

Funktion und Biogenese kleiner RNAs in *Dictyostelium discoideum*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 10: Mathematik und Naturwissenschaften
Institut für Biologie, Abteilung Genetik
Universität Kassel

vorgelegt von:

Doreen Meier

Kassel im November 2015

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Faust

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Nellen

2. Gutachter: Prof. Dr. Raffael Schaffrath

Datum der Disputation: 21.12.2015

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Die RNA vermittelte Genregulation in Eukaryoten	1
1.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus.....	3
1.3 RNA vermittelte Genregulation in <i>D. discoideum</i>	4
1.4 Proteine der RNAi-Maschinerie.....	5
1.4.1 Die RNase III Enzyme Drosha und Dicer	5
1.4.2 Proteine zur Bindung von dsRNA (dsRBPs)	7
1.4.3 Argonauten Proteine.....	10
1.4.4 RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRPs).....	13
1.5 Der miRNA-Signalweg.....	14
1.5.1 Biogenese von miRNAs in Tieren	14
1.5.2 Biogenese von miRNAs in Pflanzen.....	17
1.5.3 MiRNA vermittelte Regulation von Zielgenen.....	19
1.6 Die siRNA vermittelte Genregulation	21
1.6.1 SiRNAs und ihre Funktion in Säugetieren und in <i>Drosophila</i>	21
1.6.2 SiRNAs und ihre Prozessierung in <i>C. elegans</i>	22
1.6.3 CasiRNAs und exogene siRNAs in <i>A. thaliana</i>	24
1.6.4 SiRNA vermittelte transkriptionelle Kontrolle in <i>S. pombe</i>	25
1.7 Das DIRS-1 Retrotransposon in <i>D. discoideum</i>	26
1.8 Zielsetzung	29
2 Material	31
2.1 Geräte.....	31
2.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.3 Chemikalien	33
2.4 Puffer und Lösungen.....	35
2.5 Kits.....	39
2.6 Enzyme und Enzympuffer.....	39
2.7 Nukleotide	40
2.8 Größenstandards	40
2.9 Antikörper	41
2.10 Antibiotika.....	41
2.11 Nährmedien	41
2.12 Bakterienstämme.....	43

2.13	<i>Dictyostelium discoideum</i> Stämme.....	43
2.14	Oligonukleotide.....	45
2.15	Software.....	47
2.16	Sequenzen.....	47
2.17	Plasmide.....	48
2.17.1	Plasmide anderer Arbeiten.....	48
2.17.2	Plasmide dieser Arbeit.....	48
3	Methoden	55
3.1	Zellbiologische Methoden.....	55
3.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	55
3.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	55
3.1.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	55
3.1.4	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	56
3.1.5	Transformation von <i>D. discoideum</i>	56
3.1.6	Subklonieren von <i>D. discoideum</i>	57
3.1.7	Herstellung von Sporensuspensionen.....	57
3.1.8	Fluoreszenzmikroskopie von <i>D. discoideum</i>	57
3.1.9	Entwicklungszyklus von <i>D. discoideum</i>	58
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	59
3.2.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	59
3.2.2	Gelelution von DNA-Fragmenten.....	59
3.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	59
3.2.4	Dephosphorylierung von Nukleinsäuren.....	59
3.2.5	Phosphorylierung von Nukleinsäuren.....	60
3.2.6	Polymerasekettenreaktion.....	60
3.2.7	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	61
3.2.8	Reverse Transkriptase PCR.....	61
3.2.9	<i>Overlap-Extension</i> PCR.....	62
3.2.10	Erzeugen von 5' A-Überhängen an stumpfen DNA-Enden.....	62
3.2.11	Plasmidpräparation.....	63
3.2.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>D. discoideum</i>	63
3.2.13	Isolierung von gDNA aus <i>D. discoideum</i>	63
3.2.14	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	63
3.2.15	Fraktionierung in Cytoplasma und Nukleoplasma zur DNA-Isolation.....	64
3.2.16	Nuklease Verdau von cytoplasmatischer und genomischer DNA.....	64
3.2.17	Exonuclease Verdau von Gesamt-RNA.....	64

3.2.18	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	65
3.2.19	Fällung von Nukleinsäuren	65
3.2.20	Illumina Sequenzierung.....	65
3.2.21	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	66
3.2.22	Southern Blot	67
3.2.23	Agarose-Northern Blot	67
3.2.24	Northern Blot für kleine RNAs.....	68
3.2.25	Quantifizierung von Northern Blots.....	68
3.2.26	Hybridisierung von Membranen mit ³² P markierten Sonden.....	68
3.2.27	Detektion von ³² P markierten Sonden.....	68
3.2.28	Stripping von Northern Blots	69
3.2.29	Gelfiltration	69
3.3	Biochemische Methoden	69
3.3.1	Fraktionierung in Cytoplasma und Nucleoplasma zur Isolation von Proteinen.....	69
3.3.2	Herstellung von Proteinlysat aus <i>D. discoideum</i> Zellen	69
3.3.3	SDS-PAGE.....	70
3.3.4	Coomassie Färbung von Proteinen in PAA-Gelen	70
3.3.5	Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von Proteinkomplexen	70
3.3.6	Western Blot.....	71
3.3.7	Quantifizierung von Western Blot.....	72
3.3.8	Zentrifugation zur Isolierung von Protein/Nukleinsäure-Partikeln	73
3.3.9	Expressionsnachweis von 6xHis RbdB in <i>E. coli</i>	73
3.3.10	Expression rekombinanter dsRB-Domänen in <i>E. coli</i>	74
3.3.11	Aufreinigung rekombinanter MBP dsRB-Domänen aus <i>Escherichia coli</i>	74
4	Ergebnisse	76
4.1	MiRNAs und ihre Prozessierung in <i>D. discoideum</i>	76
4.1.1	Proteine mit dsRB-Domänen in <i>D. discoideum</i>	76
4.1.2	<i>Knockout</i> von rbdA und rbdB in <i>D. discoideum</i> AX2.....	78
4.1.3	RbdB ist für die Prozessierung bekannter miRNAs relevant.....	80
4.1.4	Primäre miRNA Vorläufermoleküle akkumulieren in rbdB- Stämmen.....	81
4.1.5	RbdB lokalisiert in diskreten nukleären Spots.....	82
4.1.6	RbdB hat ein C-terminales Kern-Lokalisationssignal	85
4.1.7	Das Serrate Homolog in <i>D. discoideum</i>	88
4.1.8	Identifikation neuer miRNAs durch Illumina®-RNA-Sequenzierung	90
4.1.9	Die Expression von RbdB-GFP Fusionsproteinen kompensiert den <i>rbdB Knockout</i>	93

4.1.10	Mutagenese konservierter Aminosäuren in der dsRBD von RbDB	95
4.1.11	Expression von dsRB-Domänen in <i>E. coli</i>	98
4.1.12	Relevante und weiterführende Ergebnisse anderer Arbeiten	100
4.2	AgnA und die RNAi vermittelte Stilllegung von DIRS-1	102
4.2.1	Kurze Übersicht zum aktuellen Forschungsstand.....	102
4.2.2	Die Expression von AgnA wird entwicklungsabhängig reguliert.....	102
4.2.3	AgnA lokalisiert im Kern und im Cytoplasma.....	103
4.2.4	DIRS-1 Volllänge-Transkripte akkumulieren in agnA- Stämmen	104
4.2.5	DIRS-1 kodierten Proteine akkumulieren im agnA- Stamm	105
4.2.6	Extrachromosomale DIRS-1 DNA akkumuliert im Cytoplasma von..... agnA- Stämmen	107
4.2.7	Extrachromosomale DIRS-1 DNA Intermediate enthalten Teile der ITRs.....	108
4.2.8	DIRS-1 GAG assembliert in distinkten cytoplasmatischen Foci.....	111
4.2.9	Analyse von DIRS-1 siRNAs durch Hochdurchsatzsequenzierung.....	114
4.2.10	AgnA ist für die siRNA Transitivität in 5'- und 3'-Richtung notwendig.....	116
4.2.11	Die Promotoraktivität der DIRS-1 ITRs im AX2 wt und im agnA- Stamm	118
4.2.12	Bidirektionale Transkripte initiieren die Prozessierung von siRNAs	120
5	Diskussion	124
5.1	Die miRNA Prozessierung in <i>D. discoideum</i>	124
5.1.1	Kompartimente und beteiligte Proteine.....	124
5.1.2	Der kernlokalisierte miRNA-Prozessierungskomplex in <i>D. discoideum</i>	128
5.1.3	Modell zur miRNA-Prozessierung in <i>D. discoideum</i>	132
5.1.4	Identifikation von miRNAs in <i>D. discoideum</i>	134
5.2	RNAi vermittelte Regulation und Amplifikation des DIRS-1 Retrotransposons.....	136
5.2.1	AgnA wird in vegetativ wachsenden Zellen am stärksten exprimiert.....	136
5.2.2	AgnA ist für die Akkumulierung sekundärer DIRS-1 siRNAs relevant.....	137
5.2.3	Die Deregulation von DIRS-1 im agnA- Stamm – Transkriptionsebene	139
5.2.4	Die Deregulation von DIRS-1 im agnA- Stamm – Proteinebene	139
5.2.5	Extrachromosomale DIRS-1 DNA – Produkte einer reversen Transkription?	141
5.2.6	Ist das putative DIRS-1 GAG Protein in der Lage, VLPs zu bilden?	143
5.2.7	Verhindert AgnA die Amplifikation von DIRS-1?	145
5.2.8	DIRS-1 siRNAs: Biogenese und Amplifikation im Detail.....	147
5.2.9	Transkriptionelle Kontrolle von DIRS-1	151
6	Zusammenfassung	153
7	Summary	155
8	Literaturverzeichnis	157

Anhang	171
A1: Vektorkarten.....	171
A2: Verifizierung/Charakterisierung der srtA [RNAi] Stämme.....	176
A3: Ergänzende Informationen zu den neu identifizierten miRNAs.....	177
A4: Charakterisierung der extrachromosomalen DIRS-1 DNA.....	179
9 Liste der wissenschaftlichen Publikationen	180
10 Danksagung	181
11 Eidesstattliche Erklärung	183

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
%	Prozent
Δ	delta
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFM	Atomic Force Microscope
AgnA-AgnE (Proteine)	Argonauten Proteine aus <i>D. discoideum</i> (PIWI-Unterfamilie)
Ago1-Ago4 (Proteine)	Humane Argonauten Proteine (AGO-Unterfamilie)
Ago1-Ago2 (Proteine)	Argonauten Proteine (AGO-Unterfamilie) aus <i>D. melanogaster</i>
Ago1 (Protein)	Argonauten Homolog aus <i>S. pombe</i>
AGO1-AGO10 (Proteine)	Argonauten Proteine aus <i>A. thaliana</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATSN	<i>A. thaliana</i> Sine (Retrotransposon)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BF	Brightfield/Durchlicht
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BS	Blasticidin S
BSA	Bovines Serum Albumin
BsR	Blasticidin-Resistenz
C	Cytidin
C3PO (Protein)	Endonuklease aus <i>D. melanogaster</i>
ca.	circa
CAM	Chloramphenicol
casiRNA	<i>cis-acting</i> RNA aus <i>A. thaliana</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
Co-IP	Co-Immunoprecipitation
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTP	Cytosintriphosphat
d	Tag/e
d	desoxy
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
<i>D-bodies</i>	<i>Dicing bodies</i>

DCL1-DCL4 (Protein)	dicer-like1-4, Dicer Homologe aus <i>A. thaliana</i>
Dcr-1 und Dcr-2	Dicer-1 und Dicer-2, Dicer Homologe aus <i>D. melanogaster</i>
dd	<i>double-distilled</i>
DDPB	<i>double-psi β-barrel</i> (Domäne)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8 (Protein)	DiGeorge <i>syndrome critical region</i> /Untereinheit des humanen Mikroprozessors
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DrnB (Protein)	Double-stranded RNase (DDB_G0268410)
ds	double-stranded
dsRBD	dsRNA bindende Domäne
dsRBP	dsRNA bindendes Protein
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTBP	Dimethyl 3,3-dithiobispropionimidate • 2 HCl
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ego-1 (Protein)	RdRP aus <i>C. elegans</i>
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EP	Elektroporation
Ergo-1 (Protein)	Argonauten Protein aus <i>C. elegans</i>
et al.	lat. und andere
ExoI	Exonuklease I
ExoIII	Exonuklease III
fw/f	forward
g	Gramm
G10	Geneticin mit einer Konzentration von 10 µg/mL
G	Guanin
GAG	<i>group-specific antigen</i>
gDNA	genomische DNA
GFP (Protein-Tag)	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GOI	<i>gene of interest</i>
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
GW-Proteine	Glycin/Tryptophan Wiederholung beinhaltende Proteine
h	Stunde
H3K9me	Methylierung von Lysin (K) 9 in Histon H3
HA (Protein-tag)	Humanes Influenza Hämagglutinin
HEN1	Hua <i>Enhancer1</i> Methyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His, H	Histidin
hp	hairpin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HYL1 (Protein)	hyponastic leaves1/ dsRBD-Protein in <i>A. thaliana</i>
ICR	<i>internal complementary region</i> (Sequenzabschnitt von DIRS-1)

<i>in vitro</i>	lat. im Glas
<i>in vivo</i>	lat. im Lebendigen
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
J	Joule
K	Lysin
KA	<i>Klebsiella aerogenes</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
Loqs (Protein)	Loquacious/ <i>D. melanogaster</i> dsRBD-Protein
LTR	long terminal repeat
M	Molar
mA	Milliampere
MBP	Maltose <i>binding</i> Protein
mg	Milligramm
MID	<i>middle</i> (Proteindomäne)
min	Minute
miRNA	microRNA
mL	Milliliter
MNase	<i>Micrococcal</i> Nuklease
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
MP	Millipore
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MT	Methyltransferase
ng	Nanogramm
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
nm	Nanometer
NoLS	<i>Nucleolar Localization Signal</i>
NP40	Nonident® P40
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	optische Dichte bei Wellenlänge 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
³² p	Phosphor-32
PAA	Polyacrylamid
PABC	<i>poly(A) binding protein, cytoplasmic 1</i>
PACT (Protein)	<i>protein activator of PKR</i> , humanes dsRBD Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pasha	<i>partner of Drosha</i> , dsRBD Protein aus <i>D. melanogaster</i> und <i>C. elegans</i>
PAZ	Piwi-Argonaut-Zwille (Proteindomäne)
P-Body	<i>processing body</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat. potentia Hydrogenii
piRNA	PIWI-interagierende RNA
PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
PNK	Polynukleotidkinase
POI	<i>protein of interest</i>
POL II (Protein)	RNA-Polymerase II
POL IV (Protein)	RNA-Polymerase IV (<i>A. thaliana</i>)
5'PPP	5'-Triphosphat
piRNA	<i>piwi interacting</i> RNA
pre-miRNA	<i>precursor</i> miRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> miRNA
q-RT-PCR	quantitative RT-PCR
R2D2 (Protein)	dsRBD-Protein aus <i>C. elegans</i> /RISC-loading complex
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
RbdA (Protein)	dsRBD-Protein A (DDB_G0275735) aus <i>D. discoideum</i>
RdbB (Protein)	dsRBD-Protein B (DDB_G0269426) aus <i>D. discoideum</i>
RDE-1 (Protein)	Argonauten Protein aus <i>C. elegans</i>
RDE-4 (Protein)	dsRBD-Protein aus <i>D. melanogaster</i> /RISC-loading complex
rDNA	ribosomale DNA
Rdp1 (Protein)	RdRP aus <i>S. pombe</i>
RDR1-6 (Proteine)	RdRPs aus <i>A. thaliana</i>
RdRP	RNA-abhängige RNA Polymerase
rev/r	Reverse
RH	RNase H
RHA (Protein)	RNA-Helikase A
RISC	RNA-induzierter Silencing Komplex
RITS	RNA-induzierter Transkriptionssilencing Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rrf1-3	RdRPs aus <i>C. elegans</i>
rRNA	ribosomale RNA
RrpA-C (Proteine)	RdRPs aus <i>D. discoideum</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
s	<i>sense</i>
S.	Seite
S1	S1 Nuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE (Protein)	SERRATE/zinc-finger Protein in <i>A. thaliana</i>
SINE	Nicht-LTR Retrotransposon
siRNA	<i>small/short interfering</i> RNA
SM	Standardmedium

SSC	Saline-Sodium Citrate
ssRNA	einzelsträngige RNA
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TRBP (dsRBP)	<i>human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Transposables Element
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	unit
UAS	upstream activating element
UV	Ultraviolett-Strahlung
V	Volt
vgl.	Vergleich
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YR	Tyrosin-Rekombinase

1 Einleitung

1.1 Die RNA vermittelte Genregulation in Eukaryoten

Kleine regulatorische RNAs sind in Eukaryoten weit verbreitet. Seit ihrer Entdeckung in den 90er Jahren (Lee et al. 1993, Fire et al. 1998) sind sie Gegenstand intensiver Forschung, da sie eine Vielzahl von Genen regulieren und so wichtige biologische Prozesse steuern. Sie sind z.B. an der Differenzierung von Zellen und an Entwicklungsprozessen beteiligt und tragen zur Stilllegung von Transposons oder zur Virusabwehr bei (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009). In der biomedizinischen Forschung gelten die Signalwege als Ansatzpunkte zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten und Krebs. Gleichzeitig können differentiell exprimierte RNAs als diagnostische Marker eingesetzt werden (zusammengefasst in Du et al. 2011).

Die drei wichtigsten Klassen kleiner regulatorischer RNAs sind *small interfering RNAs* (siRNAs), *microRNAs* (miRNAs) und *piwi interacting RNAs* (piRNAs). Für ihre Biogenese und die Regulierung von Zielgenen werden Schlüsselproteine der RNA-Interferenz (RNAi) Maschinerie benötigt. Diese sind in eukaryotischen Organismen hoch konserviert. Eine vollständige RNAi-Maschinerie, die aus je einem Argonauten Protein der AGO- und PIWI-Unterklasse, einem Dicer-Homolog und einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) besteht, war vermutlich in einem gemeinsamen eukaryotischen Vorfahren existent (Cerutti et al. 2006).

Kleine regulatorische RNAs sind zwischen 20 und 30 Nukleotiden (nt) lang und werden aus längeren, intra- oder intermolekularen doppelsträngigen RNA-Vorläufermolekülen prozessiert. In Abhängigkeit vom Organismus und der betrachteten Klasse kleiner RNAs werden für ihre Akkumulation Dicer-, RdRP- und Argonauten-Proteine benötigt. Die einzelsträngige RNA wird stabil in einem Effektor-Komplex eingebaut, der in seinem Zentrum ein Protein der Argonauten-Familie enthält und als *RNA induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. Die kleine RNA leitet den Effektor-Komplex zu vollständig oder teilweise komplementären RNA-*Targets*, wodurch Gene transkriptionell oder posttranskriptionell stillgelegt werden. Im ersten Fall wird die Bildung von Heterochromatin auf DNA-Ebene initiiert. Im zweiten Fall kann die RNA entweder direkt durch das Argonauten Protein gespalten, ihr Abbau vermittelt oder ihre Translation inhibiert werden (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009).

MiRNAs, siRNAs und piRNAs unterscheiden sich in ihrer Herkunft, ihrer Biogenese und im Modus ihrer *Target*-Regulierung. Charakteristische Merkmale der genannten Klassen sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Die Klasse der miRNAs

MiRNAs sind im Genom von eukaryotischen Organismen kodiert und werden aus längeren Transkripten, den primären miRNAs (pri-miRNAs), prozessiert, die lokale Haarnadel-Strukturen ausbilden (Lee et al. 2002). Durch die Aktivität von RNase III Enzymen, die ihrerseits mit dsRNA bindenden Proteinen (dsRBPs) interagieren, entstehen in zwei Schritten reife ca. 21 nt lange miRNAs. In mehrzelligen Tieren ist dafür die Aktivität zweier RNase III Enzyme, nämlich Drosha und Dicer, notwendig (Lee et al. 1993, Hutvagner et al. 2001). In Pflanzen ist das Protein Dicer-like 1 (DCL1) für beide Schritte der miRNA-Prozessierung verantwortlich (Kurihara et al. 2004). Nachdem eine reife miRNA in den Effektor-Komplex geladen wurde, vermittelt sie die Bindung an verschiedene mRNA-Targets. Das beteiligte Argonauten Protein leitet daraufhin die Stilllegung der Zielgene auf posttranskriptioneller Ebene ein (zusammengefasst in Voinnet 2009, Huntzinger et al. 2011). MiRNAs regulieren so Protein kodierende Gene in *trans*, was ein entscheidendes Merkmal dieser Klasse von kleinen RNAs ist und erstmals für *lin-4* aus *Caenorhabditis elegans* beobachtet werden konnte (Lee et al. 1993).

