert wurde. Dadurch haben die resultierenden Fusionsproteine eine Größe von 60-70 kDa, was die Expression und die Löslichkeit verbessern sollte. Es zeigte sich, dass die Expression der Argonauten Fragmente im Vergleich zu den Volllänge Proteinen um ein Vielfaches gesteigert werden konnte, insbesondere wenn der His₆-Tag durch einen MBP-Tag ersetzt wird (vgl. Abb. 20 + Abb. 21). In diesem Fall traten allerdings auch mehr Degradationsprodukte auf (vgl. Abb. 21), weshalb die verkürzten His₆-markierten Argonauten Proteine für die Generierung von scFvs Verwendung fanden.

Ungeachtet der verbesserten Expression von verkürzten Argonauten Proteinen waren die Mengen der Fusionsproteine immer noch nicht ausreichend, um funktionelle Analysen von AgnA oder AgnB, insbesondere im Hinblick auf eine putative *Slicer*-Aktivität, zu ermöglichen.

In einer Studie, die vor Kurzem veröffentlicht wurde, konnte das rekombinante humane Ago2 Protein in beträchtlichen Mengen aus der Insektenzelllinie SF9 isoliert werden, wodurch eine detaillierte Strukturaufklärung und eine funktionelle Analyse des Proteins ermöglicht wurde (Schirle und MacRae, 2012). Insektenzellen stellen somit eine Alternative für die Expression von Argonauten Proteinen dar. Um mit AgnA und AgnB aus *D. discoideum* die zuvor erwähnten *in vitro* Experimente durchführen zu können, empfiehlt es sich, ebenfalls Insektenzellen als Expressionssystem zu prüfen.

9.6 Wird AgnA oder AgnB für die RNA vermittelte Genregulation benötigt?

Eine etablierte Methode für die *in vivo* Funktionsanalyse einzelner Komponenten der RNA vermittelten Genregulation ist die Verwendung von Reportersystemen, bei denen durch die Expression transgener *Hairpin*-RNAs ein spezifisches Gen negativ reguliert wird. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass auch in *D. discoideum* mit Hilfe von *Hairpin*-RNAs Gene erfolgreich stillgelegt werden können (Martens et al., 2002). Mit Hilfe solcher Systeme kann die Funktion einzelner Komponenten des RNAi Mechanismus in der siRNA vermittelten Genregulation untersucht werden. Für die Analyse der Funktion von AgnA und AgnB wurde ein etabliertes Reportersystem verwendet, das die *cadA* mRNA als Ziel-Gen verwendet (Wiegand, 2012) (vgl. 8.8).

Im Wildtyp führt die Expression des transgenen *Hairpin*-Konstrukts zu einer Degradation der *cadA* mRNA und folglich zu einer reduzierten Proteinmenge (vgl. Abb. 62 + Abb. 63 + Abb. 65). Auch in den untersuchten KO-Stämmen ist die *cadA* mRNA- und Proteinmenge verringert. Die Stilllegung von CadA funktioniert trotz der Verluste von AgnA, AgnB und Xrn1 (vgl. Abb. 65). Lediglich in dem AgnA/B KO kommt es zu einer moderaten Derepression von CadA auf mRNA- und Proteinebene. Da die Einzel-KOs von AgnA und AgnB keine detektierbaren Auswirkungen auf die Repression von CadA haben (vgl. Abb. 65), ist es möglich, dass sich die Proteine in ihrer Funktion kompensieren können.

Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen, die für die Regulation des DIRS-1 Retrotransposons gemacht wurden, wobei AgnA und AgnB unterschiedliche Aufgaben erfüllen (vgl. 9.1). Die Herkunft der siRNAs könnte unterschiedliche Regulationsmechanismen nach sich ziehen. In *D. melanogaster* lösen exogene siRNAs, die Ähnlichkeiten mit den *cadA* siRNAs des Reportersystems besitzen, eine RNAi vermittelte Virusantwort aus, wobei durch endogene siRNAs, die mit den DIRS-1 siRNAs vergleichbar sind, dieser Mechanismus nicht ausgelöst wird (Hammond et al., 2000).

Bei der Analyse der siRNA Menge des *Hairpins* fiel auf, dass diese in allen untersuchten KO-Stämmen signifikant reduziert war (vgl. Abb. 64). Obwohl die Mengen der *cadA* siRNAs in den AgnA- und AgnB Einzel-KOs sowie dem Xrn1 KO reduziert sind, ist die Repression des CadA Proteinlevels im Vergleich zu dem Wildtyp nicht beeinträchtigt. Lediglich im Fall des Argonauten Doppel-KOs ist eine signifikante Derepression des CadA Proteins festzustellen. Im AgnA/B KO-Stamm wurde die geringste Menge an *cadA* siRNAs detektiert (vgl. Abb. 65). Möglicherweise ist in diesem Stamm die verbleibende Menge an siRNAs nicht mehr ausreichend, um eine vollständige Repression von CadA zu gewährleisten, wodurch die moderate Derepression von CadA in diesem Stamm zu erklären wäre. Die noch stark ausgeprägte Repression von CadA in dem Doppel-KO ist vermutlich auf die Anwesenheit der drei verbleibenden Argonauten Homologe in *D. discoideum* zurückzuführen, die kompensatorische Effekte im Rahmen dieses artifiziellen Systems übernehmen könnten.

Alle hier untersuchten Proteinkomponenten haben also einen Einfluss auf die Produktion von *cadA* siRNAs, ohne jedoch signifikante Funktionen in der Repression endogener mRNAs zu übernehmen. Für Argonauten Proteine konnte bereits in mehreren Organismen gezeigt werden, dass sie für die Produktion von kleinen RNAs notwendig sind. Möglicherweise kommt es im Wildtyp, aber nicht in den untersuchten KO-Stämmen, zur Bildung von sekundären siRNAs, die durch einen Amplifikationsmechanismus generiert werden: Die Argonauten Proteine könnten beispielsweise RdRPs rekrutieren, die einen komplementären Strang zu den *cadA* mRNAs synthetisieren. Die entstehenden Doppelstränge werden von einem der beiden Dicer Proteine zu siRNAs prozessiert, die sich in der Zelle anreichern.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass AgnA und AgnB für die Regulation von CadA nicht essentiell sind, aber einen signifikanten Einfluss auf die Menge der entsprechenden siRNAs haben.

9.7 Deep Sequencing Analyse des AgnA KO-Stammes

Um den Einfluss von AgnA auf das Repertoire der kleinen RNAs in *D. discoideum* zu untersuchen und mögliche regulative RNA-Spezies zu identifizieren, wurde der RNA-Pool des AgnA KOs mit Hilfe von *High Throughput* Sequenzierungen mit dem des Wildtyps verglichen. Dazu wurden im Vorfeld mit Hilfe des Nucleospin® miRNA Kits RNAs im Bereich zwischen 20 und 50 nts angereichert und

gleichzeitig tRNAs und rRNAs abgereichert (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzierungsdaten enthalten folglich nur wenige rRNA Sequenzen, die für die Fragestellung nicht weiter relevant waren.

Die Sequenzierung identifizierte einige RNA-Spezies, deren Menge im AgnA KO-Stamm deutlich an- oder abgereichert ist. Der experimentelle Nachweis der Mengenunterschiede mittels *Northern Blot* konnte die An- bzw. Abreicherung jedoch nicht in allen Fällen bestätigen.

Im Fall der Class 1a/b RNAs und bei den vollständigen tRNA Sequenzen traten Diskrepanzen zwischen den *Deep Sequencing* Resultaten und den *Northern Blot* Ergebnissen auf. Während die *Deep Sequencing* basierten Daten auf eine Anreicherung der genannten RNA-Spezies im AgnA KO hinweisen (vgl. Abb. 56), zeigten die *Northern Blot* Analysen keine Mengenunterschiede dieser RNAs im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse können methodische Ursachen haben. Für die *High Throughput* Sequenzierung wird RNA in cDNA umgeschrieben. Vor der eigentlichen cDNA Synthese muss zunächst ein *Primer* an das 3'-Ende der RNAs ligiert werden, was durch die Anwesenheit von 3'-terminalen Modifikationen der RNA beeinträchtigt werden kann. Auch posttranskriptionelle Modifikationen innerhalb der RNA-Sequenz können die reverse Transkription in cDNA beeinflussen. Für die *Northern Blot* Analysen wird die RNA chemisch an eine Membran gekoppelt, wofür eine freie Phosphatgruppe am 5'-Ende benötigt wird. Modifikationen am 5'-Ende können bei diesem Schritt die erfolgreiche Kopplung der Nukleinsäuren an die Membran beeinträchtigen (Pall et al., 2007). Der Einfluss des AgnA KOs auf die Modifikationen bestimmter RNA-Spezies wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Ausnahme der bekannten miRNAs nicht weiter untersucht. Zu beachten ist jedoch, dass die *Deep Sequencing* Analysen bisher nicht reproduziert wurden und so nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob die Unterschiede tatsächlich von biologischer Relevanz oder methodisch bedingt sind.