Die Klasse der siRNAs

SiRNAs sind in der Regel zwischen 21 und 24 nt lang. Sie agieren im Gegensatz zu miRNAs in *cis* und regulieren Gene, aus deren RNA-Intermediaten sie selbst hervorgegangen sind. Ihre Prozessierung ist von Proteinen der Dicer-Familie abhängig (Bernstein et al. 2001). In einigen Organismen sind darüber hinaus RdRPs an der Akkumulierung von siRNAs beteiligt (Sijen et al. 2001, Xie et al. 2004). Wenn sie Transposons oder anderen Regionen im Genom eines Organismus zugeordnet werden können, bezeichnet man sie als endogene siRNAs. Stammen sie jedoch von Viren oder von Transgenen ab, bezeichnet man sie als exogen. Einzelsträngige siRNAs werden schließlich stabil in den RISC eingebaut, wo sie von einem Argonauten Protein gebunden werden. Der Effektor-Komplex vermittelt die Stilllegung der Zielgene auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene und ist in der Lage, die Amplifikation eines Virus zu verhindern (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009).

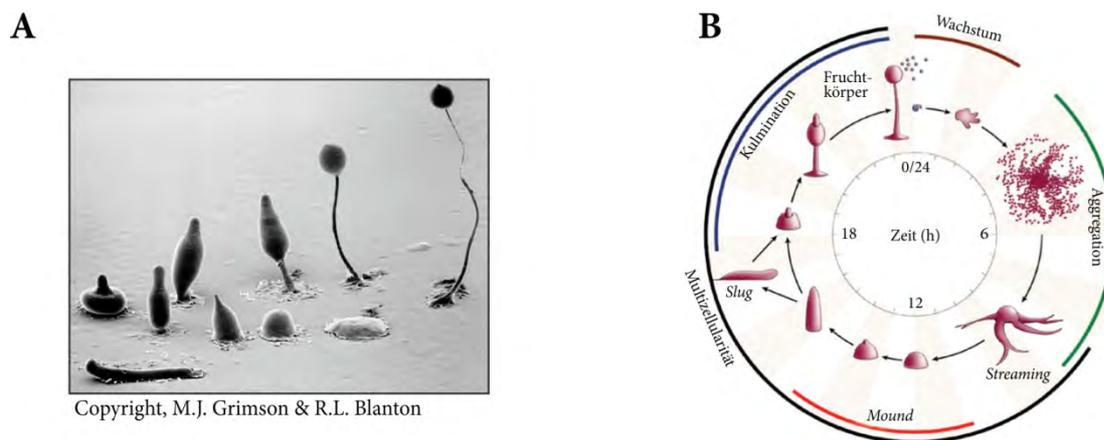
Die Klasse der piRNAs

PiRNAs sind zwischen 25 bis 30 nt lang und kommen in der Keimbahn von mehrzelligen Tieren vor, wo sie in Assoziation mit Argonauten Proteinen der PIWI-Unterfamilie an der Stilllegung von transposablen Elementen beteiligt sind (Aravin et al. 2001, Girard et al. 2006, Vagin et al. 2006, Watanabe et al. 2008). Die Prozessierung von piRNAs erfolgt ohne die Beteiligung eines Dicer-Homologs. Vielmehr wird durch die Aktivität von Piwi-Proteinen in einem als Ping-Pong-Modell bezeichneten Amplifikationsmechanismus für ihre Akkumulierung gesorgt (Brennecke et al. 2007, Gunawardane et al. 2007).

1.2 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum ist ein eukaryotischer Organismus aus der Gruppe der Amoebozoa (Adl et al. 2012). Er kommt in Waldböden vor, wo er sich durch Phagozytose von Hefen und Bakterien ernährt. Der Modellorganismus ist bekannt für seinen besonderen Lebenszyklus: Bei ausreichendem Nahrungsangebot wächst *D. discoideum* als einzellige Amöbe und vermehrt sich durch einfache Zellteilung. Wird die Nahrung jedoch knapp, formen die Einzelzellen einen multi-zellulären Organismus (Loomis 1975).

Im Zuge des 24-stündigen Entwicklungszyklus aggregieren zunächst $\sim 10^5$ Zellen. Geleitet werden sie durch Chemotaxis in Richtung eines cAMP-Gradienten. Im weiteren Verlauf bilden die Zellen multizelluläre Strukturen aus und durchlaufen verschiedene Stadien der Entwicklung. Am Ende entsteht ein Fruchtkörper, der im Wesentlichen aus Stiel- und Sporenzellen besteht (vgl. Abb. 1). Bei geeigneten Umweltbedingungen gehen aus den langlebigen Sporen wieder amöboide, 10-15 μm große Einzelzellen hervor (Kessin 2001).



Copyright, M.J. Grimson & R.L. Blanton

Abb. 1: Entwicklungsstadien und Verlauf des Entwicklungszyklus von *D. discoideum*

A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener *D. discoideum* Entwicklungsstadien. © M.J. Grimson & R.L. Blanton, Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University. **B:** Schematische Darstellung des 24-stündigen Entwicklungszyklus (verändert nach Chisholm et al. 2004). Die Phasen der Aggregation, der Multizellularität und des Wachstums sind angegeben.

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Laborstamm AX2 ist in der Lage, unter axenischen Bedingungen in Flüssigmedium zu wachsen, wobei die Generationszeit 8-9 Stunden beträgt (Watts et al. 1970). Seit 2005 ist das Genom des ebenfalls axenisch wachsenden Stammes AX4 vollständig sequenziert (Eichinger et al. 2005). Es ist haploid und besteht aus 34 Millionen Basenpaaren (Mb), die sich auf sechs Chromosomen und ein 88 kb großes extrachromosomales Palindrom verteilen. Letzteres beinhaltet die ribosomalen Gene und kommt in ca. 100 Kopien pro Nukleus vor. Weitere rDNA-Wiederholungen findet man zudem an den Telomeren, wo sie

vermutlich strukturell wichtige Funktionen wahrnehmen (Eichinger et al. 2005). Im Gegensatz zum eigentlichen Wildtypstamm NC4 und zu dem Laborstamm AX2 enthält AX4 eine Duplikation von 1,51 Mb des zweiten Chromosoms (Eichinger et al. 2005).

D. discoideum kodiert ca. 12.500 Gene, darunter auch eine beachtliche Zahl an Orthologen, die im Genom des Menschen vorkommen und die mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht werden können (Eichinger et al. 2005). Aufgrund des haploiden Genoms lassen sich – basierend auf homologer Rekombination – zudem leicht *Knockout*-Stämme herstellen (Faix et al. 2004). Darüber hinaus hat die Amöbe eine interessante phylogenetische Stellung (vgl. Abb. 2), da sie nach den Pflanzen, aber noch vor der Auseinanderentwicklung von Tieren und Pilzen divergiert ist (Eichinger et al. 2005).

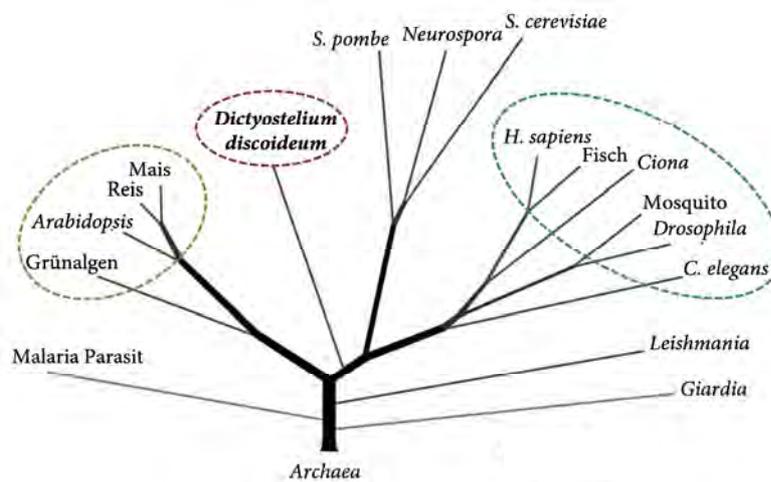


Abb. 2: Phylogenetische Einordnung von *D. discoideum* innerhalb der Eukaryoten

Die Abbildung zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der Eukaryoten, der auf Proteom-Daten basiert (verändert nach Eichinger et al. 2005). Die Pflanzen (Archaoplastida) sind grün, *Dictyostelium discoideum* als Vertreter der Amoebozoa ist rot und die Metazoen sind blau hervorgehoben.

Das Genom von *D. discoideum* ist mit 77,57 % sehr A/T-reich und enthält viele transposable Elemente (TEs), die einen Anteil von 10 % ausmachen. Das LTR-Retrotransposons DIRS-1 kommt am häufigsten vor, clustert an einem Ende eines jeden der telozentrischen Chromosomen und konstituiert vermutlich die Centromere (Glockner et al. 2001, Eichinger et al. 2005, Glockner et al. 2009, Dubin et al. 2010). Darüber hinaus sind Nicht-LTR-Retrotransposons der Klassen TRE3 und TRE5 sowie das LTR-Retrotransposon *skipper* verbreitet (Glockner et al. 2001).

1.3 RNA vermittelte Genregulation in *D. discoideum*

D. discoideum kodiert eine fast vollständige RNAi-Maschinerie: dazu zählen fünf Argonauten Proteine der PIWI-Unterfamilie (AgnA-AgnE), zwei Dicer-Homologe (DrnA und DrnB) und drei

RdRPs (RrpA-RrpC) (Cerutti et al. 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die putative Helikase HelF, die außerdem eine Domäne zur Bindung von dsRNA (dsRBD) aufweist, als Suppressor der siRNA vermittelten Genregulation fungiert (Popova et al. 2006).

Von den oben genannten Klassen kleiner regulatorischer RNAs konnten in der Amöbe bisher siRNAs und miRNAs identifiziert werden (Hinas et al. 2007, Avesson et al. 2012). Der überwiegende Anteil an siRNAs kann dem Retrotransposon DIRS-1 zugeordnet werden (Hinas et al. 2007). Außerdem existieren einige wenige *skipper* und TRE5-A spezifische siRNAs (Hinas et al. 2007). Die bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass Komponenten der RNAi-Maschinerie wenig redundante Funktionen bei der Regulation von Transposons wahrnehmen: AgnA und RrpC sind für die Akkumulierung DIRS-1 spezifischer siRNAs notwendig und haben somit eine entscheidende Funktion bei der Kontrolle dieses Elementes (Boesler et al. 2014, Wiegand et al. 2014). AgnC und AgnE tragen dagegen zur RNAi vermittelten Stilllegung von TRE5-A bei (Schmith et al. 2015). Neben siRNAs konnten in der Amöbe bisher 17 miRNAs identifiziert werden, deren Biogenese von DrnB abhängig ist (Hinas et al. 2007, Avesson et al. 2012). Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten ist jedoch noch verhältnismäßig wenig über die Prozessierung und Funktion dieser regulatorischen RNAs in *D. discoideum* bekannt.

1.4 Proteine der RNAi-Maschinerie

1.4.1 Die RNase III Enzyme Drosha und Dicer

Dicer und Drosha gehören zur Klasse der RNase III Endoribonukleasen und weisen in der Regel zwei RNase III Domänen (RIIIa und RIIIb) und eine Domäne zur Bindung von doppelsträngiger RNA (dsRBD) auf. Darüber hinaus enthalten Dicer-Homologe typischerweise eine Helikase-Domäne, eine Domäne unbekannter Funktion (DUF283) sowie eine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) Domäne (zusammengefasst in Doyle et al. 2012).

Dicer sind an der Prozessierung von siRNAs und miRNAs aus längeren Vorläufermolekülen beteiligt (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009). Drosha-Homologe bilden eine phylogenetisch eigenständige Gruppe unter den RNase III Endoribonukleasen und konnten bisher nur in tierischen Organismen identifiziert werden (Cerutti et al. 2006). Dort sind sie an der pri-miRNA Prozessierung im Kern beteiligt, was erstmals für das humane Homolog gezeigt werden konnte (Lee et al. 2003).

Im Zuge der dsRNA-Prozessierung bilden die beiden RNase III Domänen ein intramolekulares Pseudo-Dimer (vgl. Abb. 3A), wobei sie je eine Phosphodiesterbindung innerhalb der gegenüberliegenden RNA-Stränge hydrolytisch spalten (Han et al. 2004, Zhang et al. 2004). Dabei entstehen

die für miRNAs und siRNAs charakteristischen 3'-Einzelstrangüberhänge von zwei Nukleotiden. Die prozessierten Enden sind weiterhin durch ein 3'-OH und ein 5'-Monophosphat gekennzeichnet (Elbashir et al. 2001).

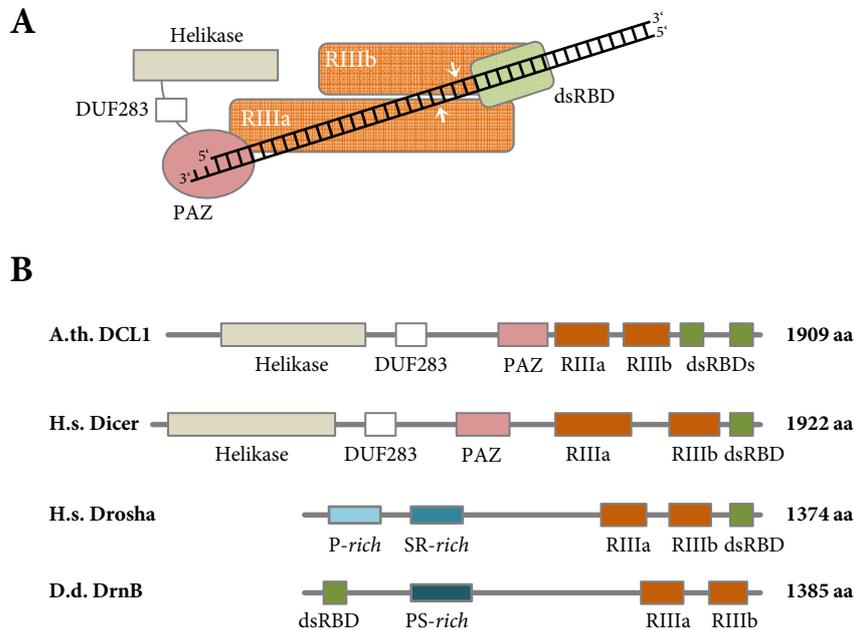


Abb. 3: RNase III vermittelte Prozessierung von dsRNA und Domänenstruktur

A: Schematische Darstellung der Dicer-vermittelten dsRNA-Prozessierung (verändert nach Zhang et al. 2004). Die für Dicer typischen Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die PAZ-Domäne bindet die 3'-Einzelstrangüberhänge von zwei Nukleotiden einer längeren dsRNA, die sukzessiv von Dicer prozessiert wird. Die RNase III Domäne RIIIa schneidet jenen Strang, dessen 3'-OH Ende in der PAZ-Domäne verankert ist. RIIIb schneidet den gegenüberliegenden Strang versetzt, sodass wiederum 2-Nukleotid 3'-Überhänge entstehen (Zhang et al. 2004). **B:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur verschiedener RNase III Enzyme und Angabe ihrer Größe (aa=Aminosäure). Die relevanten Informationen wurden der Datenbank InterPro entnommen (Mitchell et al. 2015). A.th.: *Arabidopsis thaliana*, H.s.: *Homo sapiens*, D.d.: *D. discoideum*. Helikase: Helikase-Domäne, RIII: RNase III-Domäne, P-rich, SR-rich, PS-rich: Bereiche, die reich an bestimmten Aminosäuren sind (P=Prolin, S=Serin, R=Arginin).

Die für Dicer-Homologe typische PAZ-Domäne kommt ebenfalls in Argonauten Proteinen vor. Sie erkennt und verankert die 3'-Einzelstrangüberhänge einer Duplex-RNA (Lingel et al. 2004, Ma et al. 2004). Eine weitere Bindetasche innerhalb der PAZ-Domäne vermittelt zudem die Interaktion mit dem 5'-Phosphatende, was Untersuchungen am humanen Dicer demonstrierten (Park et al. 2011). Park et al. konnten außerdem zeigen, dass die Verankerung am 5'-Ende für die präzise dsRNA-Prozessierung entscheidend ist: Dabei liegt die Dicer-spezifische Schnittstelle ca. 22 nt vom gebundenen 5'-Ende entfernt (Park et al. 2011).

Die Helikase Domäne befindet sich am N-terminus von Dicer-Homologen. Ihre Funktion variiert jedoch in Abhängigkeit vom betrachteten Protein: sie moduliert z.B. die Aktivität der Enzyme,

vermittelt Protein-Protein-Interaktionen und ist in einigen Fällen für die Prozessierung von endogenen siRNAs essentiell (zusammengefasst in Doyle et al. 2012).

Die DUF238 Domäne weist strukturelle Ähnlichkeiten zu bekannten dsRBDs auf (Dlatic 2006, Qin et al. 2010). In *A. thaliana* vermittelt sie Protein-Protein-Interaktionen: Die DUF238 Domäne von DCL1 bindet beispielsweise die zweite dsRBD seines Cofaktors HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) (Qin et al. 2010). Beide Proteine sind für die Prozessierung von miRNAs in Pflanzen essentiell (Han et al. 2004, Kurihara et al. 2004, Vazquez et al. 2004). Im Gegensatz dazu ist die entsprechende Domäne im humanen Dicer nicht für die Interaktion mit spezifischen dsRBP-Interaktionspartnern notwendig, jedoch spielt sie bei der Prozessierung von pre-miRNAs eine Rolle (Lee et al. 2006).

DsRBDs sind relativ kleine Proteindomänen, die in erster Linie dsRNA binden. Einige nicht kanonische dsRBDs vermitteln jedoch auch Protein-Protein Interaktionen, was häufig durch Dimerisierung erreicht wird (zusammengefasst in Fierro-Monti et al. 2000). Der Aufbau von dsRBDs wird detailliert im nächsten Abschnitt beschrieben. Ihre Bedeutung variiert im Kontext verschiedener RNase III Enzyme: Was den humanen Dicer betrifft, so scheint die dsRNA bindende Domäne für die katalytische Aktivität entbehrlich zu sein (Ma et al. 2012). DCL1 aus *A. thaliana* verfügt über zwei dsRBDs am C-terminus, wobei letztere für die Prozessierung von miRNAs *in vivo* essentiell ist: sie vermittelt zum einen die Interaktion mit HYL1 und ist zum anderen für die subnukleäre Lokalisation des Proteins verantwortlich (Kurihara et al. 2006, Fang et al. 2007). Anders als bei Dicer ist die in Drosha enthaltene dsRBD ebenfalls für die katalytische Aktivität des Proteins entscheidend (Han et al. 2004).

Die in *D. discoideum* kodierten Dicer Homologe DrnA und DrnB weisen im Gegensatz zu denen aus höheren Eukaryoten eine einfache Domänenstruktur auf: Sie besitzen zwei RNase III Domänen und eine dsRBD (Cerutti et al. 2006) und sind in dieser Hinsicht den Drosha-Homologen weitaus ähnlicher (vgl. Abb. 3B). Die PAZ- und die Helikase Domäne fehlen vollständig, wobei erstere in den von *D. discoideum* kodierten RdRPs vorkommt (Martens et al. 2002). Darüber hinaus variiert die Anzahl an kodierten Dicer-Homologen von Organismus zu Organismus: Der Mensch und *C. elegans* kodieren lediglich ein Dicer-Homolog, während *Drosophila melanogaster* über zwei (Dcr-1 und Dcr-2) und *A. thaliana* sogar über vier Proteine dieser Art (DCL1-DCL4) verfügt (Cerutti et al. 2006).

1.4.2 Proteine zur Bindung von dsRNA (dsRBPs)

In *in vivo* sind RNase III Enzyme wie Drosha und Dicer häufig mit dsRBPs assoziiert. Letztere enthalten in der Regel eine oder mehrere Domänen zur Bindung von dsRNA (dsRBDs) und

darüber hinaus keine weiteren funktionellen Proteindomänen. Sie sind u.a. an der Prozessierung kleiner regulatorischer RNAs oder an der Beladung von Effektorcomplexen beteiligt (Tabara et al. 1999, Liu et al. 2003, Han et al. 2004, Han et al. 2004, Forstemann et al. 2005, Parker et al. 2006).

Die dsRBD erstreckt sich über 65-70 Aminosäuren und kommt in verschiedenen Proteinfamilien vor. Ihre Tertiärstruktur wird maßgeblich durch die charakteristische Anordnung dreier antiparallel verlaufender β -Faltblätter und zweier α -Helices (α - β - β - β - α) determiniert (zusammengefasst in Masliah et al. 2013). Die zweite dsRBD des dsRNA bindenden Proteins A aus *Xenopus leavis* entspricht weitestgehend der Konsensus-Sequenz dieser Domänen. Kristallstrukturanalysen offenbarten, dass drei Regionen intensive Kontakte mit dem dsRNA-Substrat, einer A-Form RNA-Helix, eingehen: Die N-terminale α -Helix interagiert mit der kleinen Furche der dsRNA (Region 1). Die Schleife zwischen dem ersten und dem zweiten β -Faltblatt bildet Kontakte zu einer weiteren kleinen Furche (Region 2) aus, während konservierte Aminosäuren der C-terminal gelegenen α -Helix mit der dazwischen liegenden großen Furche interagieren (Region 3) (Ryter et al. 1998). In Abb. 4 ist exemplarisch die charakteristische Struktur einer dsRBD, ihre Bindung an ein dsRNA Substrat und ihre Konsensus-Sequenz gezeigt.

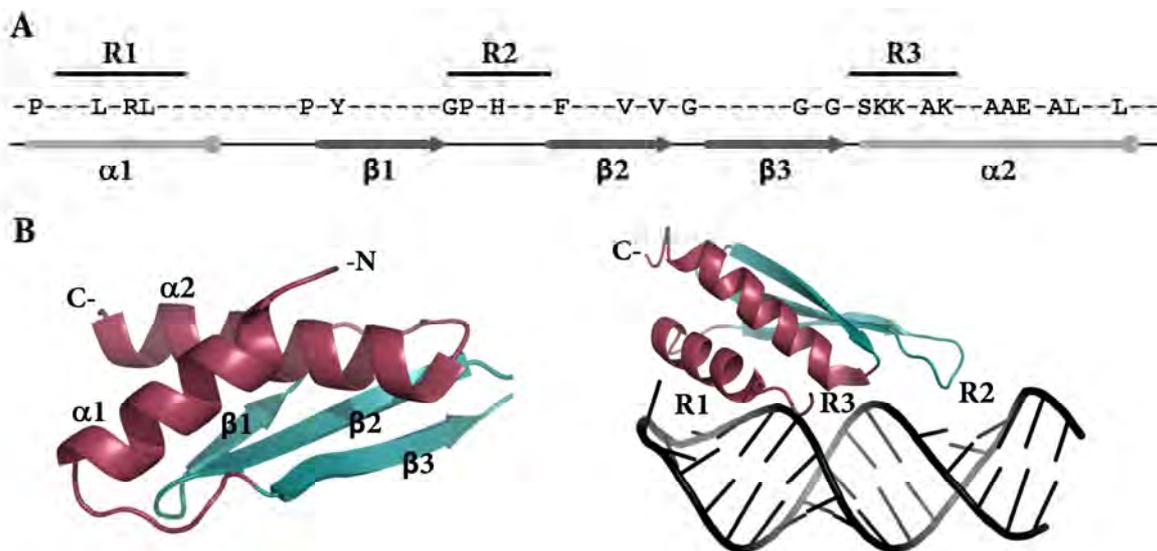


Abb. 4: Aufbau und Funktion von dsRBDs

A: Konsensus-Sequenz (>40 %), die aus dem Alignment 25 verschiedener dsRBDs abgeleitet wurde. Die Sekundärstruktur (α - β - β - β - α) und die Regionen (R), die zur dsRNA-Bindung beitragen, sind gekennzeichnet (verändert nach Masliah et al. 2013). **B:** Links: Kristallstruktur der ersten (kanonischen) dsRBD aus HYL1 (PDB-Nummer: 3ADG) zur Illustration der typischen Tertiärstruktur (verändert nach Yang et al. 2010). Rechts: Kristallstruktur der ersten in ADAR2 (Adenosin-Deaminase) enthaltenen dsRBD (PID-Nummer: 2L3C) aus *Rattus norvegicus* im Komplex mit einer dsRNA (verändert nach Stefl et al. 2010). Die Prozessierung und Darstellung der Kristallstrukturen erfolgte mit der Software Pymol Graphics System.

Aktuell stehen verschiedene Kristallstrukturen von dsRBDs als Komplex mit dsRNA-Substraten zur Verfügung. Der überwiegende Anteil der Protein-RNA-Kontakte ist auf das Phosphatrückgrat bzw. auf die Ribose (insbesondere die 2'-OH-Gruppe) der dsRNA beschränkt, was einerseits die Substratspezifität erklärt. Andererseits legen die Erkenntnisse nahe, dass die Bindung an dsRNA sequenzunabhängig ist und eher strukturelle Besonderheiten in der RNA zumindest in einigen Fällen die spezifische Bindung an ein dsRNA-Substrat vermitteln können (zusammengefasst in Fierro-Monti et al. 2000, Masliah et al. 2013).

DsRBPs, die in höheren Eukaryoten eine Funktion innerhalb der RNA vermittelten Genregulation wahrnehmen, sind durch mehrere dsRBDs charakterisiert (vgl. Abb. 5): DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) besitzt zwei dieser Domänen, interagiert mit dem humanen Drosha und ist für die miRNA-Prozessierung relevant (Han et al. 2004). Beide Domänen binden dabei primäre miRNA-Transkripte (Sohn et al. 2007). Das dsRBP HYL1 interagiert mit DCL1 aus *A. thaliana* und ist, wie oben erwähnt, für die miRNA-Prozessierung in Pflanzen essentiell (Kurihara et al. 2006). Das Protein weist eine kanonische und eine nicht kanonische dsRBD auf. Dabei ist die erste für die Bindung von dsRNA verantwortlich, während die zweite vermutlich die Dimerisierung des Proteins vermittelt (Yang et al. 2010). TRBP (*human immunodeficiency virus (HIV-1) transactivating response (TAR) RNA-binding protein*) besitzt drei dsRBDs, interagiert mit dem humanen Dicer sowie mit dem Argonauten Protein Ago2 und wird für die Assemblierung des miRNA-Effektorkomplexes (miRISC) benötigt (Chendrimada et al. 2005, Haase et al. 2005). Was die miRNA-Prozessierung in *Drosophila* betrifft, so ist das cytoplasmatische Protein Loqs (Loquacious), das ebenfalls drei dsRBDs aufweist, für die effiziente miRNA-Prozessierung relevant und interagiert dabei mit Dcr-1 (Forstemann et al. 2005). Im Gegensatz zu TRBP, ist Loqs jedoch nicht für die Beladung des Effektorkomplexes mit miRNAs essentiell (Liu et al. 2007).

Im Kontext des siRNA-Signalweges interagiert ein weiteres dsRBP aus *D. melanogaster*, nämlich R2D2, das seinerseits zwei dsRBDs besitzt, sowohl mit Dcr-2 als auch mit dem Argonauten Protein Ago-2. R2D2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Beladung des RISC-Komplexes mit siRNAs (Liu et al. 2003). Darüber hinaus erkennt das Protein die thermodynamischen Unterschiede an den Enden einer Duplex-siRNA: R2D2 bindet am stabiler gepaarten Ende und orientiert Ago-2 auf der gegenüber liegenden Seite (Tomari et al. 2004). So kann erklärt werden, warum in der Regel jener Strang, dessen 5'-Ende weniger stabil paart, als so genannter *guide* Strang fungiert und in den Effektorkomplex eingebaut wird (Schwarz et al. 2003). In *C. elegans* fungiert das dsRBD Protein RDE-4 als Spezifitätsfaktor für die Initiation des RNAi-Signalweges: RDE-4 erkennt und bindet doppelsträngige RNA-Vorläufermoleküle, bildet einen Komplex mit

dem einzigen Dicer-Protein des Organismus und initiiert so die Produktion von siRNAs (Tabara et al. 2002, Parker et al. 2006).

In Abb. 5 ist die Domänenstruktur verschiedener dsRBPs aus Eukaryoten gezeigt, die eine Funktion im miRNA Signalweg innehaben. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob dsRBPs aus *D. discoideum* vergleichbare Aufgaben erfüllen.

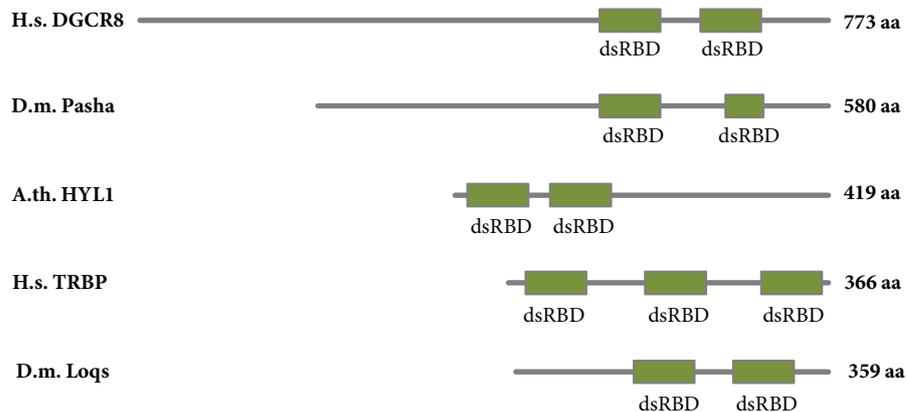


Abb. 5: Domänenstruktur verschiedener dsRBPs

Domänenstruktur von dsRBPs, die in verschiedenen Eukaryoten Funktionen im Rahmen des miRNA-Signalweges übernehmen. H.s.: *H. sapiens*, D.m.: *D. melanogaster*, A.th.: *A. thaliana*. Die relevanten Informationen wurden der Datenbank InterPro entnommen (Mitchell et al. 2015).

1.4.3 Argonauten Proteine

Argonauten Proteine gelten als die Schlüsselproteine der RNA-vermittelten Genregulation, da sie mit allen bekannten Klassen kleiner regulatorischer RNAs assoziiert sind und maßgeblich zur Stilllegung der Zielgene beitragen (Meister 2013). Einige Argonauten Proteine, darunter das in Säugetieren kodierte Protein Ago2, besitzen katalytische Aktivität und sind in der Lage, gebundene Ziel-mRNAs zu spalten, sofern die assoziierte regulatorische RNA im Bereich der Nukleaseaktivität perfekt komplementär ist (Liu et al. 2004, Meister et al. 2004). In vielen Fällen rekrutieren Vertreter dieser Familie weitere Proteinfaktoren, z.B. aus der GW182-Familie, um die posttranskriptionelle Stilllegung von Genen zu vermitteln: Dies führt zur Inhibierung der Translation oder zur exonukleolytischen Degradation einer Ziel-mRNA in tierischen Organismen (Liu et al. 2004, Zekri et al. 2009). Damit übereinstimmend lokalisieren Argonauten-Proteine in mehrzelligen Tieren zum Teil in cytoplasmatischen *Processing Bodies* (P-Bodies) (Liu et al. 2005, Sen et al. 2005). Es handelt sich dabei um abgegrenzte Bereiche im Cytoplasma, in denen unter anderem Proteine zu finden sind, die am Abbau von mRNAs beteiligt sind (zusammengefasst in Eulalio et al. 2007). Es gibt jedoch auch viele Beispiele, in denen Argonauten Proteine funktionsbedingt im Nukleus vorkommen: Das gilt für Ago1 aus *S. pombe* oder für AGO4 und

AGO6 aus *A. thaliana*, die für die Etablierung repressiver Chromatinstrukturen an bestimmten Loci im Genom verantwortlich sind (Zilberman et al. 2003, Verdel et al. 2004, Zheng et al. 2007).

Argonauten Proteine können aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in zwei Unterklassen eingeteilt werden: AGO-Proteine sind homolog zu *A. thaliana* AGO1, während PIWI-Proteine stärkere Ähnlichkeiten zu dem gleichnamigen Protein aus *D. melanogaster* aufweisen (Carmell et al. 2002). Letztere kommen, wie bereits erwähnt, insbesondere in der Keimbahn mehrzelliger Tiere vor und sind dort mit piRNAs assoziiert (Aravin et al. 2001, Gunawardane et al. 2007, Watanabe et al. 2008). Argonauten Proteine werden im Wesentlichen durch drei Domänen charakterisiert: Die PAZ-Domäne bindet das 3'-Ende und die MID (*middle*)-Domäne das 5'-Ende kleiner RNAs. Die Piwi-Domäne weist Ähnlichkeiten zur RNase H auf und vermittelt die katalytische Aktivität mancher Argonauten Proteine (zusammengefasst in Meister 2013). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass der N-terminus des humanen Ago2 notwendig ist, um die Entwindung einer gebundenen Duplex-siRNA zu initiieren (Kwak et al. 2012). Ago2 ist daraufhin in der Lage, jenen Strang, der nicht stabil in den Effektor inkorporiert wird und deshalb als *passenger* Strang bezeichnet wird, zu schneiden (Matranga et al. 2005, Rand et al. 2005). Schließlich entfernt die Endonuklease C3PO den *passenger* Strang aus dem Effektorkomplex, der daraufhin aktiv ist und Zielgene identifizieren kann (Liu et al. 2009).

In Abb. 6 ist beispielhaft die Domänenstruktur verschiedener Argonauten Proteine gezeigt. Zusätzlich ist die Kristallstruktur des humanen Ago2 und einer gebundenen einzelsträngigen RNA dargestellt (Schirle et al. 2012).

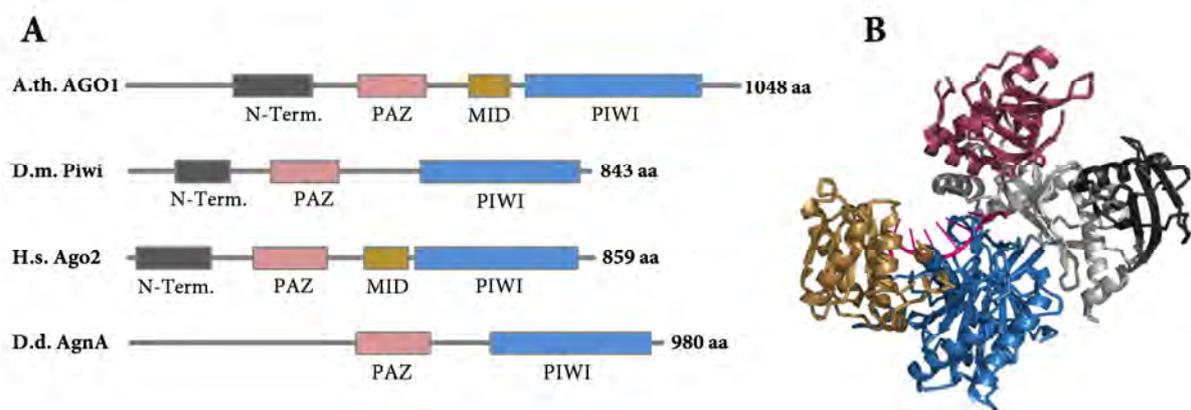


Abb. 6: Domänenstruktur verschiedener Argonauten Proteine

A: Gezeigt sind verschiedene Argonauten-Proteine und die bei InterPro (Mitchell et al. 2015) annotierten Proteindomänen. A.th.: *A. thaliana*, D.m.: *D. melanogaster*, H.s.: *H. sapiens*, D.d.: *D. discoideum*. **B:** Kristallstruktur des humanen Ago2 im Komplex mit einer einzelsträngigen RNA (PID-Nummer: 4OLB), die jedoch nur teilweise aufgelöst ist (verändert nach Schirle et al. 2012). Die Prozessierung der Kristallstruktur erfolgte mit der Software Pymol Graphics System. Die einzelnen Domänen sind farblich genauso markiert, wie in A. dargestellt. Linker sind in grau gezeigt.

In *D. discoideum* werden fünf Argonauten Proteine kodiert (AgnA-AgnE), die der PIWI-Unterklasse zugeordnet werden können (Cerutti et al. 2006) und die über eine PAZ und eine Piwi Domäne verfügen (Letunic et al. 2014). Dennoch erlaubt diese auf Sequenzähnlichkeit beruhende Zuordnung keine Aussage über die Funktion der Proteine in der einzelligen Amöbe. Bisher konnten, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, zwar siRNAs und miRNAs, aber keine piRNAs identifiziert werden.

Die Anzahl der im Genom kodierten Argonauten Proteine variiert zwischen verschiedenen Spezies: *Schizosaccharomyces pombe* weist beispielsweise nur ein Argonauten-Protein auf. Im Menschen werden acht, in *D. melanogaster* zwei und in *A. thaliana* zehn Proteine dieser Art kodiert (Hock et al. 2008). In *C. elegans* konnten sogar 27 Gene identifiziert werden, die für Argonauten-Proteine kodieren, wobei der überwiegende Teil zur so genannten WAGO-Gruppe gehört, die ihrerseits eine eigene Untergruppe darstellen (Yigit et al. 2006).

Die Eigenschaften der PAZ-Domäne wurden bereits im Kontext der RNase III Enzyme beschrieben (vgl. 1.4.1). An dieser Stelle soll nochmals kurz darauf hingewiesen werden, dass die Domäne prädestiniert dafür ist, Duplex-RNAs zu binden, die einen Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende und ein phosphoryliertes 5'-Ende aufweisen (Lingel et al. 2004, Ma et al. 2004, Park et al. 2011). Beides ist charakteristisch für regulatorische RNAs, die von Dicer prozessiert werden (Elbashir et al. 2001, Zhang et al. 2004).

Kristallstrukturanalysen prokaryotischer Argonauten-Proteine offenbarten, dass Piwi-Domänen ähnlich zu Ribonukleasen der RNase H-Familie bzw. zu deren katalytischen Domänen sind (Song et al. 2004, Ma et al. 2005, Parker et al. 2005). Wie oben bereits erwähnt, stellte sich heraus, dass zumindest einige Argonauten Proteine aus Eukaryoten als Endonukleasen aktiv sind und Ziel-RNAs in jenem Bereich schneiden, der komplementär zur assoziierten regulatorischen RNA ist (Elbashir et al. 2001, Liu et al. 2004, Meister et al. 2004). Im Wesentlichen bilden drei Aminosäuren innerhalb der PIWI-Domäne die notwendige katalytische Triade, die aus zwei Asparaginsäure-Resten und einem Histidin- oder einem weiteren Asparaginsäure-Rest (DDD oder DDH) besteht (Meister 2013). Die Endonuklease-Aktivität ist zudem von zweiwertigen Kationen abhängig (Liu et al. 2004). Nicht alle Argonauten Proteine, die über die charakteristische Triade verfügen, sind auch als *Slicer* aktiv, was beispielsweise für einige der humanen Proteine gilt (Meister et al. 2004). Vertretern der Piwi-Unterfamilie schreibt man in der Regel katalytische Aktivität zu, da sie an der Prozessierung von piRNAs direkt beteiligt sind (Brennecke et al. 2007, Gunawardane et al. 2007). Ein Alignment von Piwi-Domänen verschiedener Argonauten Proteine zeigte, dass AgnA aus *D. discoideum* über eine entsprechende Triade (DDH) verfügt (Daten nicht

gezeigt) und deshalb womöglich als *Slicer* aktiv ist. Jedoch besteht diesbezüglich noch keine experimentelle Evidenz.

Die MID-Domäne übernimmt vielfältige Aufgaben. Sie enthält eine basische Bindetasche, mit der sie das phosphorylierte 5'-Ende der *guide* RNA verankert (Ma et al. 2005, Parker et al. 2005). Die MID-Domäne vermittelt zudem Protein-Protein Interaktionen und ist in der Lage, bestimmte GW-Sequenzmotive zu binden, die als *Ago-Hook* bezeichnet werden und die in GW182 Proteinen zu finden sind (Till et al. 2007).

Argonauten Proteine vermitteln nicht nur die Stilllegung von Zielgenen, sondern werden in einigen Fällen auch für die Akkumulierung regulatorischer RNAs benötigt. Das gilt insbesondere für Vertreter der Piwi-Unterfamilie, die an der Prozessierung von piRNAs beteiligt sind (Brennecke et al. 2007, Gunawardane et al. 2007). Aber es gibt darüber hinaus auch weitere Beispiele: In *C. elegans* ist RDE-1, ein Protein der Argonauten-Unterfamilie, für die RdRP-vermittelte Amplifikation von siRNAs essentiell, weil es die dafür notwendige Proteinmaschinerie rekrutiert (Sijen et al. 2001, Pak et al. 2012).