Für die im Folgenden aufgeführten RNA-Spezies konnten die *Deep Sequencing* Ergebnisse mit gleicher Tendenz durch *Northern Blot* Analysen bestätigt werden. Es wurde eine deutliche Anreicherung von tRNA Fragmenten im AgnA KO gefunden (vgl. Abb. 58). Die Existenz von tRNA Fragmenten konnte mittlerweile in verschiedenen Organismen nachgewiesen werden (Thompson und Parker, 2009; Haussecker et al., 2010), so auch kürzlich in *D. discoideum* (Müller, 2011). Im AgnA KO sind 5'-terminale Fragmente der tRNA Asp im Vergleich zum AX2 wt besonders stark angereichert. *Northern Blot* Analysen konnten zudem die Existenz eines ca. 34-36 nts langen 5'-Fragmentes dieser tRNA bestätigen, das im AgnA KO stark angereichert vorliegt (vgl. Abb. 59). Darüber hinaus identifizierte die Sequenzierung auch für weitere tRNAs eine moderate Anreicherung. Gleiches gilt sowohl für 35 nts lange 5'- als auch für 20 bzw. 40 nts lange 3'-tRNA Fragmente (vgl. Tab. 24 + Abb. 58). Es könnten sich bei den 5'- bzw. 3'-tRNA Fragmenten um halbe tRNAs handeln.

Eine Bestätigung der Mengenunterschiede der weiteren halben tRNAs mittels *Northern Blot* steht derzeit noch aus.

Es sind deutliche Unterschiede zwischen den tRNA Fragmenten zu verzeichnen, die im *Pull-Down* mit DnmA isoliert wurden. So fehlen die kurzen Fragmente aus dem Anticodon *stem-loop*, die als DnmA bindende Fragmente angenommen wurden (Müller, 2011), im Repertoire des AgnA KOs völlig. Dies unterstützt zumindest teilweise die Spezifität der Analyse.

In *S. cerevisiae* prozessiert Rny1p, ein Protein der T2 RNase-Familie, Volllänge tRNAs als Reaktion auf oxidativen Stress in tRNA Fragmente. Infolgedessen treten 3'-tRNA Fragmente in der Zelle auf, die die Apoptose des Organismus initiieren (Thompson und Parker, 2009). Die *in silico* Suche nach möglichen Rny1p Homologen in *D. discoideum* ergab zwei Treffer: Es handelt sich um die Gene *ddiA* und *DDB_G0295845*. Letzteres kodiert für ein Homolog der Ribonuklease T2. Beide Proteine könnten an der Produktion solcher tRNA Fragmente in *D. discoideum* beteiligt sein. Da die Zunahme von tRNA Fragmenten im AgnA KO nicht letal ist, wie eben für *S. cerevisiae* beschrieben, bleibt zu klären, ob die Fragmente in einem ähnlichen Prozess entstehen.

In HeLa Zellen konnten 20 nts lange 5'-tRNA Fragmente identifiziert werden, die Dicer-abhängig sind (Cole et al., 2009). Für diese Fragmente konnte eine schwache Interaktion mit Argonauten Proteinen nachgewiesen werden (Cole et al., 2009). Im Gegensatz dazu werden 3'-tRNA Fragmente, die durch RNaseZ generiert werden, spezifisch von den humanen Argonauten Proteinen Ago2 und Ago4 gebunden (Haussecker et al., 2010). Diese Fragmente konkurrieren vermutlich mit miRNAs und siRNAs um die Bindung an Argonauten Proteine und ermöglichen so eine regulative Feinabstimmung der RNA vermittelten Signalwege (Haussecker et al., 2010). Einige postulierte humane miRNAs sind vermutlich falsch positiv, da sie zwar ähnliche Charakteristika zeigen, aber von tRNAs abstammen (Schopman et al., 2010). Die tRNA Fragmente in *D. discoideum* könnten ähnliche Funktionen besitzen, da sie im AgnA KO-Stamm deutlich angereichert sind. Um diese Vermutung weiter zu stützen, müssten allerdings Co-IPs durchgeführt werden, die zeigen, dass AgnA tatsächlich mit tRNAs interagiert. Möglicherweise werden die tRNA Fragmente anstelle von miRNAs degradiert, was ebenfalls ein Ansatzpunkt für die Regulation von RNA vermittelten Signalwegen sein könnte.

In *Tetrahymena* wurden ebenfalls zwei unterschiedliche tRNA Fragment-Spezies identifiziert, die mit dem Piwi-Protein Twi12 interagieren (Couvillion et al., 2010). Die 5'-Fragmente sind, ähnlich wie die aus *D. discoideum*, 25-30 nts lang und die 3'-Fragmente besitzen in beiden Organismen eine Länge von ungefähr 18-22 nts. Ribonukleotidproteinkomplexe bestehend aus Twi12 und tRNA Fragmenten sind vermutlich für die Qualitätskontrolle und Degradation von tRNAs verantwortlich (Couvillion et al., 2010; Phizicky und Hopper, 2010). Die Produktion der tRNA Fragmente ist in *D. discoideum* unabhängig von AgnA, da sie im AgnA KO angereichert vorliegen. AgnA könnte, wie Twi12 aus

Tetrahymena, die Fragmente binden (Couvillion et al., 2010) und die weitere Degradation dieser veranlassen. Für die Überprüfung dieser Hypothese sind noch weitere Experimente notwendig.

Neben den angereicherten tRNA Fragmenten konnte die in *Northern Blots* gezeigte Anreicherung der miRNAs mica1190 und mica1198 durch *Deep Sequencing* Analysen verifiziert werden. Mögliche biologische Ursachen dieser Anreicherung wurden bereits in Abschnitt 9.3 diskutiert. Die Sequenzierungsdaten weisen im Vergleich zu den *Northern Blot* Daten auf eine 60fache Anreicherung der mica1190 und eine zehnfache Anreicherung der mica1198 im AgnA KO hin. In beiden Fällen ist die Anreicherung um Faktor zehn höher als die in den *Northern Blots* detektierte (vgl. 8.5). Wie bereits erwähnt könnten diese Diskrepanzen durch eine höhere Sensitivität der *High Throughput* Sequenzierung erklärt werden. Eine unabhängige Quantifizierung der miRNA Menge mittels *Real-time* RT-PCR schlug auf Grund zu hoher Hintergrundsignale fehl.

Die Sequenzierung identifizierte darüber hinaus weitere RNA Spezies, die in dem AgnA KO Stamm angereichert sind. Sie können sowohl intergenischen Sequenzen als auch Introns zugeordnet werden. Die Anreicherung der RNAs 5B und 6F konnte zudem mit Hilfe von *Northern Blots* verifiziert werden (vgl. Tab. 25 + Abb. 60 + Abb. 61). Es könnte sich dabei um putative neue miRNAs handeln, da sie eine entsprechende Größe aufweisen und zudem strangspezifisch sind. Im Fall der 6F RNA könnte es sich um ein *mirtron* handeln, da diese im Intron eines Gens vorliegt (vgl. 4.3). Im Fall der weiteren gefundenen RNA Spezies wurden keine Signale bei *Northern Blot* Analysen detektiert.

9.8 Interaktionspartner von AgnA und AgnB

Als Teil von Multiproteinkomplexen interagieren Argonauten Proteine mit unterschiedlichen Faktoren, die sie bei der Genregulation unterstützen und den Modus der Kontrolle beeinflussen. Die Funktionen und Aufgaben der Argonauten Proteine in *D. discoideum* waren weitgehend unbekannt. Was AgnA und AgnB betrifft, so konnten in den entsprechenden *Knockout*-Stämmen insbesondere auf RNA Ebene Phänotypen beobachtet werden, die Analogien zu bereits beschriebenen RNAi Mechanismen zeigen. Derzeit ist noch unklar, ob homologe Faktoren an der Wirkungsweise der kleinen regulativen RNA-Spezies in *D. discoideum* beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden *Pull-Down* Experimente mit Argonauten Proteinen durchgeführt, um interagierende Faktoren zu identifizieren und mögliche Rekrutierungsmodelle, wie z.B. das der RrpC bei der Regulation von DIRS-1, zu untersuchen.

Für die Identifikation von möglichen Interaktionspartnern von AgnA und AgnB wurden zunächst Zelllinien generiert, die die Argonauten Proteine ektopisch als GFP-markierte bzw. HA-markierte Fusionsproteine exprimieren (vgl. 8.2). Dies ermöglichte zudem die Bestimmung der Lokalisation der Proteine in der Zelle. In Zelllinien, die ein AgnA Fusionsprotein exprimieren, konnte eine

cytoplasmatische Lokalisation des Proteins nachgewiesen werden (Meier, 2010). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Zelllinien mit N-terminal bzw. C-terminal HA-markiertem AgnB konnte eine heterogene Verteilung sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus der Zelle nachgewiesen werden (vgl. Abb. 19). Die Hauptmenge des Proteins liegt im Cytoplasma der Zelle vor, was darauf hindeutet, das AgnB dort Funktionen übernimmt. Es sind granuläre Strukturen erkennbar, bei denen es sich teilweise um Co-Lokalisationen mit Mitochondrien handeln könnte. Des Weiteren könnten die Strukturen auf *P-bodies* hinweisen, deren Existenz in *D. discoideum* jedoch noch nicht nachgewiesen wurde. Die verwendeten AgnB Fusionsproteine lokalisieren in Abhängigkeit von der Lage des GFP-Tags im Nukleus bzw. im Cytoplasma (vgl. 8.2). Die tatsächliche Lokalisation des endogenen Proteins bleibt damit noch unklar.