1.4.4 RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRPs)

Phylogenetische Analysen zeigen, dass RdRPs unter den Eukaryoten weit verbreitet sind. Sie kommen beispielsweise in *C. elegans* (Rrf1-3, Ego1), *S. pombe* (Rdp1), *A. thaliana* (RDR1-6) und *D. discoideum* (RrpA-C) vor. Allerdings fehlen sie im Genom von *D. melanogaster* und von Säugetieren (Cerutti et al. 2006).

RdRPs können durch ihre Aktivität den Pool an bestehenden siRNAs in einer Zelle erweitern. Sie nutzen typischerweise eine Ziel-mRNA in der Zelle als Template, um längere dsRNAs herzustellen, die daraufhin von einem Dicer-Homolog prozessiert werden (zusammengefasst in Maida et al. 2011). In *S. pombe* trägt Rdp1 auf diese Weise zur Akkumulierung pericentromerischer siRNAs bei und interagiert mit dem einzigen Dicer-Homolog der Zellen (Colmenares et al. 2007). Auch die in Pflanzen kodierten RdRPs arbeiten nach einem ähnlichen Prinzip (zusammengefasst in Wassenegger et al. 2006). In *A. thaliana* wurde zudem der Begriff des *Spreadings* bzw. der Transitivität geprägt. Vaistij et al. initiierten beispielsweise die Bildung von siRNAs, die in einem engen Sequenzbereich komplementär zu einem GFP-Reportergen waren. In Abhängigkeit von RDR6 konnten in den Pflanzen schließlich siRNAs detektiert werden, die homolog zu benachbarten Regionen des Reportergens waren (Vaistij et al. 2002). Diese und weiterführende Studien weisen darauf hin, dass RdRPs *in vivo* in der Lage sind, die *de novo* Synthese von dsRNA zu initiieren, aber in einigen Fällen auch einen Primer als Startpunkt nutzen (Vaistij et al. 2002, Petersen et al. 2005, Luo et al. 2007). In *C. elegans* können RdRPs einzelne

siRNAs nach Vorlage einer Ziel-RNA synthetisieren, die deshalb durch ein 5'-Triphosphat gekennzeichnet sind (Pak et al. 2007, Sijen et al. 2007). Diese RdRP-abhängigen (sekundären) siRNAs akkumulieren somit unabhängig von der Aktivität eines RNase III Enzyms wie Dicer.

Über die biochemischen und strukturellen Eigenschaften eukaryotischer RdRPs ist relativ wenig bekannt. Ein Sequenzvergleich mit DNA-abhängigen RNA-Polymerasen (DdRPs) zeigte, dass sie genau wie die β' -Untereinheit von DdRPs eine konservierte DDPB (*double-psi β -barrel*)-Domäne aufweisen, die vermutlich zur katalytischen Aktivität beiträgt (Iyer et al. 2003). Bisher konnte die Kristallstruktur einer eukaryotischen RdRP allerdings noch nicht aufgelöst werden. In Abb. 7 ist exemplarisch die Domänenstruktur einiger RdRPs gezeigt.

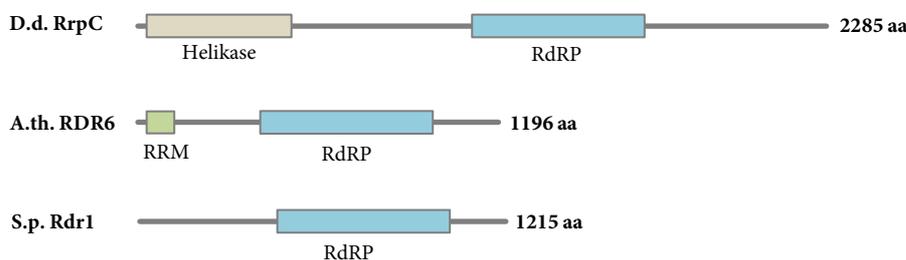


Abb. 7: Domänenstruktur verschiedener RdRPs

Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur verschiedener RdRPs. D.d.: *D. discoideum*, A.th.: *A. thaliana*, S.p.: *S. pombe*. Die Position der einzelnen Domänen und die Größe der entsprechenden Proteine wurde der Datenbank InterPro entnommen. Neben der funktionellen RdRP Domäne enthält RDR6 eine RNA bindende Domäne (RRM: RNA recognition motif). RrpC aus *D. discoideum* verfügt genau wie RrpA und RrpB über eine Helikase Domäne.

1.5 Der miRNA-Signalweg

1.5.1 Biogenese von miRNAs in Tieren

Bei vielen der miRNA-kodierenden Loci in Tieren handelt es sich um eigenständige Transkriptionseinheiten, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden (Cai et al. 2004, Lee et al. 2004). Die als pri-miRNA bezeichneten Transkripte werden am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende mit einem m⁷G-Cap versehen (Cai et al. 2004, Lee et al. 2004). Sie sind meist polycistronisch und kodieren mehrere miRNAs (Tanzer et al. 2004). Ein großer Anteil der tierischen miRNAs ist jedoch mit anderen Transkriptionseinheiten assoziiert: so befinden sich rund 40 % der identifizierten miRNAs in Introns (*sense* Orientierung) von Protein kodierenden Genen (Rodriguez et al. 2004).

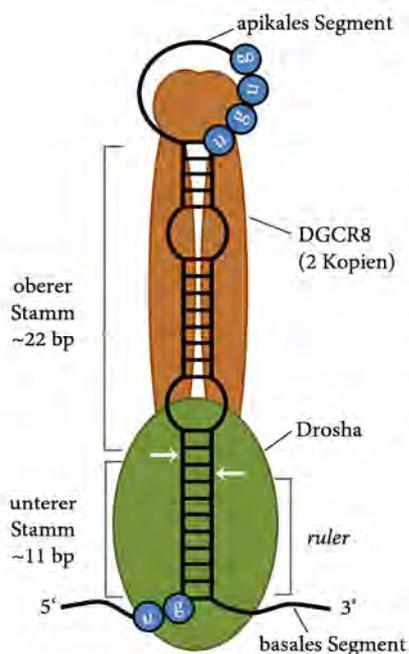
In Tieren sind Proteinkomplexe verschiedener Kompartimente an der Biogenese von miRNAs beteiligt. Im Nukleus vermittelt der Mikroprozessor, bestehend aus dem RNase III Enzym Drosha und seinem dsRBP Bindungspartner, den ersten Schritt der Prozessierung: Dabei werden aus pri-

miRNAs ca. 60-70 nt lange pre-miRNAs generiert, die den charakteristischen Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende aufweisen (Lee et al. 2003, Denli et al. 2004, Gregory et al. 2004, Han et al. 2004, Landthaler et al. 2004). Der Mikroprozessor ist für die Generierung funktioneller miRNAs entscheidend, da durch seine Aktivität bereits das eine Ende der kleinen regulatorischen RNA determiniert wird (Lee et al. 2003, Han et al. 2006, Nguyen et al. 2015).

Die dsRBP Komponente des tierischen Mikroprozessors wird in Säugetieren als DGCR8 und in *D. melanogaster* und *C. elegans* als Pasha (*partner of Drosha*) bezeichnet. Es handelt sich um homologe Proteine, die je zwei dsRBDs enthalten (Denli et al. 2004, Gregory et al. 2004, Han et al. 2004, Landthaler et al. 2004). In den genannten Publikationen konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von Drosha oder seines dsRBP-Interaktionspartners die Akkumulierung von pri-miRNAs und die Reduktion maturer miRNAs zur Folge hat.

Da sich pri-miRNAs in ihrer Sequenz unterscheiden, ging man davon aus, dass vorwiegend strukturelle Merkmale eine akkurate Biogenese durch den Mikroprozessor veranlassen. In Abb. 8 sind die generalisierten Strukturen einer humanen pri-miRNA dargestellt.

Abb. 8: Typische Struktur einer pri-miRNA in humanen Zellen und Position des Mikroprozessors



Die schematische Abbildung zeigt eine generalisierte pri-miRNA mit den typischen Elementen und den humanen Mikroprozessorkomplex (verändert nach Nguyen et al. 2015). Die pri-miRNA besteht aus einem doppelsträngigen Stamm, der insgesamt drei helikale Windungen aufweist (eine Windung entspricht ca. 11 bp), dem *Loop* (apikales Segment) und den flankierenden einzelsträngigen Sequenzen (basales Segment). Drosha dient als molekulares Lineal (*ruler*), indem es den Abstand vom Übergang der einzelsträngigen Bereiche im basalen Segment zur Schnittstelle im doppelsträngigen Stamm (11 bp) misst. Die beiden DGCR8-Kopien binden den doppelsträngigen Stamm im oberen Bereich und interagieren zusätzlich mit dem apikalen Segment (Nguyen et al. 2015). Sequenzmotive wie das basale UG oder das apikale GUG, die in pri-miRNAs angereichert sind, tragen ebenfalls zur effizienten Prozessierung durch Drosha und DGCR8 bei (Auyeung et al. 2013).

Sie besteht aus den basalen einzelsträngigen Segmenten, dem doppelsträngigen Stamm (*Stem*), der drei helikale Windungen aufweist und die mature miRNA beinhaltet, sowie dem apikalen *Loop* (Han et al. 2006). Lange Zeit wurde kontrovers diskutiert, ob der apikale *Loop* einer pri-miRNA oder ihre basalen Elemente für die exakte Prozessierung entscheidend sind: Drosha schneidet pri-miRNAs typischerweise eine helikale Windung (11 bp) von den basalen Segmenten bzw. zwei helikale Windungen (~22 bp) vom apikalen *Loop* entfernt (Zeng et al. 2005, Han et al. 2006,

Zhang et al. 2010). Heute ist bekannt, dass beide Elemente für die richtige Positionierung des Mikroprozessors relevant sind (Ma et al. 2013). Eine weitere Studie belegt zudem, dass darin vorkommende Sequenzmotive einen positiven Einfluss auf die pri-miRNA-Prozessierung haben (vgl. Abb. 8) (Auyeung et al. 2013).

Aus einer kürzlich veröffentlichten Studie geht hervor, dass der humane Mikroprozessor aus Drosha und zwei Kopien DGCR8 aufgebaut ist (Nguyen et al. 2015). Nguyen et al. konnten außerdem zeigen, dass Drosha und nicht DGCR8 strukturelle Elemente und Sequenzmotive im basalen Segment erkennt und in der Lage ist, die Distanz zur Schnittstelle (11 bp vom Übergang zum doppelsträngigen Stamm) zu messen. DGCR8 identifiziert wiederum Sequenzmotive im apikalen *Loop* und erhöht so die Genauigkeit der pri-miRNA Prozessierung (Nguyen et al. 2015). Die in DGCR8 enthaltenen dsRBDs binden pri-miRNAs (Sohn et al. 2007) und erhöhen durch ihre Affinität zum Substrat die Effizienz der Prozessierung (Nguyen et al. 2015).

In tierischen Organismen konnte darüber hinaus eine weitere Gruppe nicht-kanonischer miRNAs identifiziert werden. Sie kommen in kleinen Introns vor und werden deshalb als *mirtrons* bezeichnet. Ihre Prozessierung ist unabhängig vom Mikroprozessor: pre-miRNA ähnliche Vorläufermoleküle entstehen durch die Aktivität der *Splicing*-Maschinerie bzw. durch die Lariat-*Debranching*-Enzyme (Berezikov et al. 2007, Okamura et al. 2007). Daraufhin durchlaufen sie die für kanonische miRNAs typische Biogenese.

Die generierten pre-miRNAs, die eine typische Haarnadelstruktur ausbilden, werden durch das Export-Protein Exportin-5 aktiv in das Cytoplasma transportiert (Yi et al. 2003, Bohnsack et al. 2004). Durch die Aktivität eines Dicer-Homologs entstehen dort mature miRNA/miRNA* Duplexe (Grishok et al. 2001, Hutvagner et al. 2001, Ketting et al. 2001). Als miRNA* wird der zur miRNA komplementäre Strang bezeichnet, der in der Regel nicht stabil mit dem späteren Effektor-Komplex assoziiert ist.

In *D. melanogaster* übernimmt Dcr-1 in Assoziation mit dem dsRBP Loqs diese Aufgabe. Loqs ist, wie bereits in Kapitel 1.4.2 erwähnt, für die effiziente Produktion maturer miRNAs notwendig. Entsprechende Mutanten zeigen deshalb eine starke Anreicherung von pre-miRNAs (Forstemann et al. 2005, Jiang et al. 2005). Anders als in humanen Zellen ist das Protein allerdings nicht für die Beladung der entsprechenden Effektor-Komplexe relevant (Liu et al. 2007).

Der humane Dicer interagiert im Zuge der miRNA-Prozessierung mit den dsRBPs TRBP und PACT (*protein activator of PKR*) (Chendrimada et al. 2005, Haase et al. 2005, Lee et al. 2006). Es gibt allerdings widersprüchliche Aussagen darüber, ob die dsRNA bindenden Proteine die Biogenese maturer miRNAs wirklich erleichtern oder ob die zum Teil marginalen Effekte eher indirekter Natur sind. Im Rahmen der zitierten Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass TRBP

und PACT nicht nur mit Dicer, sondern auch mit Ago2 interagieren und eine zentrale Funktion bei der Assemblierung von Effektorkomplexen innehaben. Mittlerweile ist bekannt, dass noch weitere Proteinfaktoren für die Beladung eines Argonauten Proteins mit einer miRNA- oder siRNA-Duplex notwendig sind: Proteinchaperone (HSP90 in humanen Zellen bzw. Hsc90/Hsp70 in *D. melanogaster*) spielen in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. In einem ATP-abhängigen Prozess binden sie Argonauten Proteine, führen eine Änderung ihrer Konformation herbei und erleichtern so die Bindung regulatorischer RNAs (Iwasaki et al. 2010, Johnston et al. 2010). Im nächsten Abschnitt ist die miRNA-Prozessierung in Tieren und in Pflanzen schematisch dargestellt (vgl. Abb. 9).

1.5.2 Biogenese von miRNAs in Pflanzen

Bei den in Pflanzen kodierten miRNA-Loci handelt es sich überwiegend um eigenständige Transkriptionseinheiten, die ebenfalls von der RNA-Polymerase II transkribiert und entsprechend modifiziert werden (Allen et al. 2004, Xie et al. 2005, Szarzynska et al. 2009). Die im ersten Prozessierungsschritt entstehenden pre-miRNAs weisen im Vergleich zu denen aus tierischen Organismen jedoch stärkere Varianzen in ihrer Länge auf (Reinhart et al. 2002).

In Pflanzen ist ein einziger kernlokalisierter Komplex für die miRNA-Prozessierung notwendig, der im Wesentlichen aus drei Proteinkomponenten besteht. Dabei handelt es sich um das Dicer-Homolog DCL1 (Kurihara et al. 2004), um das dsRBP HYL1 (Han et al. 2004, Vazquez et al. 2004) und um das Zinkfingerprotein SERRATE (SE) (Lobbes et al. 2006, Yang et al. 2006). Sowohl HYL1 als auch SE erhöhen die Effizienz und die Genauigkeit der miRNA-Prozessierung (Dong et al. 2008). Dong et al. gehen weiterhin davon aus, dass sowohl HYL1 als auch SE mit pri-miRNAs interagieren und DCL1 auf diese Weise richtig positionieren. Im Fall von DCL1 hat bereits die Deletion der zweiten C-terminal gelegenen dsRBD eine starke Beeinträchtigung der miRNA-Prozessierung *in vivo* zur Folge (Kurihara et al. 2006). Aber auch *hyl1* und *se* Mutanten sind *in vivo* durch eine Akkumulierung von miRNA-Vorläufern und eine starke Reduktion der maturen miRNAs gekennzeichnet (Han et al. 2004, Vazquez et al. 2004, Kurihara et al. 2006, Lobbes et al. 2006, Yang et al. 2006). Die Mutanten zeigen darüber hinaus zahlreiche sich überlappende Phänotypen, was die Entwicklung der Pflanze betrifft: sie blühen im Vergleich zum Wildtyp deutlich später und haben kleinere und teilweise strukturell veränderte Blätter, um nur zwei Beispiele zu nennen (Lu et al. 2000, Schauer et al. 2002, Grigg et al. 2005).

Interessanterweise kann der molekulare und morphologische Phänotyp der *hyl1*-Mutanten durch die Expression der beiden DCL1-eigenen dsRBDs *in trans* kompensiert werden (Liu et al. 2013). Ein partieller *Rescue* konnte auch dann erzielt werden, wenn lediglich die zweite dsRBD von DCL1 im Hintergrund der *hyl1*-Mutanten vorhanden war (Liu et al. 2013). Diese Domäne ist

hauptsächlich an Protein-Interaktionen beteiligt, während die erste in DCL1 vorkommende dsRBD vermutlich für die Bindung von pri-miRNAs verantwortlich ist (Kurihara et al. 2006, Liu et al. 2013). Diese Versuche zeigen, dass beide zentralen Eigenschaften von dsRBDs im Rahmen der miRNA-Prozessierung relevant sind.

Verschiedene *in vitro* und *in vivo* basierte Ansätze offenbarten, dass DCL1, HYL1 und SE miteinander interagieren und einen Komplex bilden (Kurihara et al. 2006, Lobbes et al. 2006, Yang et al. 2006, Fang et al. 2007). DCL1 und HYL1 sind diffus im Nukleoplasma verteilt und zeigen distinkte perinukleoläre Anreicherungen, die als *Dicing-Bodies* (D-Bodies) bezeichnet werden (Song et al. 2004, Fang et al. 2007). Auch SE kommt zumindest partiell in D-Bodies vor. Weil sie ferner primäre miRNA-Transkripte enthalten, geht man davon aus, dass die miRNA-Prozessierung in diesen subnukleären Bereichen stattfindet (Fang et al. 2007). Aktuelle Studien zeigen, dass D-Bodies auch typische Cajal-Body Marker enthalten und es sich vermutlich um ein und dieselben Strukturen handelt (Pontes et al. 2013).

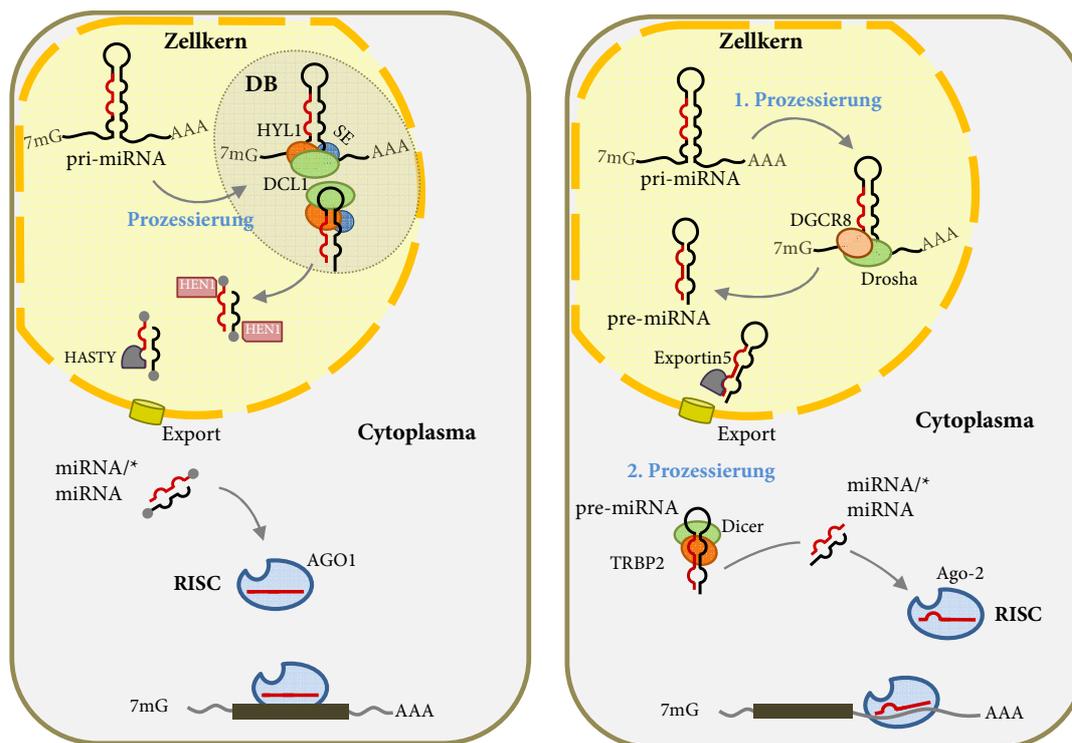


Abb. 9: miRNA-Prozessierung in Pflanzen und in Tieren

Links: Schematische Darstellung der miRNA-Prozessierung in *A. thaliana*. Pri-miRNAs werden in nukleären D-Bodies zu maturaen miRNAs prozessiert. Dafür ist im Wesentlichen ein Komplex aus DCL1, HYL1 und SE notwendig. Die maturaen miRNA-Duplexe werden von HEN1 methyliert und ins Cytoplasma transportiert. Dort wird die reife miRNA stabil in den Effektor Komplex (miRISC) eingebaut, der in seinem Zentrum ein Argonauten Protein (AGO1) enthält. Entsprechende Zielsequenzen befinden sich vermehrt im kodierenden Bereich einer mRNA (vgl. 1.5.3). **Rechts:** In tierischen Organismen werden pri-miRNAs im Nukleus zu pre-miRNAs prozessiert. Dafür ist der Mikroprozessorkomplex verantwortlich, der in humanen Zellen von Drosha und DGCR8 gebildet wird. Nachdem die pre-miRNAs ins Cytoplasma

transportiert worden sind, vermittelt Dicer in Assoziation mit dem dsRBP TRBP2 den zweiten Schritt der miRNA-Prozessierung, sodass mature miRNA Duplexe entstehen. Die reife miRNA wird auch hier stabil in den Effektor-Komplex eingebaut, der häufig Ago-2 im Zentrum enthält. Entsprechende Zielsequenzen findet man überwiegend in der 3'-UTR von mRNAs (vgl. 1.5.3). Die Abbildungen sind angelehnt an Zenk 2014 und an Bologna et al. 2013.

In *A. thaliana* sind *in vivo* neben DCL1, HYL1 und SE noch weitere Proteinkomponenten an der miRNA-Prozessierung beteiligt. Es ist z.B. bekannt, dass Proteine des m⁷G-Cap bindenden Komplexes (CBC) zur Akkumulierung maturer miRNAs beitragen (Laubinger et al. 2008). Darüber hinaus spielen RNA-bindende Proteine wie DWADLE (DDL), MOS2 oder TOUGH (TGH) eine wichtige Rolle: ähnlich wie beim CBC geht man davon aus, dass die Proteine die primäre miRNA-Prozessierung fördern, indem sie die Vorläufermoleküle entweder zum Ort ihrer Prozessierung bringen oder dafür notwendige Proteinkomponenten rekrutieren (Laubinger et al. 2008, Yu et al. 2008, Ren et al. 2012, Wu et al. 2013).

Die bei der Prozessierung entstehenden miRNA/miRNA* Duplexe werden am 3'-Ende, genauer gesagt an der 2'-OH Gruppe der Ribose durch die Hua *Enhancer* 1 Methyltransferase (HEN1) methyliert und so vor dem Abbau geschützt (Yu et al. 2005, Yang et al. 2006). In Pflanzen vermittelt das Export-Protein HASTY den Transport von miRNAs in das Cytoplasma, wobei das Protein nicht allein für diese Aufgabe verantwortlich zu sein scheint (Park et al. 2005). Mature miRNAs sind im Cytoplasma meist mit AGO1 (vgl. Abb. 9) assoziiert und vermitteln in der Regel die posttranskriptionelle Stilllegung von Zielgenen (Baumberger et al. 2005).

1.5.3 MiRNA vermittelte Regulation von Zielgenen

Sowohl in Pflanzen als auch in Tieren vermitteln miRNAs in der Regel die posttranskriptionelle Regulation ihrer Zielgene (zusammengefasst in Voinnet 2009, Huntzinger et al. 2011). Dennoch gibt es auch hier substantielle Unterschiede, was die *Target*-Erkennung und den Modus ihrer Stilllegung betrifft.

Bei der ersten identifizierten miRNA in Metazoen handelte es sich um *lin-4* aus *C. elegans*. Die miRNA reguliert den Transkriptionsfaktor Lin-14 in negativer Art und Weise, was für die Larvalentwicklung des Fadenwurms von Bedeutung ist (Lee et al. 1993). Lee et al. identifizierten mehrere putative Bindestellen in der 3'-UTR der *lin-14* mRNA, die jedoch nur teilweise komplementär zu *lin-4* waren. Es stellte sich jedoch bald heraus, dass dieser Mechanismus der Zielgen-Erkennung in Metazoen konserviert ist: Ein kurzer Bereich innerhalb tierischer miRNAs, der die Basen zwei bis acht vom 5'-Ende umfasst und der als *Seed*-Sequenz bezeichnet wird, ist für die Bindung einer Ziel-mRNA entscheidend; gleichzeitig wird dadurch die Vorhersage putativer *Targets* deutlich erschwert (Lewis et al. 2003). Da tierische miRNAs in ihrem zentralen Bereich

meist keine Bindung mit ihrer Ziel-RNA eingehen, ist eine endonukleolytische Spaltung durch das Argonauten Protein nicht möglich. Es gibt jedoch kontroverse Diskussionen darüber, ob die posttranskriptionelle Stilllegung primär durch die Degradation einer Ziel-mRNA oder durch die Inhibierung ihrer Translation erfolgt: neuere Studien weisen darauf hin, dass ersteres in Metazoen verbreiteter ist (zusammengefasst in Huntzinger et al. 2011).

In tierischen Zellen spielen GW182 Proteine, die mit Argonauten Proteinen interagieren und in *P-Bodies* vorkommen, eine entscheidende Rolle bei der miRNA-vermittelten Stilllegung von Ziel-mRNAs (Liu et al. 2005, Meister et al. 2005, Rehwinkel et al. 2005). Studien an *D. melanogaster* demonstrierten, dass GW182 in der Lage ist, PABPC1 (Poly(A) Binding Protein, Cytoplasmic 1) zu binden: man geht davon aus, dass dadurch die Zirkularisierung einer Ziel-mRNA verhindert und ihre Translation inhibiert wird (Zekri et al. 2009). Zekri et al. konnten außerdem zeigen, dass durch die Interaktion von GW182 mit PABC1 verstärkt solche Proteine rekrutiert werden, die eine Deadenylierung der Ziel-mRNA vermitteln. Erst nach dem Abbau des Poly(A)-Schwanzes entfernen *Decapping* Enzyme wie DCP1 und DCP2 das m⁷G-Cap und ermöglichen auf diese Weise die Degradation einer mRNA durch die 5'-3'-Exonuklease Xrn1 (zusammengefasst in Song et al. 2004). Damit übereinstimmend konnte erstmals in *D. melanogaster* gezeigt werden, dass neben GW182 auch DCP1 und DCP2 an der miRNA vermittelten Stilllegung von Zielgenen beteiligt sind (Liu et al. 2005).

Viele der in Pflanzen identifizierten miRNAs regulieren Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits Einfluss auf Entwicklungsprozesse nehmen. Die Vorhersage entsprechender Zielgene ist im Vergleich zu Metazoen verhältnismäßig einfach, weil miRNA-Bindestellen meist im Proteinkodierenden Bereich einer *Target*-RNA zu finden sind und die regulatorischen RNAs weitestgehend komplementär dazu sind (Rhoades et al. 2002, Jones-Rhoades et al. 2004). In *A. thaliana* sind miRNAs oft mit AGO1 assoziiert. Das Protein ist endonukleolytisch aktiv und in der Lage, entsprechende Ziel-mRNAs zu schneiden (Baumberger et al. 2005). Neuere Studien weisen darauf hin, dass miRNA-Effektorkomplexe auch die translationale Kontrolle ihrer *Targets* vermitteln und dass dieser Modus in Pflanzen ebenfalls verbreitet ist (Brodersen et al. 2008).

1.6 Die siRNA vermittelte Genregulation

1.6.1 SiRNAs und ihre Funktion in Säugetieren und in *Drosophila*

Neben piRNAs sind endogene siRNAs in Säugetieren an der Kontrolle transposabler Elemente beteiligt. Die Sequenzierung kleiner regulatorischer RNAs aus Maus Oozyten offenbarte, dass der überwiegende Teil der identifizierten siRNAs von Retrotransposons abstammte. Da ihre Prozessierung von Dicer abhängig ist, akkumulieren entsprechende Transkripte, wie z.B. die des LTR 10 Retrotransposons (RLTR10) im *Knockout*-Hintergrund (Watanabe et al. 2008). Bereits zuvor konnten in humanen Zelllinien endogene siRNAs identifiziert werden, die vom LINE-1 Retrotransposon abstammen (Yang et al. 2006). Dabei handelt es sich um ein verbreitetes Element, das ca. 17 % des menschlichen Genoms ausmacht (Lander et al. 2001). Es besteht experimentelle Evidenz, dass bidirektionale Transkripte des LINE-1 Retrotransposons und daraus resultierende dsRNA-Moleküle die Prozessierung von siRNAs initiieren (Yang et al. 2006). Endogene siRNAs sind ebenfalls mit Ago2 assoziiert, der, wie bereits erwähnt, als *Slicer* aktiv und in der Lage ist, komplementäre Ziel-mRNAs endonukleolytisch zu spalten (Meister et al. 2004, Watanabe et al. 2008).

In *D. melanogaster* ist Ago2 vorwiegend mit siRNAs assoziiert und daher die zentrale Komponente des RISC (Okamura et al. 2004). Während der Produktion exogener siRNAs ist Dicer-2 mit R2D2 assoziiert (Liu et al. 2003). Die beiden Proteine sind Teil des so genannten *RISC Loading* Komplexes (RLC), wobei R2D2 bestimmt, welcher Strang der Duplex-siRNA stabil in den Effektor-Komplex eingebaut wird (Tomari et al. 2004). Dieser wird von Hen1 methyliert (Horwich et al. 2007) und Ago2 kann daraufhin eine gebundene Ziel-mRNA endonukleolytisch spalten (Rand et al. 2004). Exogene siRNAs schützen adulte Fliegen unter anderem vor Viren und vermitteln auf diese Weise Immunität (Wang et al. 2006).

Neben exogenen siRNAs konnten in *D. melanogaster* auch endogene siRNAs identifiziert werden, die mit Ago2 präzipitieren. Ähnlich wie in Säugern, stammt der überwiegende Teil dieser siRNAs von Transposons ab (Czech et al. 2008). Wenn die Expression von Ago2 im Hintergrund von S2 Zellen reduziert wird, akkumulieren die entsprechenden mRNAs (Rehwinkel et al. 2006). Eine weitere Quelle endogener siRNAs sind konvergierende Transkripte oder solche, die von strukturierten Loci abstammen. Im Zuge ihrer Prozessierung interagiert Dicer-2 allerdings überwiegend mit Loqs und nicht mit R2D2, wie es bei exogenen siRNAs der Fall ist (Czech et al. 2008). In Abb. 10 sind die Prozessierungswege endogener und exogener siRNAs skizziert.

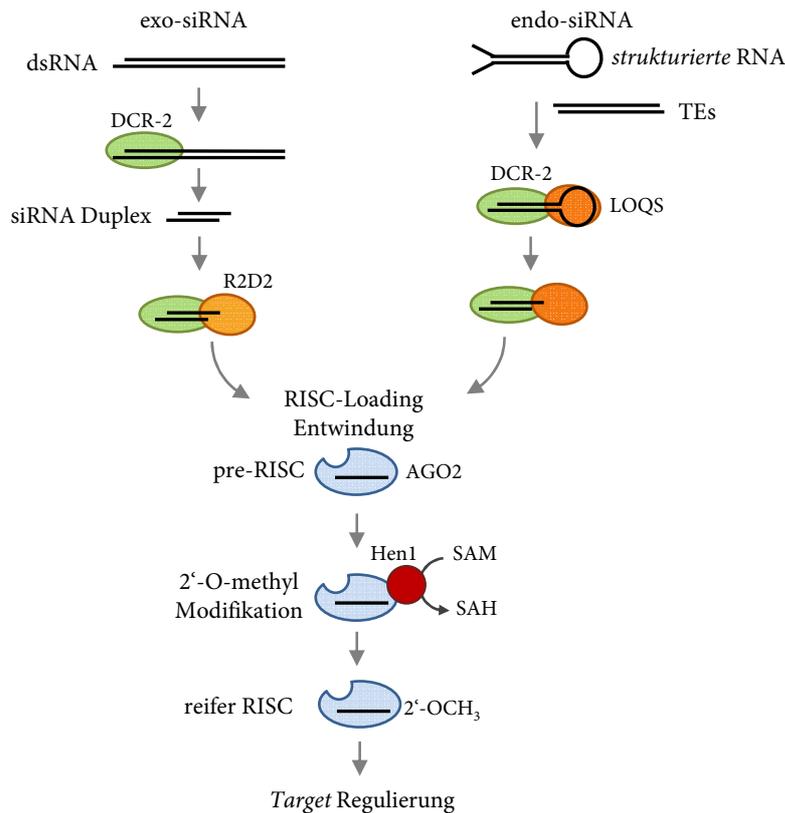


Abb. 10: Prozessierung von siRNAs in *D. melanogaster*

Schematische Abbildung der siRNA-Prozessierung in *D. melanogaster* (verändert nach Ghildiyal et al. 2009). Im Zuge der exogenen siRNA-Prozessierung interagiert DCR-2 vorwiegend mit R2D2, während LOQS als dsRBP-Partner bei der Prozessierung von endogenen siRNAs zur Verfügung steht. Die siRNAs werden in einen Effektorcomplex geladen, der AGO2 im Zentrum enthält. Nachdem die gebundene siRNA methyliert wurde, ist der aktive RISC entstanden, der die posttranskriptionelle Stilllegung entsprechender Zielgene vermittelt.

1.6.2 SiRNAs und ihre Prozessierung in *C. elegans*

C. elegans kodiert ein einziges Dicer Homolog, das im Zuge der siRNA-Prozessierung mit dem dsRBP RDE-4 assoziiert ist (Tabara et al. 2002, Parker et al. 2006). Allerdings sind Dicer-abhängige (primäre) siRNAs, die aus dsRNA prozessiert werden, eher unterrepräsentiert, weil RdRPs für eine deutliche Signalamplifikation sorgen (Pak et al. 2007, Sijen et al. 2007, Pak et al. 2012). In *C. elegans* nutzen RdRPs eine Ziel-mRNA, um einzelsträngige siRNAs zu synthetisieren, wobei es sich dann um individuelle RdRP-Produkte mit *antisense* Polarität handelt, die durch ein Triphosphat am 5'-Ende gekennzeichnet sind (Pak et al. 2007, Sijen et al. 2007). Diese siRNAs werden allgemein hin als sekundäre siRNAs bezeichnet. Sie werden auf Argonauten Proteine der WAGO-Unterfamilie transferiert, die vermutlich die Degradation der Ziel-mRNA vermitteln (Yigit et al. 2006).

Das Argonauten Protein RDE-1 spielt bei der Produktion von sekundären siRNAs eine entscheidende Rolle und verhindert gleichzeitig eine unkontrollierte Signalamplifikation. Es ist

seinerseits mit primären siRNAs assoziiert und kann RdRPs deshalb gezielt zu komplementären Ziel-mRNAs rekrutieren (Yigit et al. 2006, Pak et al. 2012). Diese Funktion ist dabei unabhängig von seiner katalytischen Aktivität und einer möglichen Spaltung der Ziel-mRNA (Pak et al. 2012).

Es ist hinreichend bekannt, dass exogene dsRNA-Moleküle, die in *C. elegans* eingebracht werden, die Stilllegung der entsprechenden Zielgene induzieren (Fire et al. 1998, Pak et al. 2012). Der Fadenwurm prozessiert aber auch zahlreiche endogene siRNAs, die beispielsweise von Transposons abstammen (Ruby et al. 2006). Man geht davon aus, dass RDE-1 hauptsächlich die Amplifikation exogener siRNAs einleitet, während das Argonauten Protein ERGO-1 vermutlich eine äquivalente Funktion bei der Akkumulation endogener siRNAs übernimmt (Yigit et al. 2006). Die Prozessierung exogener siRNAs ist exemplarisch in Abb. 11 dargestellt.

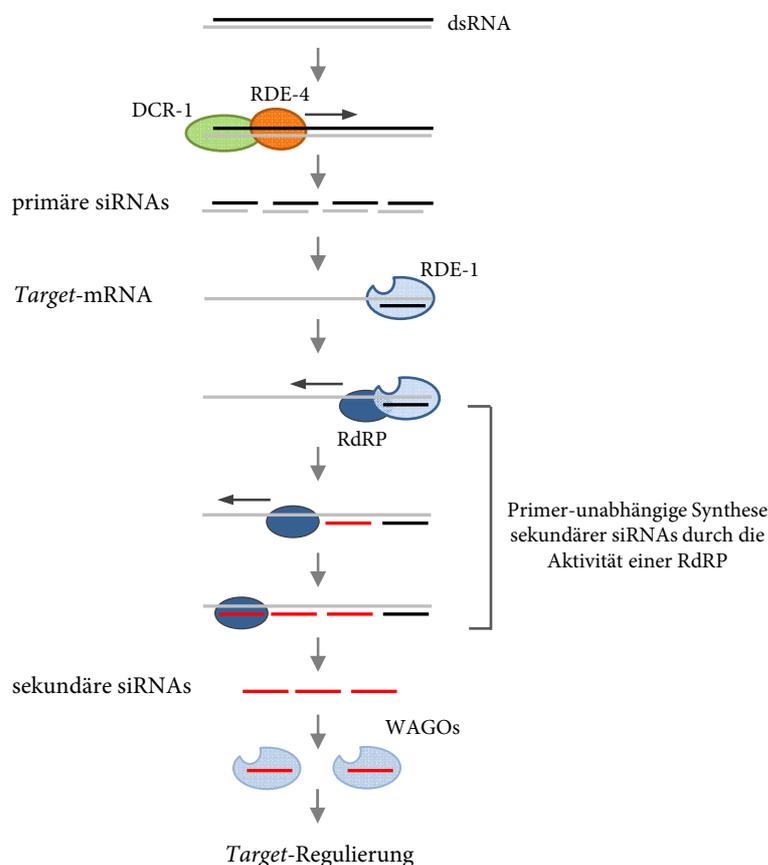


Abb. 11: Prozessierung und Amplifikation von siRNAs in *C. elegans*

Die Abbildung zeigt die Prozessierung und Amplifikation exogener siRNAs in *C. elegans* (Ghildiyal et al. 2009). Primäre siRNAs werden durch die Aktivität von Dicer aus einer dsRNA prozessiert. RDE-1 ist mit primären siRNAs assoziiert und so in der Lage, *Target*-mRNAs zu binden. Es rekrutiert daraufhin RdRPs, die sekundäre siRNAs mit *antisense* Polarität synthetisieren. Diese assoziieren mit Argonauten Proteinen der WAGO-Untergruppe und vermitteln die posttranskriptionelle Stilllegung der Zielgene.

1.6.3 CasiRNAs und exogene siRNAs in *A. thaliana*

A. thaliana kodiert vier Dicer-Homologe, sechs RdRPs und zehn Argonauten Proteine (Cerutti et al. 2006), was womöglich die hohe Diversifizierung bei der Produktion endogener siRNAs widerspiegelt (Ghildiyal et al. 2009). Die 24 nt langen *cis-acting* siRNAs (casiRNAs) machen dabei den größten Anteil der endogenen siRNAs aus und können oftmals Transposons zugeordnet werden (Xie et al. 2004). Deshalb soll diese Unterklasse im Folgenden näher beschrieben werden.

CasiRNAs sind mit AGO4 und mit AGO6 assoziiert, die vermutlich indirekt zur Akkumulierung dieser RNAs beitragen, auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus nicht vollständig verstanden ist (Zilberman et al. 2003, Zhang et al. 2004). Die casiRNAs leiten AGO4 bzw. AGO6 zu entsprechenden Loci im Genom, wo die Proteine sowohl die Cytosin-Methylierung als auch die von Histon H3 an Position Lysin 9 (H3K9) vermitteln, was schließlich zur Etablierung repressiver Chromatinstrukturen führt (Zilberman et al. 2003, Zheng et al. 2007). Für die Produktion dieser endogenen siRNAs sind DCL3 und RDR2 maßgeblich verantwortlich (Xie et al. 2004). RDR2 nutzt die Ziel-RNA, um längere dsRNAs zu synthetisieren, die wiederum von DCL3 prozessiert werden. Im Hintergrund von *rdr2-1* Mutanten und *dcl3-1* Mutanten sind casiRNAs, wie z.B. jene, die von dem Transposon AtSN1 abstammen, stark reduziert (Xie et al. 2004). Sie zeigen ebenfalls eine verringerte Cytosin-Methylierung an AtSN1, was ebenso für *ago4* Mutanten gilt (Zilberman et al. 2003, Xie et al. 2004). Für die Akkumulierung von sekundären casiRNAs ist darüber hinaus die DNA-abhängige RNA-Polymerase IV (Pol IV) essentiell (Onodera et al. 2005). Man geht davon aus, dass Pol IV von casiRNAs zu entsprechenden Loci im Genom rekrutiert wird, wo sie bereits methylierte DNA transkribiert. Die Transkripte können wiederum von RDR2 genutzt werden, um dsRNA Substrate für die Generierung von sekundären siRNAs zu synthetisieren. Auf diese Weise wird die transkriptionelle Kontrolle insgesamt verstärkt (zusammengefasst in Wassenegger et al. 2006).