Für die Isolierung putativer Interaktionspartner erfolgte die affinitätschromatographische Aufreinigung der GFP Fusionsproteine mittels einer GFP NanoTrap der Firma Chromotek. Zur Stabilisierung von Protein-Protein-Interaktionen, insbesondere von Komponenten eines möglichen Effektor-Komplexes, wurde im ersten Experiment ein *in vivo Crosslinking* mit dem chemischen Quervernetzer DTBP durchgeführt. Der Quervernetzer kann mit seiner *Linker*-Länge von 12 Å auch indirekte Protein-Protein Interaktionen verknüpfen. In *D. discoideum* konnten mit DTBP bereits spezifische Protein-Protein Interaktionen stabilisiert werden (Dubin et al., 2011).

Es erfolgte eine MS-Analyse der Elutionsfraktionen, bei der neben den rekombinanten Argonauten eine Vielzahl weiterer Proteine identifiziert werden konnten (vgl. Abb. 54 + Tab. 20 + Tab. 21). Bei der Auswertung der Daten wurde besonders auf AgnA- bzw. AgnB-spezifische Interaktionspartner geachtet, da die beiden Proteine bei der DIRS-1 Regulation und dem miRNA Signalweg unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Mit den N-terminal sowie C-terminal markierten AgnA Protein konnten zehn Proteine isoliert werden, die weder in der Negativ-Kontrolle noch in den Proben von AgnB gemessen wurden (vgl. Tab. 20). Hierbei zeigten die Proteine DDB_G0268914 und DDB_G0269138 (fttB) eine gute Peptidabdeckung und die meisten gemessenen Peptide neben den Fusionsproteinen in den Elutionsfraktionen von AgnA-GFP und GFP-AgnA auf.

DDB_G0269138 kodiert für das 14-3-3 Protein Epsilon, welches für die Zelldynamik und für die Organisation des Actin-Cytoskelettsystems während der Cytokinese verantwortlich ist (Zhou et al., 2010). In humanen HeLa Zellen, die mit Retroviren infiziert wurden, konnte eine Interaktion von Actin und assoziierten Proteinen mit Ago1 und Ago2 nachgewiesen werden. Die Actin Filamente vermittelt den Transport eines RITS-ähnlichen Komplexes, der ein Argonauten Protein enthält, innerhalb des Zellkerns und unterstützen diesen so bei der transkriptionellen Genregulation (Ahlenstiel et al., 2011). Ob eine solche Interaktion in *D. discoideum* auftritt ist fraglich, da noch kein Nachweis der Genregulation durch RITS erbracht werden konnte.

Das Protein DDB_G0268914 besitzt eine Protein-Domäne, die der DNA2/NAM7 Helicase Familie zugeordnet werden kann. Die Funktion des Proteins in *D. discoideum* ist noch nicht untersucht. Bei der *in silico* Suche nach möglichen Homologen aus anderen Organismen konnten u.a. die Proteine MOV10 und UPF-1 aus *H. sapiens*, die beide der DNA2/NAM7 Helicase Familie angehören, identifiziert werden. In humanen Zellen wurde mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen und anschließender MS-Analysen MOV10 als Interaktionspartner von Ago1 und Ago2 identifiziert (Hock et al., 2007). Interessanterweise konnte MOV10 in humanen 293T Zellen als ein Negativ-Regulator des HIV-1 Retrovirus charakterisiert werden. In Zelllinien, die MOV10 ektopisch exprimieren, wurde eine reduzierte Stabilität des HIV-1 GAG Proteins und eine Inhibierung der Reversen Transkriptase des Virus festgestellt (Burdick et al., 2010). UPF-1 aus *H. sapiens* ist an dem *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) beteiligt, bei dem mRNAs erkannt werden, bei denen während der Transkription vorzeitige Stopp-Codons entstanden sind (Lewis et al., 2003). Zu diesen fehlerhaften Transkripten werden zusätzliche Faktoren rekrutiert, die die Degradation der mRNA initiieren (Fenger-Gron et al., 2005).

Da AgnA entscheidend für die Regulation des DIRS-1 Retrotransposons ist, liegt die Vermutung nahe, dass DDB_G0268914 es bei seiner Funktion unterstützt. Es ist denkbar, dass AgnA DDB_G0268914 zu DIRS-1 Transkripten dirigiert und so zu einer reduzierten reversen Transkription führt.

Bei der Co-Immunpräzipitation konnten 35 AgnB spezifische putative Interaktionspartner identifiziert werden. Dabei gab es jedoch starke Unterschiede zwischen dem N-terminal und dem C-terminal markiertem AgnB Protein (vgl. Tab. 21). Es ist zu beachten, dass diese beiden Proteine unterschiedlich in der Zelle lokalisieren, wie oben bereits erwähnt (vgl. 8.2). In dem *Pull-Down* mit GFP-AgnB konnten die zwei *Heat Shock* Proteine HSP70 und Dj1 identifiziert werden, die jedoch mit dem C-terminal markierten AgnB nicht isoliert werden konnten. Interaktionen von Argonauten Proteinen mit *Heat Shock* Proteinen sind auch aus anderen Organismen bekannt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass alle humanen Argonauten mit Proteinen aus der HSP90 Familie interagieren (Landthaler et al., 2008). HSP90 wird für die Aktivität des humanen Ago2 in *P-bodies* benötigt, da es das Argonauten Protein zu diesen Strukturen leitet (Pare et al., 2009).

Verwendet man AgnB-GFP als *Bait*-Protein, können die beiden Proteine DetA und RepE mit einer guten Peptidabdeckung und den meisten gemessenen Peptiden neben den Fusionsproteinen identifiziert werden (vgl. Tab. 21). Die Assoziation dieser zwei Faktoren mit AgnB bleibt auch unter stringenteren Bedingungen erhalten (siehe unten). DetA übernimmt Aufgaben bei der Steuerung von Entwicklungsprozessen, da es als transkriptioneller Repressor von *Prestalk*-Genen fungiert. RepE ist dagegen Teil eines DNA Reparaturkomplexes, der DNA Schäden, hervorgerufen durch UV-Licht, behebt. Die Interaktion von DetA mit RepE konnte *in vivo* bereits durch Co-Immunpräzipitationen

bestätigt werden (Dubin et al., 2011). In Pflanzen und *S. pombe* konnten die Interaktionen der Homologe der beiden Proteine ebenfalls identifiziert werden (Schroeder et al., 2002; Hong et al., 2005). AgnB könnte DetA bei der transkriptionellen Genregulation während der Entwicklung unterstützen. Die Expression von AgnB ist zu diesem Zeitpunkt am höchsten, was dafür sprechen könnte, dass das Protein wichtige Funktionen während des Entwicklungszyklus ausübt (Rot et al., 2009) (vgl. <http://dictyexpress.biolab.si/>).

Trotz der unterschiedlichen Lokalisation von GFP-AgnB und AgnB-GFP in der Zelle konnten putative Interaktionspartner identifiziert werden, die mit beiden Fusionsproteinen isoliert werden konnten. Dabei handelt es sich um Porin3, DDB_G0281605 (*Counting factor associated protein*) und um DDB_G0278179 (*Myb domain-containing protein*).

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde die Isolierung möglicher Interaktionspartner mit einem veränderten Protokoll wiederholt. Dabei wurde ein *in vivo* UV-Crosslinking durchgeführt und ein stringenteres Waschprotokoll verwendet, um unspezifische Interaktionen zu vermeiden. Im Gegensatz zum chemischen Crosslinking werden durch die Verwendung von UV-Licht nur direkte Protein-Protein Interaktionen durch Ausbildung von kovalenten Bindungen stabilisiert. Bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Elutionsfraktionen konnte im Fall von GFP-AgnA und AgnA-GFP weder DDB_G0268914 noch DDB_G0269138 identifiziert werden (vgl. Abb. 55 + Tab. 22). Möglicherweise waren die stringenteren Waschbedingungen bzw. das veränderte Crosslinking ausschlaggebend dafür, dass die Protein-Protein Interaktionen nicht mehr nachweisbar sind. Dies könnte bedeuten, dass die Interaktion von AgnA zu den beiden Proteinen transient bzw. indirekt ist. Für die Überprüfung dieser Hypothese könnten wechselseitige Co-Immunpräzipitations- und Co-Lokalisations-Studien durchgeführt werden.

In den Proben wurden einige ribosomale Proteine und Isomerasen gefunden (vgl. Tab. 22), die möglicherweise bei der Proteinsynthese des Fusionsproteins mit dem naszierenden Peptidstrang kovalent gebunden wurden. Beim *Pull-Down* von GFP-AgnB konnten ebenfalls keine der vormals identifizierten Proteine nachgewiesen werden. Auch hier wurden ribosomale Proteine und Isomerasen nachgewiesen, die ebenfalls bei der Translation des AgnB Proteins mit diesen verbunden wurden.

Im Gegensatz dazu konnten die Proteine DetA und RepE auch mit dem alternativen Aufreinigungsprotokoll als mögliche Interaktionspartner von AgnB-GFP identifiziert werden (vgl. Tab. 24). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass AgnB, sofern das endogene Protein tatsächlich im Nukleus lokalisiert, mit DetA und RepE interagieren kann. Da AgnB je nach Position des *Tags* unterschiedlich lokalisiert, ist jedoch unklar, in welchem Kompartiment AgnB tatsächlich vorliegt.