RDR2 und DCL3 lokalisieren ausschließlich im Kern und sind in perinukleolären Cajal-Bodies angereichert (Pontes et al. 2013). Nach der Prozessierung werden endogene siRNAs durch HEN1 methyliert, was gleichermaßen für die miRNAs in *A. thaliana* (vgl. Kapitel 1.5.2) zutreffend ist (Yang et al. 2006). Obwohl casiRNAs im Kern die transkriptionelle Kontrolle von Zielgenen vermitteln, konnte ein beachtlicher Teil im Cytoplasma der Zellen detektiert werden. Schließlich stellte sich heraus, dass AGO4 im Cytoplasma mit casiRNAs beladen und der Effektorcomplex erst daraufhin in den Nukleus transportiert wird (Ye et al. 2012). Die Prozessierung von casiRNAs ist in Abb. 12 dargestellt.

In Pflanzen können sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA-Moleküle die Bildung exogener siRNAs auslösen: Wenn Transgene als inverse *Repeats* in das Genom integrieren,

können Transkripte ggf. einen Doppelstrang ausbilden und die Produktion exogener siRNAs initiieren. Aber auch *sense* Transkripte hoch exprimierter Transgene, die nur in einer einzigen Kopie vorhanden sind, werden durch die Aktivität von RdRPs in dsRNA konvertiert, was gleichermaßen für die RNA einiger Viren gilt (Wassenegger et al. 2006, Ghildiyal et al. 2009). In den zuletzt genannten Beispielen spielt die RdRP RDR6 eine entscheidende Rolle, da sie schließlich die posttranskriptionelle Stilllegung der entsprechenden *Targets* initiiert (Dalmay et al. 2000, Mourrain et al. 2000, Beclin et al. 2002). Im Fall der transgenen Transkripte geht man davon aus, dass jene, die nicht mit einem m⁷G-Cap versehen oder nicht polyadenyliert sind, von der RDR6 als aberrant erkannt werden, woraufhin ihre Stilllegung eingeleitet wird (Gazzani et al. 2004, Luo et al. 2007).

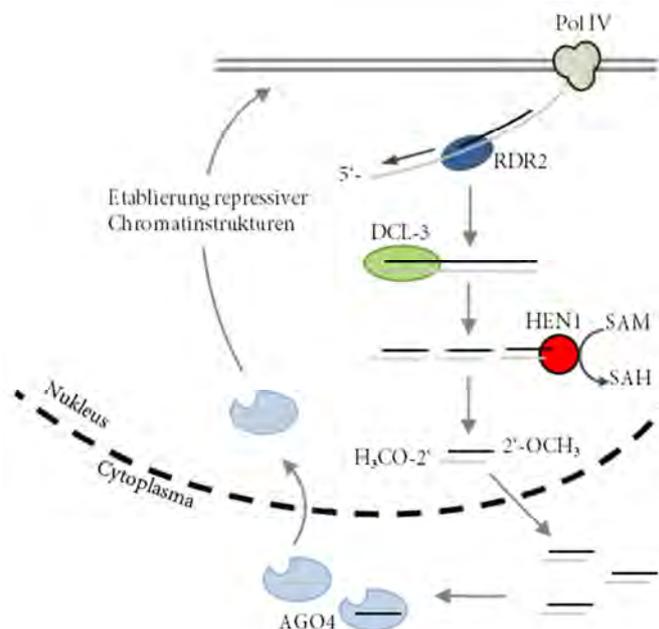


Abb. 12: CasiRNA vermittelte transkriptionelle Stilllegung von Zielgenen

Die Produktion sekundärer casiRNAs ist von Pol IV, RDR2 und DCL3 abhängig. Pol IV Transkripte werden von der RdRP in dsRNA konvertiert, die anschließend von DCL3 in casiRNAs prozessiert wird. Diese kleinen RNAs werden von HEN1 methyliert und in das Cytoplasma transportiert, wo AGO4 entsprechend beladen wird. Nach der Translokation des Effektor-Komplexes in den Kern vermittelt AGO4 die DNA- und die H3K9-Methylierung und etabliert repressive Chromatinstrukturen an entsprechenden Loci. Dabei handelt es sich häufig um transposable Elemente. Die Abbildung wurde verändert nach Castel et al. 2013.

1.6.4 SiRNA vermittelte transkriptionelle Kontrolle in *S. pombe*

Die RNA-vermittelte transkriptionelle Kontrolle ist insbesondere in *S. pombe* detailliert untersucht. Die ersten siRNAs, die in dem Modellorganismus identifiziert werden konnten, stammen von pericentromerischen Wiederholungen ab (Reinhart et al. 2002). Es stellte sich heraus, dass die RNAi-Maschinerie, darunter das Argonauten Protein Ago1, das Dicer-Homolog Dcr1 und die RdRP Rdp1 für die Etablierung von Heterochromatin im Bereich dieser Loci verantwortlich ist. Maßgeblich dafür ist die Anreicherung von H3K9me (Heterochromatin-Marker), was für die Funktionalität der Centromere entscheidend ist (Volpe et al. 2002).

Die pericentromerischen Wiederholungen werden überwiegend während der S-Phase des Zellzyklus transkribiert (Reinhart et al. 2002). Dabei entstehen dsRNA-Moleküle, die vermutlich

als Substrat für Dicer dienen (Volpe et al. 2002). Ago1 ist mit pericentromerischen siRNAs assoziiert und bildet die Schlüsselkomponente des RITS-Komplexes, der auf diese Weise zu wachsenden pericentromerischen Transkripten geleitet wird. Darüber hinaus enthält der RITS-Komplex das Protein Chp1, das aufgrund seiner Chromodomäne in der Lage ist, methyliertes H3K9 zu binden (Verdel et al. 2004). Der RITS-Komplex rekrutiert daraufhin Clr4, die einzige in *S. pombe* kodierte Histon-Methyltransferase, die in einem Komplex namens *cryptic loci regulator* (CLRC) vorkommt und für die Anreicherung von H3K9me sorgt (Zhang et al. 2008). Rdp1 kommt ebenfalls in einem Komplex vor und interagiert mit Dcr1, Clr4 und auch mit Ago1 (Motamedi et al. 2004, Colmenares et al. 2007). Die RdRP wird somit gezielt zu pericentromerischen Bereichen rekrutiert, wobei die Assoziation mit dem Dicer Homolog die dsRNA Synthese fördert (Colmenares et al. 2007). Die anschließende Dicer vermittelte Prozessierung führt zu einer Amplifikation der siRNAs und in der Folge zur Ausbreitung von Heterochromatin innerhalb der pericentromerischen Bereiche (zusammengefasst in Castel et al. 2013).

1.7 Das DIRS-1 Retrotransposon in *D. discoideum*

Retrotransposons sind mobile Elemente, die sich über eine RNA-Zwischenstufe vermehren und nach ihrer Amplifikation neue cDNA-Kopien in das Genom integrieren (*copy and paste* Mechanismus). Dazu zählen LTR-Retrotransposons, nicht-LTR-Retrotransposons (wobei LTR für *long terminal repeat* steht) und Retroviren (zusammengefasst in Havecker et al. 2004).

LTR-Retrotransposons werden basierend auf Sequenzähnlichkeiten der kodierten Reversen Transkriptase (RT) in verschiedene Gruppen eingeteilt: DIRS-1 ist Mitglied und Namensgeber einer bisher nicht detailliert untersuchten Familie von Tyrosin-Retrotransposons, die anstelle einer Integrase eine Tyrosin-Rekombinase (YR) kodieren (Goodwin et al. 2001, Poulter et al. 2005). Entgegen ursprünglicher Annahmen sind DIRS-ähnliche Elemente in Eukaryoten durchaus weit verbreitet. Bisher konnte die Existenz in 61 Spezies bestätigt werden, darunter Fische, Amphibien, Nematoden, Arthropoden und einige Pilze. Vollständige Elemente fehlen hingegen in Säugetieren sowie in den meisten Pflanzen (Piednoel et al. 2011).

Vieles, was über LTR-Retrotransposons und ihre Amplifikation bekannt ist, stammt aus detaillierten Untersuchungen an den Ty1 und Ty5 Retrotransposons in *S. cerevisiae*: Die LTR-Sequenzen flankieren die kodierenden Bereiche, die typischerweise aus zwei offenen Leserahmen bestehen: ORF1 kodiert das Hüllprotein GAG, während ORF2 die so genannten Pol-Gene enthält. Sie umfassen eine Protease, eine Integrase, eine Reverse Transkriptase (RT) und eine assoziierte RNase H (RH) Domäne. Die ORFs werden durch die RNA-Polymerase II transkribiert, die die linke LTR als Promotor erkennt. Die kodierten Proteine, die allesamt für die Amplifikation der

LTR-Retrotransposons notwendig sind, werden anschließend im Cytoplasma translatiert. GAG bildet die strukturelle Komponente von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs), in denen die cDNA-Synthese stattfindet. Sie enthalten neben den kodierten Proteinen auch Transposon-spezifische mRNA sowie tRNAs, die als Startpunkt (Primer) der cDNA-Synthese dienen (zusammengefasst in Voytas et al. 2002). Heute ist bekannt, dass verschiedene *P-Body* Komponenten für die Assemblierung funktioneller VLPs in *S. cerevisiae* notwendig sind (Checkley et al. 2010). Nachdem die cDNA-Synthese (Minus- und Plusstrang) abgeschlossen ist, müssen die doppelsträngigen DNA-Moleküle in das Genom integriert werden. Die Ty1-Integrase enthält z.B. ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und ist vermutlich für die Translokation des Pre-Integrationskomplexes in den Kern verantwortlich, der neben der Integrase selbst die vollständige cDNA-Kopie des Transposons beinhaltet (Moore et al. 1998). Die Integrase vermittelt den Einbau der cDNA in das Genom der Wirtszelle. Auf diese Weise ist der Amplifikationszyklus des LTR-Retrotransposons vollständig abgeschlossen (zusammengefasst in Voytas et al. 2002).

Das DIRS-1 Retrotransposon aus *D. discoideum* weist, wie viele andere Vertreter der gleichnamigen Gruppe, einige strukturelle Besonderheiten auf: Das mobile Element verfügt über drei statt der sonst üblichen zwei offenen Leserahmen (vgl. Abb. 13). Diese werden zudem von inversen terminalen *Repeats* (ITRs, *inverted terminal repeats*) flankiert, die sich in ihrer Sequenz unterscheiden. Das Element besitzt zudem eine Region, die als ICR (*internal complementary region*) bezeichnet wird und die ihrerseits Sequenzen beinhaltet, die revers komplementär zu den äußeren Enden der ITRs sind (Cappello et al. 1985). Zudem fehlt dem Element eine Protease und anstelle einer DDE-Integrase kodiert DIRS-1, wie oben erwähnt, eine Tyrosin-Rekombinase (YR), die für die Integration neuer Elemente ins Genom verantwortlich zu sein scheint (Goodwin et al. 2001, Poulter et al. 2005).

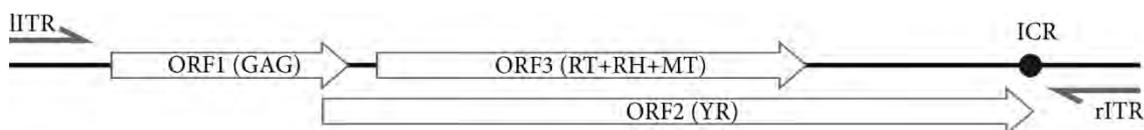


Abb. 13: Schematische Übersicht des DIRS-1 Retrotransposons in *D. discoideum*.

Ein vollständiges DIRS-1 Element (ca. 4800 bp) besteht aus der linken und der rechten ITR, die drei überlappende offene Leserahmen flankieren (Cappello et al. 1985). ORF1 kodiert ein putatives GAG Protein, ORF2 eine Tyrosin Rekombinase (YR) und ORF3 die Pol Gene, die eine Reverse Transkriptase (RT)- eine RNase H (RH)- und eine Methyltransferase (MT)-Domäne beinhalten (Cappello et al. 1985, Goodwin et al. 2001, Goodwin et al. 2004). Der als ICR bezeichnete Abschnitt weist Sequenzen auf, die revers komplementär zu den äußeren Enden der ITRs sind (Cappello et al. 1985).

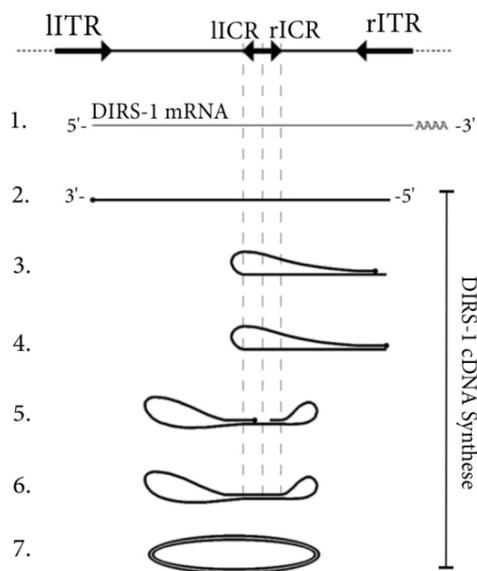
Die linke ITR besitzt Promotoraktivität und leitet die Transkription der 4,5 kb langen DIRS-1 mRNA ein (Cohen et al. 1984). Bei der rechten ITR handelt es sich ebenfalls um einen aktiven Promotor, der die Synthese längerer *antisense* Transkripte initiiert (Wiegand et al. 2014). Nach

Hitzeschock oder in der Entwicklung wird zudem eine kürzere *antisense* RNA gebildet, die als E1 Transkript bezeichnet wird (Cohen et al. 1984).

In Abb. 14 ist schematisch der postulierte DIRS-1 Amplifikationsmechanismus gezeigt. Nach der Transkription eines DIRS-1 Elementes fehlt der überwiegende Teil der linken ITR (lITR), während die rechte ITR (rITR) fast vollständig in der mRNA enthalten ist (Cohen et al. 1984). Modelle zur DIRS-1 Amplifikation postulieren, dass das ICR-Segment und Teile der rechten ITR als Vorlage genutzt werden, um ein vollständiges cDNA Intermediat mit flankierenden ITRs zu synthetisieren. Man geht davon aus, dass es anschließend ligiert wird, sodass ein zirkuläres DNA-Molekül entsteht. Nach der Synthese des Doppelstranges könnte die DIRS-1 Kopie durch die kodierte Rekombinase in das Genom integriert werden (Cappello et al. 1985, Poulter et al. 2005).

Es ist bekannt, dass das Retrotransposon bevorzugt in bestehende DIRS-1 Kopien integriert und eine Erkennungssequenz von drei Nukleotiden dafür ausreichend ist (Cappello et al. 1984, Poulter et al. 2015). Allerdings ist die RNAi-Maschinerie in *D. discoideum* an der Stilllegung von DIRS-1 beteiligt und verhindert die unkontrollierte Amplifikation von des Transposons (Boesler 2012, Wiegand et al. 2014).

Abb. 14: Der DIRS-1 Amplifikationsmechanismus



Die *sense* Transkripte vollständiger DIRS-1 Elemente dienen als *Template* für die cDNA-Synthese. Die Transkripte enthalten eine fast vollständige rechte ITR, aber nur einen geringen Teil der lITR (1). Die cDNA-Synthese wird vermutlich innerhalb der rITR initiiert, sodass eine einzelsträngige cDNA entsteht, die weitestgehend komplementär zum *Template* ist (2). Die rITR kann wiederum als Vorlage genutzt werden, um fehlende Teile der lITR zu synthetisieren (3, 4). Die ICR dient dazu, die äußeren Sequenzbereiche beider ITRs zu rekonstituieren (5). Man geht davon aus, dass die vollständige einzelsträngige cDNA ligiert (6) und daraufhin der noch fehlende DNA-Strang synthetisiert wird (7). Als zirkuläre und doppelsträngige DNA kann die DIRS-1 Kopie schließlich ins Genom integriert werden (Cappello et al. 1984, Poulter et al. 2005).

1.8 Zielsetzung

Die RNA vermittelte Regulation von Genen ist ein konservierter Mechanismus in Eukaryoten, durch den eine Vielzahl zellulärer Prozesse gesteuert werden. Im Zentrum stehen kleine regulatorische RNA-Moleküle: sie vermitteln die Abwehr von Viren, die Stilllegung von Transposons und sind darüber hinaus an Entwicklungs- oder Stoffwechselprozessen in Tieren und Pflanzen beteiligt. Ihre Biogenese und ihre Wirkmechanismen sind in den letzten Jahren insbesondere in höheren Eukaryoten intensiv erforscht worden.

Dictyostelium discoideum gehört zur Gruppe der Amoebozoa und weist eine interessante phylogenetische Stellung auf, da der Organismus kurz nach den Pflanzen (Archaeplastida) aber noch vor der Trennung von Tieren und Pilzen (Opisthokonta) divergierte. Die Erforschung RNA-vermittelter Signalwege in der Amöbe ist daher auch aus evolutionärer Sicht interessant. Doch obwohl *D. discoideum* eine vollständige RNAi-Maschinerie mit Proteinen der Argonauten, der Dicer und der RdRP Familie kodiert und sowohl miRNAs als auch siRNAs identifiziert werden konnten, sind die entsprechenden Signalwege bisher nicht im Detail untersucht. Zentrales Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Biogenese kleiner RNAs und ihre Funktion in der Amöbe näher zu analysieren.

Was den miRNA Signalweg betrifft, war lediglich bekannt, dass die Prozessierung der zwei bis dato identifizierten miRNAs von DrnB, einem Enzym der Dicer Familie, abhängig ist. Ob für ihre Akkumulierung auch Proteine mit Domänen zur Bindung von dsRNA benötigt werden, so wie es in Tieren und Pflanzen der Fall ist, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Ein zentraler Ansatz ist daher die Identifikation von Genen, die Proteine mit einer oder mehrerer dsRBDs kodieren. Vielversprechende Kandidaten sollen deletiert und die *Knockout*-Stämme auf die Fähigkeit zur miRNA Prozessierung hin untersucht werden. Wenn auch in *D. discoideum* ein dsRNA bindendes Protein zur Akkumulierung von miRNA beiträgt, sollen funktionelle Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* durchgeführt werden.

In Pflanzen und Tieren bestehen hinsichtlich der beteiligten Proteine und der zellulären Kompartimente signifikante Unterschiede in der miRNA-Prozessierung. Aufgrund der besonderen phylogenetischen Position von *D. discoideum* soll deshalb geklärt werden, inwieweit Parallelen zu Tieren oder Pflanzen bestehen. Aufschluss darüber soll unter anderem die subzelluläre Lokalisation der an der miRNA-Prozessierung beteiligten Proteine geben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll. Ferner gilt es zu überprüfen, ob die miRNA vermittelte Genregulation in *D. discoideum* überhaupt ein verbreiteter Mechanismus ist. Deshalb

werden Methoden der Hochdurchsatzsequenzierung genutzt, um weitere putative miRNAs zu identifizieren.

Die siRNA vermittelte Genregulation scheint in *D. discoideum* eine bewährte Strategie zu sein, um Retrotransposons stillzulegen. So stammt der überwiegende Anteil an endogenen siRNAs von DIRS-1 ab. Dabei handelt es sich um das am häufigsten vorkommende transposable Element in der Amöbe, das außerdem die Centromere konstituiert und somit wichtige strukturelle Funktionen erfüllt. Die Kontrolle der DIRS-1 Mobilität durch die RNAi-Maschinerie ist möglicherweise entscheidend, um die Genomstabilität aufrecht zu erhalten.

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass der Verlust AgnA abhängiger siRNAs mit einer Deregulation des Retrotransposons einhergeht. Im agnA- Stamm akkumulierten DIRS-1 Transkripte und extrachromosomale DNA-Intermediate, die vermutlich eine Zwischenstufe zur Transposition darstellen, waren nachweisbar.

Die hohe Zahl an siRNAs scheint für die Stilllegung von DIRS-1 von essentieller Bedeutung zu sein. Um Einblicke in den zugrunde liegenden Mechanismus ihrer Prozessierung und die Funktion von AgnA zu erhalten, sollen kleine RNAs aus dem AX2 Wildtyp und dem agnA- Stamm sequenziert und ihre Verteilung entlang des DIRS-1 Elementes analysiert werden. Weiterhin werden verschiedene Reporterkonstrukte zum Einsatz kommen, um die initiale Produktion von DIRS-1 siRNAs und eine RdRP-abhängige Signalamplifikation zu untersuchen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Analyse der DIRS-1 Amplifikation, die insbesondere im agnA- Hintergrund als Folge der fehlenden siRNAs und der eingeschränkten Kontrolle durch die RNAi-Maschinerie untersucht werden soll. Im Gegensatz zu anderen Elementen aus der Gruppe der LTR-Retrotransposons weist DIRS-1 einige strukturelle Besonderheiten auf und ist bisher noch nicht intensiv erforscht. Um zu klären, inwieweit DIRS-1 kodierte Proteine im agnA- Stamm akkumulieren und die Amplifikation des Transposons begünstigen, sollen die einzelnen ORFs an einen GFP-Tag fusioniert und ektopisch in der Mutante und im AX2 Wildtyp exprimiert werden. Die subzelluläre Lokalisation der DIRS-1 kodierten Proteine ist ein Aspekt, der zur Aufklärung des zugrundeliegenden Amplifikationsmechanismus beitragen kann. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollen dabei zeigen, ob DIRS-1 GAG in der Lage ist Virus-ähnlich Partikel zu konstituieren, die LTR-Retrotransposons typischerweise als Orte der cDNA Synthese nutzen und die ggf. weiter charakterisiert werden sollen. In diesem Zusammenhang gilt es ebenfalls zu klären, ob die extrachromosomale DIRS-1 DNA alle wesentlichen Elemente eines vollständigen DIRS-1 Elementes enthält und ob sie tatsächlich im Cytoplasma, möglicherweise in Assoziation mit Virus-ähnlichen Partikeln, synthetisiert wird.

2 Material

2.1 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Blottingapparaturen	
- Fastblot B449 (Northern Blot f. kl. RNA)	Biometra, Göttingen
- Mini Trans-Blot® Cell-System (Tank Blot)	Biorad, München
Brutschrank <i>E. coli</i> (Lab Shaker)	Adolf Kühner, Schweiz
Drehrad	Schütt Labortechnik, Göttingen
Elektrophoresekammern	
- für Agarosegele	Metallwerkstatt, Uni Kassel
- PerfectBlue Gelsystem Mini M, für Agarosegele	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
- für PAA-Gele	Metallwerkstatt, Uni Kassel
- für Proteingele, Mini-PROTEAN Tetra Cell	Biorad, München
Elektroporator (Gene Pulser®)	Biorad, München
Feinwaage	
- BP 210 S	Sartorius, Göttingen
- MXSX-612	Denver Instruments, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRB)	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 5500)	Leica, Wetzlar
French Pressure Cell	Glen Mills, Clifton (NJ), USA
Geigerzähler (Mini-Monitor)	Mini-Instruments, GB
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Heizblock, Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen, Compact Line OV4	Biometra, Göttingen
Kulturschüttler, Heidolph Rotmax 120	Schütt Labortechnik, Göttingen
Magnetrührer, Heidolph MR3000	Bachofer, Reutlingen
Mikroliter-Pipetten (10 µl, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Gilson, Langenfeld
Mikrowelle (Lunik 250)	Aldi, Essen
PCR-Maschinen	
- Mastercycler® ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
- Mastercycler® ep realplex S	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, S20 SevenEasy™ pH	Mettler Toledo, Greifensee
Phosphor-Imager (FLA-7000)	Fujifilm, Düsseldorf
Photometer	
- Spekol 1300	Analytik Jena, Jena
- NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Pipettierhelfer (pipetboy accu)	Integra Biosciences, Schweiz
Spannungsgeräte	
- EPS 3500, EPS 3500, EPS 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
- Power Pack P25 T	Biometra, Göttingen
Sterilbank (<i>D. discoideum</i>)	Nunc, Wiesbaden
Sterilbank (<i>E. coli</i>)	Galaire, Italien
UV-Tisch	Bachofer, Reutlingen
UV Crosslinker, FL-20-M Fluo-Link, 312 nm	Bachofer, Reutlingen
Vortex	Bender & Hohbein, Schweiz
Waage (PC440)	Mettler, Gießen
Wasserbad (Multitemp III)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Zellhomogenisierer (8,006 mm Kugel)	EMBL, Heidelberg
Zellzähler, Z2 CoulterR Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifugen	
- Avanti® 30	Beckman Coulter, Krefeld
- Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
- Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
- MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
- Airfuge® Air-Driven (A-100/18 Rotor, Fixed Angle)	Beckman Coulter, Krefeld
- Rotanta R	Hettich, Tuttlingen
- Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Amylose Resin	New England Biolabs, Frankfurt
Bechergläser	Schott, Mainz
Cryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläschen (50 x 50 mm)	Schütt Labortechnik, Göttingen
Drigalskispatel	Glaswerkstatt, Uni Kassel
Einmalhandschuhe (XCEED-Nitril)	Microflex, Niederlande
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalskalpell	Bayha, Tuttlingen
Einwegspritzen (Ominfix 1 mL)	B. Braun, Melsungen
Einwegspritzen (Ominfix 10 mL)	B. Braun, Melsungen
Einwegtücher	Kimberly-Clark, Forchheim
Erlenmeyerkolben	Carl Roth, Karlsruhe
EP-Küvetten (Gene Pulser® 0,4 cm)	Biorad, München
Filterpapiere (3 mm Chr)	Whatman, Dassel

GFP-Trap®	Chromotek, Planegg-Martinsried
Glasflaschen	Schott, Mainz
Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt
Glaswolle	Roth, Karlsruhe
Hybridisierungsröhren	Biometra, Göttingen
Impföse	Th. Geyer, Renningen
Kanüle (STERICAN)	B. Braun, Melsungen
Nitrocellulose-Filter (47 mm)	Sartorius, Göttingen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Schütt Labortechnik, Göttingen
PCR-Platten, Frame Star® 96 Well	4titude, Berlin
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (92 mm x 16 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Papier	Car Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml/2 ml, 15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Transfermembranen	
Nitrocellulosemembran (porablot™ NCP)	Macherey-Nagel, Düren
Nylonmembran (Hybond™-NX)	GE Healthcare, GB
- Zellkulturplatte (TC-Platte 24 Well, Standard)	Sarstedt, Nümbrecht
- Zahnstocher	Rossmann, Hannover
Zentrifugenröhrchen (175 µL, 5 x 20 mm)	Beckman Coulter, Krefeld
Bechergläser	Schott, Mainz
Cryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/40 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar (Medium für Bakterien)	MP Biomedicals, Frankreich
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aluminiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Pepton	Merck, Darmstadt
Bacto-Trypton	BD, Frankreich
Benzamidin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA), 10 mg/mL	ThermoFisher Scientific, USA
Bovines Serumalbumin (BSA), Festsubstanz	Carl Roth, Karlsruhe

5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat-Toluidiniumsalz (BCIP-T)	ThermoFisher Scientific, USA
Bromphenolblau	Fluka, Steinheim
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
cOmplete Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tabletten)	Roche, Mannheim
Coomassie Brillant Blue G250	Carl Roth, Karlsruhe
DABCO	Carl Roth, Karlsruhe
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethyl 3,3dithiobispropionimidate • 2 HCl (DTBP)	ThermoFisher Scientific, USA
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (>99,8 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
Gelvatol TypII	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin (86 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidinthiocyanat (GTC)	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff (Urea)	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
HL5-Medium	Formedium, Hunstanton, UK
IPTG	ThermoFisher Scientific, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isoton II	Coulter Electronics, Krefeld
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Lo-Flo Medium, pH 6.5	Formedium, Hunstanton, UK
Magermilchpulver	Reformhaus, Kassel
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Maltose (D(+)-Maltose Monohydrat)	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methylimidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim

3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Nonident® P40	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Sepharose (Sephadex® G50)	GE Healthcare, GB
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Carl Roth, Karlsruhe
TRIzol® Reagent	Invitrogen, GB
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Fluka, Steinheim

2.4 Puffer und Lösungen

Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
BCIP-Lösung	50 mg/mL BCIP-T in DMF
Blockierlösung	5 % w/v Magermilchpulver in 1 x PBS
Church-Puffer	0,5 M NaPO ₄ pH 7,2 7 % (w/v) SDS 1 mM EDTA 1 % (w/v) BSA
Co-IP Lysepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,5% NP40 25 mM MgCl ₂

Co-IP Waschpuffer	10 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 25 mM MgCl ₂
Coomassie-Lösung (kolloidal)	0,02 % (w/v) Coomassie BrillantBlue G-250 5 % (w/v) Aluminiumsulfat 2 % ortho-Phosphorsäure 10 % Ethanol
<i>Crosslinking</i> -Lösung	127 mM Methylimidazol 160 mM EDC pH 8,0 (mit HCl (15 %))
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
DEPC-H ₂ O	0,1-0,2 % (v/v) DEPC ad 1 L ddH ₂ O 2 x autoklavieren
Dialysepuffer I	20 mM Tris-HCl pH 7.4 150 mM NaCl 0,1 mM EDTA 20 % Glycerin 1 mM DTT
Dialysepuffer II	20 mM Tris-HCl pH7.4 100 mM NaCl 0,1 mM EDTA 50 % Glycerin 1 mM DTT
6 x DNA Auftragspuffer (pH 7,6)	10 mM Tris-HCl pH 7,6 0.03 % Bromphenolblau 0.03 % Xylencyanol FF 60 % Glycerin 60 mM EDTA
Elektroporation (EP)-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM Saccharose, steril filtrieren
Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/mL Ethidiumbromid in ddH ₂ O
1,5 x Homogenisierungspuffer	30 mM Tris/HCl pH 7.4 2 mM DTT 2 mM EDTA 5 mM Benzamidin 30 % (w/v) Saccharose

2 x Lämmli-puffer (pH 6,8)	65,8 mM Tris HCl pH 6,8 20 % Glycerin 2,1 % SDS 5 % 2-Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau
10 x Lämmli-puffer (pH 6,8)	200 mM Tris-HCl pH 6,8 33 % Glycerin 6,7 % SDS 16,7 % β -Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
MBP-Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7.4 200 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 mM DTT 10 mM Maltose 10 % Glycerin
MBP-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 mM DTT 5 % Glycerin
10 x MOPS-Puffer (pH 7,0) für Agarosegele	0,4 M MOPS pH 7,0 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA
10 x MOPS-Puffer (pH 7,0) für PAA-Gele	20 mM MOPS pH 7,0
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-Cl, pH 7,0 1,5 M NaCl
NP40-Lösung (20 %)	20 % (w/v) Nonident® P40 in ddH ₂ O
5 x Proteingel-Laufpuffer	125 mM Tris 959 mM Glycin 5 % (w/v) SDS
10 x PBS (pH 7,6)	80,6 g NaCl/HCl pH 7,3 7,65 g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 2,01 g KCl 1,91 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L H ₂ O
PBS-T (pH 7,6)	1 x PBS, pH 7,6 0,05 % Tween® 20

3 x RNA-Auftragspuffer	950 µL Formamid 50 µL 0,5 M EDTA 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol FF optional: 1 % Ethidiumbromid-Lösung
1 x <i>Semidry</i> Transfer-Puffer	50 mM Tris 40 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % (v/v) Ethanol
Sephadex G-50 Lösung	5 g Sephadex G50 in 100 mL 1 x TE Puffer
Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)	2 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
5 x TBE-Puffer	445 mM Tris 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
1 x TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA
<i>Stripping</i> -Lösung	0,1 x SSC 1 % SDS
Tris-HCl Puffer (pH 6,8)	1 M Tris-HCl pH 6,8
Tris-HCl Puffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Wasch-Lösung 1 (Northern/Southern Blot)	2 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Wasch-Lösung 2 (Northern/Southern Blot)	1 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Wasch-Lösung 3 (Northern/Southern Blot)	0,5 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Zellysepuffer (pH 7,5)	50 mM HEPES pH 7,5 40 mM MgCl ₂ 20 mM KCl 5 % (w/v) Saccharose

2.5 Kits

CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
NucleoSpin® gDNA Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® miRNA	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega, Mannheim
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
pKOSG-IBA-Dicty1	IBA, Göttingen
StarGate® Transfer Reagent Set	IBA, Göttingen
SensiFast™ SYBR® No-ROX One-Step Kit	Bioline, Luckenwalde

2.6 Enzyme und Enzympuffer

Enzyme

DNaseI, RNase-free 1 u/μL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Exonuklease I (20 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Exonuklease III (200 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
FastAP™, Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Micrococcal Nuclease (300 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
NgoMIV (10 u/μL)	New England Biolabs, Frankfurt
Polynukleotid-Kinase (10 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
ProteinaseK (25 mg/mL)	Carl Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme (konventionell) (10 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
RiboLock Ribonuklease Inhibitor (40 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
RNaseA (20 mg/mL)	Merck Biosciences, Bad Soden
S1 Nuklease (100 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Taq DNA Polymerase (rekombinant)	Universität Kassel, Kassel
Terminator™ 5'-P-Dependent Exonuclease (1 u/μL)	Epicentre, Madison, WI (USA)
Tetro Reverse Transkriptase (200 u/μL)	Bioline, Luckenwalde
T4-DNA-Ligase (5 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 u/μL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Enzympuffer

CutSmart® Puffer, 10 x	New England Biolabs, Frankfurt
DNaseI, 10 x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Exonuclease I, 10 x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Exonuklease III, 10 x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
FastAP™, 10 x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Micrococcal Nuclease Puffer pH 7.9, 1 x Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,9, 5 mM CaCl ₂)	
Polynukleotid-Kinase Puffer, 10 x Reaktionspuffer A	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
10 x Reaktionspuffer, konventionelle Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
S1 Nuklease, 5 x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Taq DNA Polymerase, 10 x Reaktionspuffer (+MgCl ₂ , + (NH ₄) ₂ SO ₄)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Terminator™, 10 x Reaktionspuffer A	Epicentre, Madison, WI (USA)
Terminator™, 10 x Reaktionspuffer B	Epicentre, Madison, WI (USA)
Tetro Reverse Transkriptase, 5 x Reaktionspuffer	Bioline, Luckenwalde
T4-DNA-Ligase, 10 x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Phusion, 5 x HF Puffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

2.7 Nukleotide

Desoxyribonukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP [γ- ³² P] ATP (185 TBq/mmol)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich Hartmann Analytic, Braunschweig
---	---

2.8 Größenstandards

DNA Marker

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

RNA Marker

microRNA Marker	New England Biolabs, Frankfurt
-----------------	--------------------------------

Protein Marker

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
---	------------------------------------

2.9 Antikörper

Monoklonale Primär-Antikörper

Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Antikörper wurden von der Abt. Zellbiologie (Universität Kassel) in Form von Hybridoma-Kulturüberständen zur Verfügung gestellt.

Tab. 1: Liste der nicht-kommerziellen Primär-Antikörper

Name	Hybridom Zelllinie	Referenz
Maus α alpha-Actinin 1 (AbpA)	47-19-2	(Wallraff et al. 1986)
Maus α CoroninA (CorA)	176-3 D 6	(Maniak et al. 1995)
Maus α GFP	264-449-2	(Wienke et al. 2006)
Maus α His-Tag	232-470-5	(Faix et al. 1996)
Maus α Porin (PorA)	70-100-1	(Troll et al. 1992)
Maus α SeverinA (SevA)	42-65-11	(Schleicher et al. 1984)

Außerdem wurde ein kommerziell erworbener Antikörper verwendet:

Maus α HA	Katalog-Nr. sc7392	Santa Cruz, Biotech., USA
------------------	--------------------	---------------------------

Sekundäre Antikörper

Ziege α Maus	AP konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege α Maus	HRP konjugiert	Dianova, Hamburg

2.10 Antibiotika

Amphotericin (0,25 mg/mL)	PAA, Cölbe
Ampicillin (50 mg/mL)	Carl Roth, Karlsruhe
Blasticidin (5 mg/mL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Genitacin G418 (100 mg/mL)	PAA, Cölbe
Kanamycin-Lösung (10 mg/mL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin (10000 u/mL)/Streptomycin (10 mg/mL)	PAA, Cölbe
Chloramphenicol (34 mg/mL)	Böhringer, Mannheim

2.11 Nährmedien

Medien für *E. coli*

LB-Medium pH 7,0 (Bertani 1951)	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L dH ₂ O
---------------------------------	---

LB _{Amp} -Medium	LB-Medium + 50 µg/mL Ampicillin
LB _{Amp, Cam} -Medium (+ Glucose)	LB-Medium + 0,2 % Glucose + 50 µg/mL Ampicillin + 35 µg/mL Chloramphenicol
LB _{Cam, Kan} -Medium	LB-Medium + 35 µg/mL Chloramphenicol + 10 µg/mL Kanamycin
LB-Agar	LB-Medium + 13 g/L Agar-Agar
LB _{Amp} -Agar	LB-Agar + 50 µg/mL Ampicillin
Medien für <i>D. discoideum</i>	
BS10 Medium	HL5 ⁺ -Medium + 10 µg/mL Blastidicin (G418)
BS10/G10 Medium	HL5 ⁺ -Medium + 10 µg/mL Blastidicin (G418) + 10 µg/mL Genitidin (G418)
G10-Medium	HL5 ⁺ -Medium + 10 µg/mL Genitidin (G418)
HL5-Medium pH 6,7 (Watts et al. 1970) (bezogen über Formedium)	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 ddH ₂ O
HL5 ⁺ -Medium	HL5-Medium + 50 µg/mL Ampicillin + 0,25 µg/mL Amphotericin + 100 u/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin
Low Fluorescence Axenic Medium (Lo-Flo) (bezogen über Formedium)	11 g Glucose 0,68 g KH ₂ PO ₄ 5 g Casein Pepton 26,8 g NH ₄ Cl 37,1 g MgCl ₂ 1,1 g CaCl ₂ 8,11 g FeCl ₃

	4,84 g Na ₂ -EDTA
	2,30 g ZnSO ₄
	1,11 g H ₃ BO ₃
	0,51 g MnCl ₂ *4 H ₂ O
	0,17 g CoCl ₂
	0,15 g CuSO ₅ *5 H ₂ O
	0,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4 H ₂ O
	ad 1 L ddH ₂ O
Phosphatagar	Soerensen-Phosphatpuffer pH6,7 + 13 g/L Agar-Agar
SM-Agar pH 6.5 (Singleton et al. 1987)	10 g Bacto-Pepton 10 g Glucose 1 g Hefeextrakt 1 g MgSO ₄ 2,2 g KH ₂ PO ₄ 1,3 g K ₂ PO ₄ *3 H ₂ O ad 1 L ddH ₂ O

2.12 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> -Dh5α TM	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> One Shot® TOP10	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> Rosetta2 pLysS	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> D1d (DM1)	Invitrogen, Darmstadt
<i>Klebsiella aerogenes</i>	DictyStock Center, Northwestern Universität Chicago, IL, USA

2.13 *Dictyostelium discoideum* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit erstellte Stämme

In der folgenden Tabelle sind alle Stämme aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit generiert worden sind. In der Regel existieren von jedem Stamm biologische Replikate aus unabhängigen Transformationen, die nicht einzeln aufgelistet sind.