Bei einer erneuten Transformation des Plasmids pDneo2a-AgnB-GFP in den Wildtypstamm konnte die dominante Kernlokalisierung nicht reproduziert werden (vgl. 8.2). In der neu generierten Zelllinie zeigt das Protein eine heterogene Verteilung sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus der Zelle. Im Cytoplasma sind einige granuläre Strukturen erkennbar, was dem Phänotyp von GFP-AgnB entspricht. Bei der Analyse der AgnB-GFP Fusionsproteine aus den unabhängigen transformierten Zellen zeigte sich, dass das im Nukleus lokalisierte Fusionsprotein in der gelelektrophoretischen Auftrennung ca. 10 kDa schneller migriert, während das Migrationsverhalten des Fusionsproteins aus der zweiten Transformation dem theoretisch erwarteten Molekulargewicht entspricht (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise fehlt im ersten Fall ein Teil vom N-Terminus des AgnB Fusionsproteins, da in der Massenspektrometrie keine Peptide in diesem Bereich identifiziert werden konnten. Da AgnB über vier Exons und drei Introns verfügt und in *D. discoideum* alternatives Spleißen vorkommt (Grant et al., 1990), sind unterschiedliche Spleiß-Varianten von AgnB durchaus denkbar. Diese Möglichkeit ist jedoch insofern fraglich, da mögliche Spleißvarianten weder mit der Größe des detektierten Proteins noch mit den massenspektrometrischen Daten in Übereinstimmung gebracht werden können.

Die hier präsentierten Daten vermitteln erste Einblicke in die Funktion und Wirkweise der Argonauten Proteine AgnA und AgnB, insbesondere was den Mechanismus zur Stilllegung des Retrotransposons DIRS-1 betrifft. Die Ergebnisse in Bezug auf die miRNAs und putativen Interaktionspartner von AgnA und AgnB tragen zum Verständnis und zur Aufklärung von RNA vermittelten Signalwege in *D. discoideum* bei.

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den 8.8.2012

Benjamin Boesler

11 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AS	Aminosäure
Abb	Abbildung
Ago	Argonaute
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSr	Blasticidinresistenz
C	Cytosin
casIRNA	<i>cis-acting</i> siRNA
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Chr	Chromosom
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
dd	Bidestilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
ds	Doppelsträngig
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektroporation
G	Guanin
G418	Geneticin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTP	Guanisintriphosphat
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks Krebszellen
HEPES	2-(4-/2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KA	<i>Klebsiella aerogenes</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>

LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	<i>micro RNA</i>
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MP	Millipore
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NES	Kernexportsignal
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NMD	<i>nonsense mediated mRNA decay</i>
NP40	Nonident®P40
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Offener Leserahmen)
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	Piwi, Argonaute, Zwillie
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i>
Piwi	<i>P-element induced wimpy testis</i>
PNK	Polynukleotidkinase
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RdRP	RNA abhängige RNA Polymerase
RH	RNase H
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RITS	<i>RNA-induced transcriptional silencing</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rNTP	Ribonukleotid
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SM	Standardmedium
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)

T	Thymin
tasiRNA	<i>trans-acting</i> RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
u	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
°C	Grad Celsius

12 Anhang

12.1 Bindepositionen der verwendeten Sonden für das Skipper Retrotransposon

Erkennen die verwendeten Sonden den Plus-Strang so sind sie oberhalb dargestellt. Wenn die Sonden den Minus-Strang erkennen sind die unterhalb abgebildet.



Abb. 67: Hybridisierung der Oligonukleotide zum Nachweis der Skipper Transkripte

Schematische Darstellung der Bindeposition der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis der Skipper Transkripte. Verwendete Oligonukleotide: Skipper 3' stem, -5' stem und -loop.

12.2 Bindepositionen der verwendeten Sonden für das DIRS-1 Retrotransposon

Erkennen die verwendeten Sonden den Plus-Strang so sind sie oberhalb dargestellt. Wenn die Sonden den Minus-Strang erkennen sind die unterhalb abgebildet.

DIRS-1

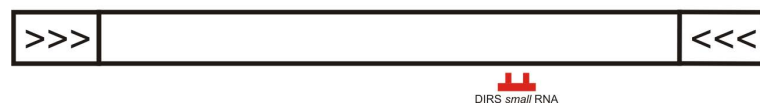


Abb. 68: Hybridisierung des Oligonukleotids DIRS small RNA zum Nachweis von DIRS-1 siRNAs

Schematische Darstellung der Bindeposition des verwendeten Oligonukleotids zum Nachweis der DIRS-1 siRNAs. Verwendetes Oligonukleotid: DIRS small RNA (#2599).

DIRS-1



Abb. 69: Hybridisierung der *in vitro* Transkripte DIRS-1 LE zum Nachweis von DIRS-1 siRNAs

Schematische Darstellung der Bindeposition der verwendeten *in vitro* Transkripte zum Nachweis der DIRS-1 siRNAs. Verwendete *in vitro* Transkripte: DIRS-1 LE sense und DIRS-1 LE antisense.



Abb. 70: Hybridisierung der Oligonukleotide zum Nachweis von DIRS-1 *sense* Transkripten/extrachromosomaler DIRS-1 DNA

Schematische Darstellung der Bindepositionen der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis der DIRS-1 *sense* Transkripte/der extrachromosomalen DIRS-1 DNA. Verwendete Oligonukleotide: Primer 1 = BB141 (#2916), Primer 3 = BB145 (#2920) und Primer 7 = BB153 (#2928).

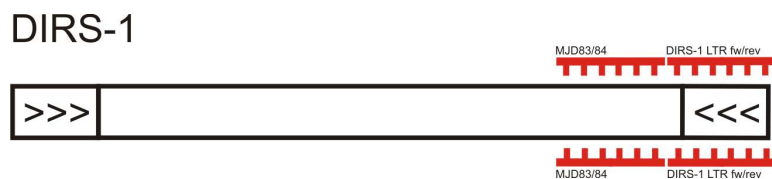


Abb. 71: Hybridisierung der OLB-Sonden zum Nachweis von DIRS-1 extrachromosomaler DNA

Schematische Darstellung der Bindepositionen der verwendeten OLB-Sonden zum Nachweis der DIRS-1 extrachromosomalen DNA. Verwendete OLB-Sonden: DIRS-1 LTR fw/DIRS-1 LTR rev (#896/#897) und MJD83/MJD84 (#1927/#1928).

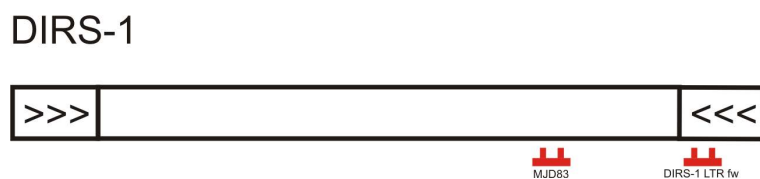


Abb. 72: Hybridisierung der Oligonukleotide zum Nachweis von DIRS-1 extrachromosomaler DIRS-1 DNA (Minus-Strang)

Schematische Darstellung der Bindepositionen der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis der DIRS-1 extrachromosomalen DNA (Minus-Strang). Verwendete Oligonukleotide: DIRS-1 LTR fw (#896) und MJD83 (#1927).

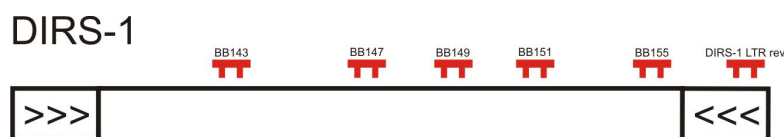


Abb. 73: Hybridisierung der Oligonukleotide zum Nachweis von DIRS-1 extrachromosomaler DIRS-1 DNA (Plus-Strang)

Schematische Darstellung der Bindepositionen der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis der DIRS-1 extrachromosomalen DNA (Plus-Strang). Verwendete Oligonukleotide: DIRS-1 LTR rev (#897), BB143 (#2918), BB147 (#2922), BB149 (#2924), BB151 (#2926) und BB155 (#2930).

DIRS-1

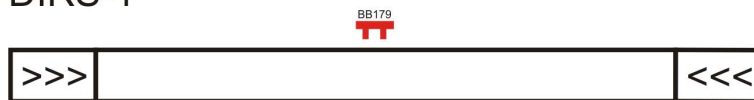


Abb. 74: Hybridisierung des Oligonukleotids BB179 zum Nachweis von DIRS-1 siRNAs

Schematische Darstellung der Bindeposition des verwendeten Oligonukleotids zum Nachweis der DIRS-1 siRNAs. Verwendetes Oligonukleotid: BB179 (#2954).

12.3 Bindepositionen der Primer für die Quantifizierung von DIRS-1 Transkripten



Abb. 75: Bindepositionen der Primer für die Quantifizierung von DIRS-1 Transkripten

Schematische Darstellung der Bindeposition der verwendeten Oligonukleotide zur relativen Quantifizierung der Transkripte von DIRS-1 mittels *Real-time* RT-PCR. Verwendete Oligonukleotide: DIRS-1 LE (Primern #2981/#2982) und ORF II (Primer #1927/#1928).

13 Summary

Argonaute proteins are key players in RNA mediated gene regulation pathways. This protein family is highly conserved in eukaryotes and the genome of *D. discoideum* encodes five homologues. I studied the function of AgnA and AgnB in different gene regulation pathways in the social amoeba.

AgnA is essential for posttranscriptional regulation of the LTR retrotransposon DIRS-1. The Argonaute protein is necessary for the generation of about 90 % of all DIRS-1 siRNAs, but the exact mechanism has not yet been elucidated: it could be that the slicer activity of AgnA is necessary for the production of DIRS-1 siRNAs or that the protein recruits other factors that are involved in the siRNA processing.

The reduction of DIRS-1 siRNAs in agnA knockout strains could be confirmed by high throughput sequencing and by northern blot studies. In addition, the agnA DIRS-1 transcripts accumulate in the knockout strain and extrachromosomal DIRS-1 cDNA is detectable. AFM studies showed, that the single stranded extrachromosomal DNA is associated with proteins. Together they probably build up virus-like particles. The interaction of AgnA with the human MOV10 homologue suggests that AgnA is also involved in the inhibition DIRS-1 cDNA synthesis. However, a transposition of DIRS-1 could not be observed in the AgnA knockout strain.

AgnB seems to be a positive regulator in the DIRS-1 replication mechanism, since it supports the production of DIRS-1 extrachromosomal DNA.

Skipper siRNAs are enriched in agnA knock strains, but not in agnB knockout strains. In the AX2 wildtype and in AgnA and AgnB knockout strains, we detected two transcripts, that may be precursors of Skipper siRNAs.

The amount of two miRNAs was determined in different mutant strains and it could be shown, that both miRNAs are enriched in agnA knockout strains. High throughput sequencing experiments confirmed the observation. In rescue strains of agnA the amount of miRNAs is reduced to wild type level.

High throughput sequencing revealed, that some tRNA fragments are enriched in the agnA knockout strain. In Northern Blot analysis one additional tRNA Asp fragment could be observed in the AgnA knockout-strain. We hypothesise that the AgnA protein is involved in tRNA turnover.

In summary, the role of the Argonaute proteins AgnA and AgnB in siRNA and miRNA biogenesis has been investigated and we could show that both proteins are important players in RNA mediated gene regulation.

14 Literaturverzeichnis

- Ahlenstiel, C. L., H. G. Lim, D. A. Cooper, T. Ishida, A. D. Kelleher und K. Suzuki (2011). "Direct evidence of nuclear Argonaute distribution during transcriptional silencing links the actin cytoskeleton to nuclear RNAi machinery in human cells." *Nucleic Acids Res* **40**(4): 1579-95.
- Allen, E., Z. Xie, A. M. Gustafson und J. C. Carrington (2005). "microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants." *Cell* **121**(2): 207-21.
- Ambros, V., R. C. Lee, A. Lavanway, P. T. Williams und D. Jewell (2003). "MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*." *Curr Biol* **13**(10): 807-18.
- Aravin, A. A., G. J. Hannon und J. Brennecke (2007). "The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race." *Science* **318**(5851): 761-4.
- Aravin, A. A., M. S. Klenov, V. V. Vagin, F. Bantignies, G. Cavalli und V. A. Gvozdev (2004). "Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6742-50.
- Aravin, A. A., N. M. Naumova, A. V. Tulin, V. V. Vagin, Y. M. Rozovsky und V. A. Gvozdev (2001). "Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline." *Curr Biol* **11**(13): 1017-27.
- Aspegren, A., A. Hinas, P. Larsson, A. Larsson und F. Soderbom (2004). "Novel non-coding RNAs in *Dictyostelium discoideum* and their expression during development." *Nucleic Acids Res* **32**(15): 4646-56.
- Avesson, L. (2011). "Ancient Roles of Non-coding RNAs in Eukaryotic Evolution." *Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Molecular Biology Uppsala* (Doctoral Thesis).
- Avesson, L., H. T. Schumacher, P. Fechter, P. Romby, U. Hellman und F. Soderbom (2011). "Abundant class of non-coding RNA regulates development in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." *RNA Biol* **8**(6): 1094-104.
- Axtell, M. J., C. Jan, R. Rajagopalan und D. P. Bartel (2006). "A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants." *Cell* **127**(3): 565-77.
- Babiarz, J. E., J. G. Ruby, Y. Wang, D. P. Bartel und R. Blelloch (2008). "Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs." *Genes Dev* **22**(20): 2773-85.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* **136**(2): 215-33.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork und E. Izaurralde (2006). "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes." *Genes Dev* **20**(14): 1885-98.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond und G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**(6818): 363-6.
- Birboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bohmert, K., I. Camus, C. Bellini, D. Bouchez, M. Caboche und C. Benning (1998). "AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development." *Embo J* **17**(1): 170-80.
- Boland, A., E. Huntzinger, S. Schmidt, E. Izaurralde und O. Weichenrieder (2011). "Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(26): 10466-71.
- Boutet, S., F. Vazquez, J. Liu, C. Beclin, M. Fagard, A. Gratias, J. B. Morel, P. Crete, X. Chen und H. Vaucheret (2003). "Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance." *Curr Biol* **13**(10): 843-8.

- Bouttier, M., A. Saumet, M. Peter, V. Courgnaud, U. Schmidt, C. Cazevieuille, E. Bertrand und C. H. Lecellier (2012). "Retroviral GAG proteins recruit AGO2 on viral RNAs without affecting RNA accumulation and translation." *Nucleic Acids Res* **40**(2): 775-86.
- Brennecke, J., A. A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis, R. Sachidanandam und G. J. Hannon (2007). "Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*." *Cell* **128**(6): 1089-103.
- Brennecke, J., A. Stark, R. B. Russell und S. M. Cohen (2005). "Principles of microRNA-target recognition." *PLoS Biol* **3**(3): e85.
- Burdick, R., J. L. Smith, C. Chaipan, Y. Friew, J. Chen, N. J. Venkatachari, K. A. Delviks-Frankenberry, W. S. Hu und V. K. Pathak (2010). "P body-associated protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages." *J Virol* **84**(19): 10241-53.
- Cai, X., C. H. Hagedorn und B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." *Rna* **10**(12): 1957-66.
- Cappello, J., S. M. Cohen und H. F. Lodish (1984). "Dictyostelium transposable element DIRS-1 preferentially inserts into DIRS-1 sequences." *Mol Cell Biol* **4**(10): 2207-13.
- Cappello, J., K. Handelsman und H. F. Lodish (1985). "Sequence of Dictyostelium DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence." *Cell* **43**(1): 105-15.
- Carthew, R. W. und E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* **136**(4): 642-55.
- Cerutti, H. und J. A. Casas-Mollano (2006). "On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man." *Curr Genet* **50**(2): 81-99.
- Chang, L. J., R. C. Hirsch, D. Ganem und H. E. Varmus (1990). "Effects of insertional and point mutations on the functions of the duck hepatitis B virus polymerase." *J Virol* **64**(11): 5553-8.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura und R. Shiekhattar (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* **436**(7051): 740-4.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Cogoni, C., J. T. Irelan, M. Schumacher, T. J. Schmidhauser, E. U. Selker und G. Macino (1996). "Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation." *Embo J* **15**(12): 3153-63.
- Cohen, S. M., J. Cappello und H. F. Lodish (1984). "Transcription of Dictyostelium discoideum transposable element DIRS-1." *Mol Cell Biol* **4**(11): 2332-40.
- Cole, C., A. Sobala, C. Lu, S. R. Thatcher, A. Bowman, J. W. Brown, P. J. Green, G. J. Barton und G. Hutvagner (2009). "Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs." *Rna* **15**(12): 2147-60.
- Coleman, J., A. Hirashima, Y. Inokuchi, P. J. Green und M. Inouye (1985). "A novel immune system against bacteriophage infection using complementary RNA (micRNA)." *Nature* **315**(6020): 601-3.
- Couvillion, M. T., R. Sachidanandam und K. Collins (2010). "A growth-essential Tetrahymena Piwi protein carries tRNA fragment cargo." *Genes Dev* **24**(24): 2742-7.
- Czech, B. und G. J. Hannon (2011). "Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes." *Nat Rev Genet* **12**(1): 19-31.
- Davis, E., F. Caiment, X. Tordoir, J. Cavaille, A. Ferguson-Smith, N. Cockett, M. Georges und C. Charlier (2005). "RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted *Rtl1/Peg11* locus." *Curr Biol* **15**(8): 743-9.
- Deng, W. und H. Lin (2002). "miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis." *Dev Cell* **2**(6): 819-30.
- Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting und G. J. Hannon (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-5.

- Diederichs, S. und D. A. Haber (2007). "Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression." *Cell* **131**(6): 1097-108.
- Diederichs, S., S. Jung, S. M. Rothenberg, G. A. Smolen, B. G. Mlody und D. A. Haber (2008). "Coexpression of Argonaute-2 enhances RNA interference toward perfect match binding sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(27): 9284-9.
- Dubin, M. (2010). "Nuclear organisation and epigenetic regulation of gene expression in *Dictyostelium discoideum*." *Kassel University*(Doctoral Thesis).
- Dubin, M., J. Fuchs, R. Graf, I. Schubert und W. Nellen (2010). "Dynamics of a novel centromeric histone variant CenH3 reveals the evolutionary ancestral timing of centromere biogenesis." *Nucleic Acids Res* **38**(21): 7526-37.
- Dubin, M. und W. Nellen (2010). "A versatile set of tagged expression vectors to monitor protein localisation and function in *Dictyostelium*." *Gene* **465**(1-2): 1-8.
- Dubin, M. J., S. Kasten und W. Nellen (2011). "Characterization of the *Dictyostelium* homolog of chromatin binding protein DET1 suggests a conserved pathway regulating cell type specification and developmental plasticity." *Eukaryot Cell* **10**(3): 352-62.
- Eichinger, L., J. A. Pachebat, G. Glockner, M. A. Rajandream, R. Sucgang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B. A. Konfortov, F. Rivero, A. T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M. A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabbinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E. C. Cox, R. L. Chisholm, R. Gibbs, W. F. Loomis, M. Platzer, R. R. Kay, J. Williams, P. H. Dear, A. A. Noegel, B. Barrell und A. Kuspa (2005). "The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." *Nature* **435**(7038): 43-57.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber und T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* **411**(6836): 494-8.
- Elkayam, E., C. D. Kuhn, A. Tocilj, A. D. Haase, E. M. Greene, G. J. Hannon und L. Joshua-Tor (2012). "The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a." *Cell*.
- Eulalio, A., J. Rehwinkel, M. Stricker, E. Huntzinger, S. F. Yang, T. Doerks, S. Dorner, P. Bork, M. Boutros und E. Izaurralde (2007). "Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing." *Genes Dev* **21**(20): 2558-70.
- Faix, J., L. Kreppel, G. Shaulsky, M. Schleicher und A. R. Kimmel (2004). "A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system." *Nucleic Acids Res* **32**(19): e143.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132**(1): 6-13.
- Fenger-Gron, M., C. Fillman, B. Norrild und J. Lykke-Andersen (2005). "Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping." *Mol Cell* **20**(6): 905-15.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.
- Flavell, A. J. (1984). "Role of reverse transcription in the generation of extrachromosomal copia mobile genetic elements." *Nature* **310**(5977): 514-6.
- Földesi, B. (2010). "Posttranslationale Chromatin-Modifikationen in *Dictyostelium discoideum*." *Universität Kassel*(Doktorarbeit).

- Ghildiyal, M., H. Seitz, M. D. Horwich, C. Li, T. Du, S. Lee, J. Xu, E. L. Kittler, M. L. Zapp, Z. Weng und P. D. Zamore (2008). "Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells." *Science* **320**(5879): 1077-81.
- Ghildiyal, M. und P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." *Nat Rev Genet* **10**(2): 94-108.
- Giesler, S. (2011). "Herstellung rekombinanter Antikörper mithilfe des Antikörper-Phagendisplays." *Universität Kassel*(Diplomarbeit).
- Glockner, G. und A. J. Heidel (2009). "Centromere sequence and dynamics in *Dictyostelium discoideum*." *Nucleic Acids Res* **37**(6): 1809-16.
- Glockner, G., K. Szafranski, T. Winckler, T. Dinger, M. A. Quail, E. Cox, L. Eichinger, A. A. Noegel und A. Rosenthal (2001). "The complex repeats of *Dictyostelium discoideum*." *Genome Res* **11**(4): 585-94.
- Grant, C. E., G. Bain und A. Tsang (1990). "The molecular basis for alternative splicing of the CABP1 transcripts in *Dictyostelium discoideum*." *Nucleic Acids Res* **18**(18): 5457-63.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch und R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* **432**(7014): 235-40.
- Gunawardane, L. S., K. Saito, K. M. Nishida, K. Miyoshi, Y. Kawamura, T. Nagami, H. Siomi und M. C. Siomi (2007). "A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*." *Science* **315**(5818): 1587-90.
- Hall, I. M., K. Noma und S. I. Grewal (2003). "RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 193-8.
- Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell und D. Baulcombe (2002). "Two classes of short interfering RNA in RNA silencing." *Embo J* **21**(17): 4671-9.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach und G. J. Hannon (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." *Nature* **404**(6775): 293-6.
- Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin und V. N. Kim (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." *Genes Dev* **18**(24): 3016-27.
- Haussecker, D., Y. Huang, A. Lau, P. Parameswaran, A. Z. Fire und M. A. Kay (2010). "Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing." *Rna* **16**(4): 673-95.
- He, X. J., T. Chen und J. K. Zhu (2011). "Regulation and function of DNA methylation in plants and animals." *Cell Res* **21**(3): 442-65.
- Hernandez-Pinzon, I., M. Cifuentes, E. Henaff, N. Santiago, M. L. Espinas und J. M. Casacuberta (2012). "The Tnt1 retrotransposon escapes silencing in tobacco, its natural host." *PLoS One* **7**(3): e33816.
- Herr, A. J., M. B. Jensen, T. Dalmay und D. C. Baulcombe (2005). "RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA." *Science* **308**(5718): 118-20.
- Hinas, A., J. Reimegard, E. G. Wagner, W. Nellen, V. R. Ambros und F. Soderbom (2007). "The small RNA repertoire of *Dictyostelium discoideum* and its regulation by components of the RNAi pathway." *Nucleic Acids Res* **35**(20): 6714-26.
- Hock, J. und G. Meister (2008). "The Argonaute protein family." *Genome Biol* **9**(2): 210.
- Hock, J., L. Weinmann, C. Ender, S. Rudel, E. Kremmer, M. Raabe, H. Urlaub und G. Meister (2007). "Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells." *EMBO Rep* **8**(11): 1052-60.
- Hong, E. J., J. Villen, E. L. Gerace, S. P. Gygi und D. Moazed (2005). "A cullin E3 ubiquitin ligase complex associates with Rik1 and the Clr4 histone H3-K9 methyltransferase and is required for RNAi-mediated heterochromatin formation." *RNA Biol* **2**(3): 106-11.
- Horwich, M. D., C. Li, C. Matranga, V. Vagin, G. Farley, P. Wang und P. D. Zamore (2007). "The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC." *Curr Biol* **17**(14): 1265-72.

- Humphreys, D. T., B. J. Westman, D. I. Martin und T. Preiss (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(47): 16961-6.
- Huntzinger, E. und E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." Nat Rev Genet **12**(2): 99-110.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl und P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-8.
- Ito, H., H. Gaubert, E. Bucher, M. Mirouze, I. Vaillant und J. Paszkowski (2011). "An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress." Nature **472**(7341): 115-9.
- Jackson, R. J., C. U. Hellen und T. V. Pestova (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(2): 113-27.
- Janowski, B. A., K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, R. Nordsell, D. S. Shames, J. D. Minna und D. R. Corey (2006). "Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 787-92.
- Jinek, M., S. M. Coyle und J. A. Doudna (2011). "Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay." Mol Cell **41**(5): 600-8.
- Johnston, M. und G. Hutvagner (2011). "Posttranslational modification of Argonautes and their role in small RNA-mediated gene regulation." Silence **2**: 5.
- Kaller, M., U. Euteneuer und W. Nellen (2006). "Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in *Dictyostelium discoideum*." Eukaryot Cell **5**(3): 530-43.
- Kawamura, Y., K. Saito, T. Kin, Y. Ono, K. Asai, T. Sunohara, T. N. Okada, M. C. Siomi und H. Siomi (2008). "Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells." Nature **453**(7196): 793-7.
- Kessin, R. H. (2001). "Dictyostelium - Evolution, Cell Biology and the Development of Multicellularity." Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon und R. H. Plasterk (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." Genes Dev **15**(20): 2654-9.
- Khvorova, A., A. Reynolds und S. D. Jayasena (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-16.
- Klattenhoff, C., H. Xi, C. Li, S. Lee, J. Xu, J. S. Khurana, F. Zhang, N. Schultz, B. S. Koppetsch, A. Nowosielska, H. Seitz, P. D. Zamore, Z. Weng und W. E. Theurkauf (2009). "The Drosophila HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters." Cell **138**(6): 1137-49.
- Kotaja, N. und P. Sassone-Corsi (2007). "The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 85-90.
- Kuhlmann, M., B. E. Borisova, M. Kaller, P. Larsson, D. Stach, J. Na, L. Eichinger, F. Lyko, V. Ambros, F. Soderbom, C. Hammann und W. Nellen (2005). "Silencing of retrotransposons in *Dictyostelium* by DNA methylation and RNAi." Nucleic Acids Res **33**(19): 6405-17.
- Kuramochi-Miyagawa, S., T. Watanabe, K. Gotoh, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Ikawa, N. Asada, K. Kojima, Y. Yamaguchi, T. W. Ijiri, K. Hata, E. Li, Y. Matsuda, T. Kimura, M. Okabe, Y. Sakaki, H. Sasaki und T. Nakano (2008). "DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes." Genes Dev **22**(7): 908-17.
- Kuspa, A. und W. F. Loomis (1992). "Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8803-7.
- Kuznetsov, Y. G., M. Zhang, T. M. Menees, A. McPherson und S. Sandmeyer (2005). "Investigation by atomic force microscopy of the structure of Ty3 retrotransposon particles." J Virol **79**(13): 8032-45.

- Kwak, P. B. und Y. Tomari (2012). "The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly." Nat Struct Mol Biol **19**(2): 145-51.
- Landthaler, M., D. Gaidatzis, A. Rothballer, P. Y. Chen, S. J. Soll, L. Dinic, T. Ojo, M. Hafner, M. Zavolan und T. Tuschl (2008). "Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs." Rna **14**(12): 2580-96.
- Landthaler, M., A. Yalcin und T. Tuschl (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." Curr Biol **14**(23): 2162-7.
- Lankenau, S., V. G. Corces und D. H. Lankenau (1994). "The Drosophila micropia retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase." Mol Cell Biol **14**(3): 1764-75.
- Lee, D. W., R. Millimaki und R. Aramayo (2010). "QIP, a component of the vegetative RNA silencing pathway, is essential for meiosis and suppresses meiotic silencing in *Neurospora crassa*." Genetics **186**(1): 127-33.
- Lee, E. J., S. Banerjee, H. Zhou, A. Jammalamadaka, M. Arcila, B. S. Manjunath und K. S. Kosik (2011). "Identification of piRNAs in the central nervous system." Rna **17**(6): 1090-9.
- Lee, H. C., L. Li, W. Gu, Z. Xue, S. K. Crosthwaite, A. Pertsemlidis, Z. A. Lewis, M. Freitag, E. U. Selker, C. C. Mello und Y. Liu (2010). "Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi." Mol Cell **38**(6): 803-14.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum und V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-54.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim und V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek und V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo J **23**(20): 4051-60.
- Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer und R. W. Carthew (2004). "Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." Cell **117**(1): 69-81.
- Leng, P., D. H. Klatt, G. Schumann, J. D. Boeke und T. L. Steck (1998). "Skipper, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*." Nucleic Acids Res **26**(8): 2008-15.
- Leuschner, P. J., S. L. Ameres, S. Kueng und J. Martinez (2006). "Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells." EMBO Rep **7**(3): 314-20.
- Lewis, B. P., R. E. Green und S. E. Brenner (2003). "Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 189-92.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel und C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-98.
- Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde und M. Sattler (2003). "Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain." Nature **426**(6965): 465-9.
- Lippman, Z., A. V. Gendrel, M. Black, M. W. Vaughn, N. Dedhia, W. R. McCombie, K. Lavine, V. Mittal, B. May, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, R. W. Doerge, V. Colot und R. Martienssen (2004). "Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control." Nature **430**(6998): 471-6.
- Liu, Q., T. A. Rand, S. Kalidas, F. Du, H. E. Kim, D. P. Smith und X. Wang (2003). "R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway." Science **301**(5641): 1921-5.
- Liu, W. L., D. P. Owen, K. D. Fisher, L. W. Seymour und M. Stevenson (2009). "Establishment of a positive-readout reporter system for siRNAs." J RNAi Gene Silencing **5**(1): 331-8.
- Llave, C., K. D. Kasschau, M. A. Rector und J. C. Carrington (2002). "Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants." Plant Cell **14**(7): 1605-19.

- Loomis, W. F. (1975). "Dictyostelium discoideum - A Developmental System." New York, Academic Press.
- Lu, C., K. Kulkarni, F. F. Souret, R. MuthuValliappan, S. S. Tej, R. S. Poethig, I. R. Henderson, S. E. Jacobsen, W. Wang, P. J. Green und B. C. Meyers (2006). "MicroRNAs and other small RNAs enriched in the Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant." Genome Res **16**(10): 1276-88.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg und U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-8.
- MacRae, I. J. und J. A. Doudna (2007). "Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes." Curr Opin Struct Biol **17**(1): 138-45.
- Maida, Y. und K. Masutomi (2011). "RNA-dependent RNA polymerases in RNA silencing." Biol Chem **392**(4): 299-304.
- Mallory, A. C., A. Hinze, M. R. Tucker, N. Bouche, V. Gascioli, T. Elmayan, D. Laressergues, V. Jauvion, H. Vaucheret und T. Laux (2009). "Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing." PLoS Genet **5**(9): e1000646.
- Martens, H., J. Novotny, J. Oberstrass, T. L. Steck, P. Postlethwait und W. Nellen (2002). "RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase." Mol Biol Cell **13**(2): 445-53.
- Martinez, J. und T. Tuschl (2004). "RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease." Genes Dev **18**(9): 975-80.
- Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel und P. D. Zamore (2005). "Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes." Cell **123**(4): 607-20.
- Meier, D. (2010). "Untersuchung des Proteins Argonaut A aus Dictyostelium discoideum in der RNA vermittelten Genregulation." Universität Kassel(Wissenschaftliche Hausarbeit).
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng und T. Tuschl (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Mol Cell **15**(2): 185-97.
- Mével-Ninio, M., A. Pelisson, J. Kinder, A. R. Campos und A. Bucheton (2007). "The flamenco locus controls the gypsy and ZAM retroviruses and is required for Drosophila oogenesis." Genetics **175**(4): 1615-24.
- Miyoshi, K., H. Tsukumo, T. Nagami, H. Siomi und M. C. Siomi (2005). "Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation." Genes Dev **19**(23): 2837-48.
- Mizuno, T., M. Y. Chou und M. Inouye (1984). "A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(7): 1966-70.
- Moissiard, G., E. A. Parizotto, C. Himber und O. Voinnet (2007). "Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins." Rna **13**(8): 1268-78.
- Montgomery, T. A., M. D. Howell, J. T. Cuperus, D. Li, J. E. Hansen, A. L. Alexander, E. J. Chapman, N. Fahlgren, E. Allen und J. C. Carrington (2008). "Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation." Cell **133**(1): 128-41.
- Montgomery, T. A., S. J. Yoo, N. Fahlgren, S. D. Gilbert, M. D. Howell, C. M. Sullivan, A. Alexander, G. Nguyen, E. Allen, J. H. Ahn und J. C. Carrington (2008). "AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20055-62.
- Moog, K. (2012). "HelF und sein Interaktionspartner Xrn1: zwei Regulatoren der RNA-Interferenz in D. discoideum." Universität Kassel(Doktorarbeit).
- Müller, S. (2011). "BIOLOGISCHE FUNKTIONSANALYSE UND IDENTIFIZIERUNG NEUER SUBSTRATE DER METHYLTRANSFERASE DNMT2." Universität Kassel(Doktorarbeit).
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.

- Nagao, A., K. Sato, K. M. Nishida, H. Siomi und M. C. Siomi (2011). "Gender-Specific Hierarchy in Nuage Localization of PIWI-Interacting RNA Factors in *Drosophila*." Front Genet **2**: 55.
- Napoli, C., C. Lemieux und R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Nicol, J. W., G. A. Helt, S. G. Blanchard, Jr., A. Raja und A. E. Loraine (2009). "The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets." Bioinformatics **25**(20): 2730-1.
- Novotny, J., S. Diegel, H. Schirmacher, A. Mohrle, M. Hildebrandt, J. Oberstrass und W. Nellen (2001). "Dictyostelium double-stranded ribonuclease." Methods Enzymol **342**: 193-212.
- O'Carroll, D., I. Mecklenbrauker, P. P. Das, A. Santana, U. Koenig, A. J. Enright, E. A. Miska und A. Tarakhovskiy (2007). "A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway." Genes Dev **21**(16): 1999-2004.
- Okamura, K., J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler und E. C. Lai (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*." Cell **130**(1): 89-100.
- Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi und M. C. Siomi (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." Genes Dev **18**(14): 1655-66.
- Pak, J. und A. Fire (2007). "Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*." Science **315**(5809): 241-4.
- Pall, G. S., C. Codony-Servat, J. Byrne, L. Ritchie und A. Hamilton (2007). "Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot." Nucleic Acids Res **35**(8): e60.
- Pare, J. M., N. Tahbaz, J. Lopez-Orozco, P. LaPointe, P. Lasko und T. C. Hobman (2009). "Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies." Mol Biol Cell **20**(14): 3273-84.
- Park, M. Y., G. Wu, A. Gonzalez-Sulser, H. Vaucheret und R. S. Poethig (2005). "Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3691-6.
- Pelham, H. R. und R. J. Jackson (1976). "An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates." Eur J Biochem **67**(1): 247-56.
- Pelisson, A., E. Sarot, G. Payen-Groschene und A. Bucheton (2007). "A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense gypsy transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary." J Virol **81**(4): 1951-60.
- Peragine, A., M. Yoshikawa, G. Wu, H. L. Albrecht und R. S. Poethig (2004). "SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*." Genes Dev **18**(19): 2368-79.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Phizicky, E. M. und A. K. Hopper (2010). "tRNA biology charges to the front." Genes Dev **24**(17): 1832-60.
- Piao, X., X. Zhang, L. Wu und J. G. Belasco (2010). "CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells." Mol Cell Biol **30**(6): 1486-94.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand und W. Filipowicz (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." Science **309**(5740): 1573-6.
- Poulter, R. T. und T. J. Goodwin (2005). "DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons." Cytogenet Genome Res **110**(1-4): 575-88.
- Prud'homme, N., M. Gans, M. Masson, C. Terzian und A. Bucheton (1995). "Flamenco, a gene controlling the gypsy retrovirus of *Drosophila melanogaster*." Genetics **139**(2): 697-711.
- Qu, F., X. Ye und T. J. Morris (2008). "Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14732-7.

- Reinhart, B. J., E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, B. Bartel und D. P. Bartel (2002). "MicroRNAs in plants." Genes Dev **16**(13): 1616-26.
- Rivas, F. V., N. H. Tolia, J. J. Song, J. P. Aragon, J. Liu, G. J. Hannon und L. Joshua-Tor (2005). "Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC." Nat Struct Mol Biol **12**(4): 340-9.
- Romano, N. und G. Macino (1992). "Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences." Mol Microbiol **6**(22): 3343-53.
- Rosen, E., A. Sivertsen und R. A. Firtel (1983). "An unusual transposon encoding heat shock inducible and developmentally regulated transcripts in *Dictyostelium*." Cell **35**(1): 243-51.
- Rot, G., A. Parikh, T. Curk, A. Kuspa, G. Shaulsky und B. Zupan (2009). "dictyExpress: a *Dictyostelium discoideum* gene expression database with an explorative data analysis web-based interface." BMC Bioinformatics **10**: 265.
- Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M. C. Cardoso und H. Leonhardt (2008). "A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins." Mol Cell Proteomics **7**(2): 282-9.
- Ruby, J. G., C. H. Jan und D. P. Bartel (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature **448**(7149): 83-6.
- Saito, K., K. M. Nishida, T. Mori, Y. Kawamura, K. Miyoshi, T. Nagami, H. Siomi und M. C. Siomi (2006). "Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome." Genes Dev **20**(16): 2214-22.
- Saito, K. und M. C. Siomi (2010). "Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals." Dev Cell **19**(5): 687-97.
- Salvatore, V., N. Potenza, U. Papa, V. Nobile und A. Russo (2010). "Bacterial expression of mouse argonaute 2 for functional and mutational studies." Int J Mol Sci **11**(2): 745-53.
- Schirle, N. T. und I. J. MacRae (2012). "The crystal structure of human Argonaute2." Science **336**(6084): 1037-40.
- Schopman, N. C., S. Heynen, J. Haasnoot und B. Berkhout (2010). "A miRNA-tRNA mix-up: tRNA origin of proposed miRNA." RNA Biol **7**(5): 573-6.
- Schroeder, D. F., M. Gahrtz, B. B. Maxwell, R. K. Cook, J. M. Kan, J. M. Alonso, J. R. Ecker und J. Chory (2002). "De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate Arabidopsis photomorphogenesis." Curr Biol **12**(17): 1462-72.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin und P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Selbach, M., B. Schwanhausser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin und N. Rajewsky (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." Nature **455**(7209): 58-63.
- Shabalina, S. A. und E. V. Koonin (2008). "Origins and evolution of eukaryotic RNA interference." Trends Ecol Evol **23**(10): 578-87.
- Shiba, T. und K. Saigo (1983). "Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*." Nature **302**(5904): 119-24.
- Sigova, A., N. Rhind und P. D. Zamore (2004). "A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*." Genes Dev **18**(19): 2359-67.
- Singleton, C. K., R. L. Delude und C. E. McPherson (1987). "Characterization of genes which are deactivated upon the onset of development in *Dictyostelium discoideum*." Dev Biol **119**(2): 433-41.
- Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon und L. Joshua-Tor (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." Science **305**(5689): 1434-7.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Sriskantheadavan, S., T. Lee, Z. Lin, D. Yang und C. H. Siu (2009). "Cell adhesion molecule DdCAD-1 is imported into contractile vacuoles by membrane invagination in a Ca²⁺- and conformation-dependent manner." J Biol Chem **284**(52): 36377-86.

- Steiner, F. A., K. L. Okihara, S. W. Hoogstrate, T. Sijen und R. F. Ketting (2009). "RDE-1 slicer activity is required only for passenger-strand cleavage during RNAi in *Caenorhabditis elegans*." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 207-11.
- Strand, D. J. und J. F. McDonald (1985). "Copia is transcriptionally responsive to environmental stress." Nucleic Acids Res **13**(12): 4401-10.
- Sutoh, K. (1993). "A transformation vector for *dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr." Plasmid **30**(2): 150-4.
- Tabara, H., M. Sarkissian, W. G. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire und C. C. Mello (1999). "The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." Cell **99**(2): 123-32.
- Tam, O. H., A. A. Aravin, P. Stein, A. Girard, E. P. Murchison, S. Cheloufi, E. Hodges, M. Anger, R. Sachidanandam, R. M. Schultz und G. J. Hannon (2008). "Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes." Nature **453**(7194): 534-8.
- Thompson, D. M. und R. Parker (2009). "Stressing out over tRNA cleavage." Cell **138**(2): 215-9.
- Thomson, T. und H. Lin (2009). "The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect." Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 355-76.
- Vagin, V. V., A. Sigova, C. Li, H. Seitz, V. Gvozdev und P. D. Zamore (2006). "A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline." Science **313**(5785): 320-4.
- Vasquez-Rifo, A., G. Jannot, J. Armisen, M. Labouesse, S. I. Bukhari, E. L. Rondeau, E. A. Miska und M. J. Simard (2012). "Developmental characterization of the microRNA-specific *C. elegans* Argonautes alg-1 and alg-2." PLoS One **7**(3): e33750.
- Vazquez, F., V. Gascioli, P. Crete und H. Vaucheret (2004). "The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing." Curr Biol **14**(4): 346-51.
- Vazquez, F., H. Vaucheret, R. Rajagopalan, C. Lepers, V. Gascioli, A. C. Mallory, J. L. Hilbert, D. P. Bartel und P. Crete (2004). "Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs." Mol Cell **16**(1): 69-79.
- Vogt, V. M. (1973). "Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae*." Eur J Biochem **33**(1): 192-200.
- Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal und R. A. Martienssen (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." Science **297**(5588): 1833-7.
- Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, M. A. Surani, Y. Sakaki und H. Sasaki (2008). "Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes." Nature **453**(7194): 539-43.
- Watts, D. J. und J. M. Ashworth (1970). "Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture." Biochem J **119**(2): 171-4.
- Wei, K. F., L. J. Wu, J. Chen, Y. F. Chen und D. X. Xie (2012). "Structural evolution and functional diversification analyses of argonaute protein." J Cell Biochem **113**(8): 2576-85.
- Wiegand, S. (2012). "Funktionelle Charakterisierung von RNA abhängigen RNA Polymerasen aus *Dictyostelium discoideum*." TU Darmstadt(Doktorarbeit).
- Wightman, B., I. Ha und G. Ruvkun (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-62.
- Winter, J. und S. Diederichs (2011). "Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization." RNA Biol **8**(6): 1149-57.
- Wong, E., C. Yang, J. Wang, D. Fuller, W. F. Loomis und C. H. Siu (2002). "Disruption of the gene encoding the cell adhesion molecule DdCAD-1 leads to aberrant cell sorting and cell-type proportioning during *Dictyostelium* development." Development **129**(16): 3839-50.
- Wong, M. L. und J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**(1): 75-85.

- Xue, Z., H. Yuan, J. Guo und Y. Liu (2012). "Reconstitution of an Argonaute-dependent small RNA biogenesis pathway reveals a handover mechanism involving the RNA exosome and the exonuclease QIP." *Mol Cell* **46**(3): 299-310.
- Yan, K. S., S. Yan, A. Farooq, A. Han, L. Zeng und M. M. Zhou (2003). "Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain." *Nature* **426**(6965): 468-74.
- Yang, N. und H. H. Kazazian, Jr. (2006). "L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells." *Nat Struct Mol Biol* **13**(9): 763-71.
- Yang, Z., Y. W. Ebright, B. Yu und X. Chen (2006). "HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide." *Nucleic Acids Res* **34**(2): 667-75.
- Yekta, S., I. H. Shih und D. P. Bartel (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." *Science* **304**(5670): 594-6.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara und B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* **17**(24): 3011-6.
- Yigit, E., P. J. Batista, Y. Bei, K. M. Pang, C. C. Chen, N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, S. Mitani, M. J. Simard und C. C. Mello (2006). "Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi." *Cell* **127**(4): 747-57.
- Zheng, X., J. Zhu, A. Kapoor und J. K. Zhu (2007). "Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing." *Embo J* **26**(6): 1691-701.
- Zhou, Q., Y. S. Kee, C. C. Poirier, C. Jelinek, J. Osborne, S. Divi, A. Surcel, M. E. Will, U. S. Eggert, A. Muller-Taubenberger, P. A. Iglesias, R. J. Cotter und D. N. Robinson (2010). "14-3-3 coordinates microtubules, Rac, and myosin II to control cell mechanics and cytokinesis." *Curr Biol* **20**(21): 1881-9.
- Zhou, R., I. Hotta, A. M. Denli, P. Hong, N. Perrimon und G. J. Hannon (2008). "Comparative analysis of argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*." *Mol Cell* **32**(4): 592-9.
- Zhuang, F. und Y. H. Liu (2006). "Usefulness of the luciferase reporter system to test the efficacy of siRNA." *Methods Mol Biol* **342**: 181-7.
- Zilberman, D., X. Cao und S. E. Jacobsen (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." *Science* **299**(5607): 716-9.
- Zuker, C., J. Cappello, R. L. Chisholm und H. F. Lodish (1983). "A repetitive *Dictyostelium* gene family that is induced during differentiation and by heat shock." *Cell* **34**(3): 997-1005.