Tab. 2: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit generierten Stämme

Stamm	Ausgangsstamm	Transformierter Vektor	Medium
rbdA-	AX2	pKOSG <i>rbdA</i>	BS10
rbdB-	AX2	pKOSG <i>rbdB</i>	BS10
rbdB- rox	rbdB-	pDEX RH NLS-Cre	HL5 ⁺
AX2 pDneo2a RbdB GFP	AX2	pDneo2a RbdB GFP	G10
rbdB- pDneo2a RbdB GFP	rbdB- [K1, K2]	pDneo2a RbdB GFP	G10

rbdB- pDbsr2a RbdB GFP	rbdB- [K1, K2]	pDbsr2a RbdB GFP	BS10
rbdB- pDneo2a RbdB GFP	rbdB- [K1, K2]	pDneo2a RbdB GFP	G10
rbdB- pDbsr2a RbdB GFP	rbdB- [K1, K2]	pDbsr2a RbdB GFP	BS10
AX2 pDM323 RbdB GFP	AX2	pDM323 RbdB GFP	G10
rbdB- pDM323 RbdB GFP	rbdB- [K1, K2]	pDM323 RbdB GFP	G10
AX2 Serrate GFP	AX2	pDM323 SE	G10
AX2 GFP Serrate	AX2	pDM317 SE	G10
AX2 Serrate [RNAi]	AX2	pDM304 IITR <i>se frag.</i> rITR	G10
rbdB- RbdB K59A/K60A GFP	rbdB- [K1, K2]	pDM323 RbdB K59A/K60A	G10
rbdB- RbdB Y27A GFP	rbdB- [K1, K2]	pDM323 RbdB K27A	G10
rbdB- RbdB H36A GFP	rbdB- [K1, K2]	pDM323 RbdB H36A	G10
AX2 GFP NLS-NoLS [RbdB]	AX2	pDM317 NLS-NoLS [RbdB]	G10
AX2 GFP NLS [RbdB]	AX2	pDM317 NLS [RbdB]	G10
AX2 DIRS-1 ORF1 [GAG]GFP	AX2	pDM323 DIRS-1 ORF1	G10
AX2 GFP DIRS-1 ORF1 [GAG]	AX2	pDM317 DIRS-1 ORF1	G10
AX2 DIRS-1 ORF2 [YR] GFP	AX2	pDM323 DIRS-1 ORF2	G10
AX2 GFP DIRS-1 ORF2 [YR]	AX2	pDM317 DIRS-1 ORF2	G10
AX2 DIRS-1 ORF3 [RT MT RH] GFP	AX2	pDM323 DIRS-1 ORF3	G10
AX2 GFP DIRS-1 ORF3 [RT MT RH]	AX2	pDM317 DIRS-1 ORF3	G10
agnA- DIRS1 ORF1 [GAG]GFP	agnA- [17]	pDM323 DIRS-1 ORF1	BS10/G10
agnA- GFP DIRS-1 ORF1 [GAG]	agnA- [17]	pDM317 DIRS-1 ORF1	BS10/G10
agnA- DIRS-1 ORF2 [YR] GFP	agnA- [17]	pDM323 DIRS-1 ORF2	BS10/G10
agnA- GFP DIRS-1 ORF2 [YR]	agnA- [17]	pDM317 DIRS-1 ORF2	BS10/G10
agnA- DIRS-1 ORF3 [RT MT RH] GFP	agnA- [17]	pDM323 DIRS-1 ORF3	BS10/G10
agnA- GFP DIRS-1 ORF3 [RT MT RH]	agnA- [17]	pDM317 DIRS-1 ORF3	BS10/G10
AX2 AgnA-3xHA	AX2	pDM304 AgnA 3xHA	G10
AX2 3xHA AgnA	AX2	pDM304 3xHA AgnA	G10
AX2 DIRS-1 IITR GFP	AX2	pDM304 IITR GFP	G10
agnA- DIRS-1 IITR GFP	agnA- [17, 11]	pDM304 IITR GFP	BS10/G10
AX2 DIRS-1 rITR GFP	AX2	pDM304 rITR rc GFP	G10
agnA- DIRS-rIITR GFP	agnA- [17, 11]	pDM304 rITR rc GFP	BS10/G10
AX2 IITR GFP rITR	AX2	pDM304 IITR GFP rITR	G10
agnA- IITR GFP rITR	agnA- [17, 11]	pDM304 IITR GFP rITR	BS10/G10
agnA- GFP	agnA- [17]	pDM317	BS10/G10
agnA- DIRS-1 GAG GFP:GAG 3xHA	agnA- [17]	pDM323 DIRS-1 ORF1 GFP : ORF1 3xHA	BS10/G10

Stämme aus anderen Arbeiten/Publikationen

AX2 wt

(Watts et al. 1970)

agnA-

(Boesler et al. 2014)

drnB-

(Hinas et al. 2007)

2.14 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Darmstadt) bezogen. In der nachfolgenden Tabelle sind alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten Oligonukleotide aufgelistet.

Tab. 3: Oligonukleotide dieser Arbeit

Name	Stock	Sequenz	Verwendung
BB100	#2876	AGCGCGTCTCCAATGCTGCAGCCAAATCAGATAATCCTGGC	linker Arm für pKOSG <i>rbdA</i> ko
BB101	#2877	AGCGCGTCTCCGTTGGCGGTGCTGGTGGAGCCA	Plasmid
BB102	#2878	AGCGCGTCTCCCTTCGACAAAGAAACAAGCCCAAGCTGC	rechter Arm für pKOSG <i>rbdA</i>
BB103	#2879	AGCGCGTCTCCTCCCCTGCAGGATTCTTCAAGTTTAAATTTGAAGTTG	ko Plasmid
BB104	#2880	AGCGCGTCTCCAATGCTGCAGGAGATAATCGAGATGATTGGTAACTC	linker Arm für pKOSG <i>rbdB</i> ko
BB105	#2881	AGCGCGTCTCCGTTGGTAAACTTGAAATCTTTGAAAATTGG	Plasmid
BB106	#2882	AGCGCGTCTCCCTTCGCTATAGTAGTAGTAAATGGAAAAC	rechter Arm für pKOSG <i>rbdB</i> ko
BB107	#2883	AGCGCGTCTCCTCCCCTGCAGCGTTGTTCGAGATGGATAAGTTG	Plasmid
BB116	#2892	CATCTTTTATTGCTGGAGTATACC	Nachweis von <i>rbdA</i> ko
BB117	#2893	CAATGTCTCCATTCTCTTTGTTAATTC	Mutanten
BB118	#2894	ATTATTTGAATCCACCCCAAACCC	Nachweis von <i>rbdB</i> ko
BB119	#2895	GTTTTTGTAATTGTTGTGTATGTCCAG	Mutanten
DM033	#3218	CTGCAGAAATGTCAAATAAATCTCATACATCAGAAAAGG	Amplifikation des <i>rbdB</i> Gens,
DM034	#3219	CTGCAGCTTTTTTTGAAATTAATTTTGTATTGG	PstI flankiert
DM066	#3251	TGATCAAAAATGTCAAATAAATCTCATACATCAG	Amplifikation des <i>rbdB</i> Gens,
DM053	#3238	ACTAGTTTTTTTTGAAATTAATTTTGTATTGG	BclI/SpeI flankiert
DM086	#3265	GGATCCAAAATGTCTACCACTGTTAATAATAATGATG	Amplifikation von DIRS-1
DM087	#3266	ACTAGTCTTCTTGTCTTCTGAAAACGG	ORF1, BamHI/SpeI flankiert
DM098	#3277	GGATCCAAAATGGCCGATCTAACAACCTT	Amplifikation von DIRS-1
DM099	#3278	ACTAGTTGAAATTTGGACGACAGTATTTAAG	ORF2, BamHI/SpeI flankiert
DM100	#3279	GGATCCAAAATGCTAAACCCGATTCCGATTTTC	Amplifikation von DIRS-1
DM101	#3280	ACTAGTCATGAGATTGGAAAGTTGAATAATC	ORF3, BamHI/SpeI flankiert
DM132	#3311	CTCGAGTTTATATTATCATATATATATATATTATG	Amplifikation von DIRS-1 IITR,
DM133	#3312	GATCTGAATTCCCAATAAAAAATGGTTTTAG	XhoI/BglII flankiert
DM021	#3485	GGATCCAAAATGGGTAAAGGAGAAGAACCTTTCCTACTGG	Amplifikation von GFP S65T,
DM022	#3486	AGATCTTTACTTGTATAGTTTATCCATGCCATGTG	BamHI/BglII flankiert
DM144	#3324	CTCGAGTTAAAAATTTAATTTATTAATTAATTAATTTTA	Amplifikation von DIRS-1 rITR
DM145	#3325	AGATCTGAATTCATAAATCAAATTTGTTTTAG	rc, BamHI/BglII flankiert
DM134	#3313	CTAGTGAATTCATAAATCAAATTTGTTTTAG	Amplifikation von DIRS-1 rITR,
DM135	#3314	AAGCTTTTAAAAATTTAATTTATTAATTAATTAATTTTA	HindIII/SpeI flankiert
DM092	#3271	GGATCCAAAATGGGTCCTAAAAAACCAACATAC	Amplifikation des <i>agnA</i> Gens,
DM093	#3272	ACTAGTAAGGAAATATAATTTATCAGATAAATC	BamHI/SpeI flankiert
DM030	#3215	GGTACCTTCGTTAGTGATTGTTTTTG	Synthese der part. <i>rbdB</i> cDNA
DM027	#2754	GAATTCATGTCAAATAAATCTCATACATCAG	Amplifikation des <i>rbdB</i> Gens,
DM028	#2755	TCGACTTATTTTTTTGAAATTAATTTTGTATTGG	EcoRI/SalI flankiert
DM027	#2754	GAATTCATGTCAAATAAATCTCATACATCAG	Amplifikation der dsRBD von
DM158	#3338	GTCGACTTATGTTTCTATAAATCTAATATATTCTTTG	<i>rbdB</i> , EcoRI/SalI flankiert
DM159	#3339	GAATTCATGTCAAATAAATCTCATTATCTG	Amplifikation der dsRBD von
DM161	#3341	GTCGACTTACTTTACTAAAAATCTAAAAATCTC	<i>drnB</i> , EcoRI/SalI flankiert
DM196	#3378	GGATCCAAAATGGAACAAGAAGAAGCAGTTGATG	Amplifikation v. <i>serrate</i> , N-
DM197	#3379	GGTACCACATTTTCTAGTGGTTTCAC	term. Teil, BamHI/KpnI flank.
DM198	#3380	GGTACCATTCAATTAAGAAGAACACAG	Amplifikation v. <i>serrate</i> ,
DM199	#3381	ACTAGTTAAACTCTTTTATTTTGTATTTCTTTAAG	C-term. Teil, KpnI/SpeI flank.

DM115	#3294	GCAACCCATACCAATTGCTCATACTGAAAGCAAAGGATCCG	Mutagenese von rbdB, Y27A
DM116	#3295	CGGATCCTTTGCTTTCAGTATGAGCAATTGGTATGGGTTGC	
DM117	#3296	CATACTGAAAGCAAAGGATCCGAAGCTAATAAGATTTTAAG	Mutagenese von rbdB, H36A
DM118	#3297	CTTAAAAATCTTTATTAGCTTCGGATCCTTTGCTTTCAGTATG	
DM206	#3388	CTCGAGACTAGAGCTAGATAAAAAAAAT	Overlap-Extension PCR, Mutagenese von rbdB
DM207	#3389	AGATCTAATGGTATCTGTATTTTCATTTAAATC	
DM167	#3349	TAAATTAGATCTAAAATGTTGAAAAGAAAGTTGGAAGAATCTCCAACA	Amplifikation der NLS-NoLS [RbdB] Sequenz
DM172	#3354	ACTAGTAATAGGAGAGGGGCTTGTAGGTGG	
DM207	#3392	AGATCTAAAATGTTGAAAAGAAAGTTGGAAGAATCTCCAACATTGATG	Rekursive PCR zur Generierung der NLS2 (RbdB) Sequenz
DM208	#3393	ACTAGTCTCTTCTTTTCAAATGAAATCTTTGTAGTTGCTCATCAATG	
DM058	#3243	CACCAATGGTCAAAACAAAATGTTTTGCTG	RT-PCR zum Nachweis von pri- Ddi-miR-1176
DM059	#3244	GATCAGAGAAGAATCAAAAATTTGGGTG	
DM082	#3261	TGGAATGGTTACAATCTTATAAATAG	RT-PCR zum Nachweis von pri- Ddi-miR-1177
DM083	#3262	AGTAACCATAATGTAGTCATCAAATAA	
DM135	#3314	AAGCTTTTAAAAATTTAATTTATTAATTTATATTTTA	PCR auf DIRS-1
DM173	#3355	TATTTGGGAATTCCTCCTATATATATTTAAG	PCR auf DIRS-1
DM126	#3305	CTTTTCAAGAGTGCCATGCC	Nachweis GFP siRNAs
DM146	#3326	CTATAACTCACACAATGTATACATCATG	Nachweis von GFP siRNAs
DM147	#3327	CATGATGTATACATTGTGTGAGTTATAG	Nachweis von GFP siRNAs
DM122	#3301	AAATCCCTTCTCTAATTTTCATTT	α miRNA_can_D1*
DM123	#3302	CCAATGCTATGTCTGTCGAGAA	α miRNA_can_D2
DM217	#3306	TGATTTCCGGCACTAGTAGAGA	α ddi-miR-7097
DM218	#3307	TTCGTCTCTACTTCTGCCAAA	α ddi-miR-7097*
DM227	#3316	CCACATTAATTCAGCAGCCATA	α miRNA_can_D2
DM200	#3382	AGATCTTATAAACAGTTTTTAGATTATC	Amplifikation des <i>srtA</i> RNAi <i>triggers</i>
DM201	#3383	ACTAGTGTACCCAACCTAAACGATAAAAG	
DM108	#3287	CTGCAGACTGAGTATCAACTCCTAAAAACAATAGTATTG	qRT-PCR-Primer, <i>rbdB</i> mRNA
DM109	#3288	AGATCTCTGAGTATCAACTCCTAAAAACAATAGTATTGG	Amplifikation

In der folgenden Tabelle sind Oligonukleotide anderer Arbeiten oder Publikationen aufgelistet.

Tab. 4: Oligonukleotide anderer Arbeiten oder aus Publikationen

Name	Stock	Sequenz	Verwendung	Verweis
1176	#2601	GCTTCCTTGATAAAAAATTGG	miRNA Sonde	(Hinas et al. 2007)
1177	#2602	GAACCATTAACCCCTAACTGG	miRNA Sonde	(Hinas et al. 2007)
AG	#1828	AAATATCGTCATGTTTTGCAGCACAAC	qPCR Primer,	Abteilung Genetik, Kassel
AG	#1829	AATAATGGAAGTATGTGGTTTTACCTGAA	<i>corA</i> -Amplifik.	
SM058	#2642	GGCATGGCACTCTTGAAAAAG	Sonde GFP	(Müller 2011)
BB142	#2917	ACTGTTAATAATAATGATGCCTCTA	Sonde DIRS-1	(Boesler et al. 2014)
BB144	#2919	ACCTTTGCTTCTTATGTCAAGTATG	Sonde DIRS-1	(Boesler et al. 2014)
BB146	#2921	CTTACCAGTAGGTGGACGTTGTTC	Sonde DIRS-1	(Boesler, Meier et al. 2014)
BB148	#2923	GTTGGAAAACAATGCCGTTCCGGTT	Sonde DIRS-1	(Boesler, Meier et al. 2014)
BB150	#2952	CCCATTCTCAAGATGTCAAGTCAG	Sonde DIRS-1	(Boesler, Meier et al. 2014)
BB152	#2957	CAAGAGTTACAACCTGGCAACTGAAG	Sonde DIRS-1	(Boesler, Meier et al. 2014)
BB154	#2929	ATGGGAACCTTCAACTCTCAAAGTA	Sonde DIRS-1	(Boesler, Meier et al. 2014)
BB156	#2931	AAAGAAGTGGTGTGTTTCAATATT	Sonde DIRS-1	(Boesler, Meier et al. 2014)
AG	#896	ATCAAATGTTTTAGTTTTTA	Sonde DIRS-1	Abteilung Genetik, Kassel
BB141	#2916	TAGAGGCATCATTATTATTAACAGT	Sonde DIRS-1	(Boesler, Meier et al. 2014)
BB143	#2918	CATACTTGACATAAGAAGCAAAGGT	DIRS-1 PCR	(Boesler, Meier et al. 2014)

MD83	#1927	ATCAAATTGTTTTAGTTTTTA	DIRS-1 PCR	Abteilung Genetik, Kassel
SM005	#2657	CCGGGCCTTTCGCGTGACAGGCCGAAAATCC TCACCACTAGACCAACAAG	tRNA Asp Sonde	(Müller 2011)
BB010	#2866	AAAGGACCGATGTCATCATGTGCGTTCAAC	5.8 S rRNA Sonde	Abteilung Genetik, Kassel
AG	#1923	GCCAGAAATGCTTTGAAAATGACA	qPCR Primer,	Abteilung Genetik, Kassel
AG	#1924	GAGTGGTTTGCCAATTTCTTTCT	<i>cinD</i> -Amplifik.	
BB180	#2955	TCCAATTAATAACGCCAATGC	qPCR Primer,	Boesler, Meier et al. 2014
BB181	#2956	ATCACGGGAACCTCTTGGAA	<i>agnA</i> -Amplifik	
AG	#2956	ATGATGGTTGGAAGAGGGCT	Sonde <i>act6</i> mRNA	Abteilung Genetik, Kassel
AG	#2654	GGCCAACAATTTCTCAGCAAGAC	Sonde DdR6	Abteilung Genetik, Kassel
BB177	#2952	ATTAAGATTGGACTAGTTCTGA	miRNA_noncan_D4	(Boesler 2012)
AG	#2599	ACCTCGATTGGAGTCAATGGA	DIRS-1 siRNA Sonde	(Hinas et al., 2007)

2.15 Software

Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems, San José-CA, USA
CLC Sequence Viewer	CLC bio, Cambridge-MA, USA
CorelDRAW Home&Student 2014	Corel Corporation, Ottawa-Ontario, Kanada
Fujifilm MultiGauge V3.2.	Fujifilm, Düsseldorf
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego-CA, USA
IGB (Nicol et al. 2009)	Open Source Genome Browser
IGV (Thorvaldsdottir et al. 2013)	Broad Institute, Cambridge-MA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda-MD, USA
Vector NTI Advance™ 11	Invitrogen, Darmstadt
Pymol Graphics System	DeLano Scientific LLC

2.16 Sequenzen

Tab. 5: Übersicht über verwendete DNA-Sequenzen

Gen	Organismus	Datenbankeintrag*
<i>abpA</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0268632
<i>agnA</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0276299
<i>corA</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0267382
<i>cinD-1</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0273775
ddi-miR-1176	<i>D. discoideum</i>	MI0006244
ddi-miR-1176	<i>D. discoideum</i>	MI0006245
DIRS-1	<i>D. discoideum</i>	GB_M11339.1; clone SB41
<i>rbdA</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0275735
<i>rbdB</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0269426
<i>serrate</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0277375
<i>sevA</i>	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0289327
sno6 (DdR6)	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0295531
5.8 S rRNA-1	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0295645
tRNA-Asp-GUC-1	<i>D. discoideum</i>	DDB_G0294707

* Genbezeichnungen nach www.dictybase.org, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> oder <http://www.mirbase.org/>

Tab. 6: Übersicht über gezeigte Aminosäuresequenzen

Protein	Organismus	Datenbankeintrag*
DCL1	<i>A. thaliana</i>	AEE27221.1
DGCR8	<i>H. sapiens</i>	AAH78147.1
DrnA	<i>D. discoideum</i>	DDB0220441
DrnB	<i>D. discoideum</i>	DDB0231869
HYL1	<i>A. thaliana</i>	AEE28481.1
RbdA	<i>D. discoideum</i>	DDB0348826
RbdB	<i>D. discoideum</i>	DDB0307282

* Proteinbezeichnungen nach www.dictybase.org oder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.17 Plasmide

2.17.1 Plasmide anderer Arbeiten

Die hier aufgelisteten Plasmide sind im Rahmen anderer Arbeiten entstanden oder stammen von kommerziellen Herstellern.

pDbsr2a GFP	(Dubin et al. 2010)
pDM323 RbdB K59A/K60A trunc1 GFP	(Buttlar 2013)
pDEX RH NLS-Cre	(Faix et al. 2004)
pDM304 3xHA C-term	(C. Joppich, Universität Kassel, unveröffentlicht)
pDM304 3xHA N-term	(C. Joppich, Universität Kassel, unveröffentlicht)
pDM317	(Veltman et al. 2009)
pDM323	(Veltman et al. 2009)
pDM344 3xHA C-term	(Zenk 2014)
pDneo2a GFP	(Dubin 2010)
pGEM®-T Easy	(Promega, Mannheim)
pJET1.2/blunt Cloning Vector	(Thermo Fisher Scientific, Dreieich)
pKOSG IBA-Dicty1	(IBA, Göttingen)
pMal-c2X	(New England Biolabs, Frankfurt)

2.17.2 Plasmide dieser Arbeit

Die Plasmide, deren Klonierungsstrategie im Folgenden beschrieben wird, sind im Zuge dieser Arbeit entstanden. Durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte wurden in den Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* oder in den Zwischenvektor pGEM®-T Easy ligiert (vgl. 3.2.3) und anschließend sequenziert. Daraufhin wurden die DNA-Abschnitte mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und in den jeweiligen Endvektor kloniert. Diese notwendigen Zwischenschritte werden im Folgenden nicht immer ausführlich erläutert. Alle Endvektoren wurden schließlich durch mindestens zwei geeignete Verdauungen kontrolliert. Die Plasmidkarten sind in Anhang A1 gezeigt.

pKOSG *rbdA*

Der linke *Knockout*-Arm wurde mit den Primern BB100 und BB101 und der rechte *Knockout*-Arm mit den Primern BB102 und BB103 amplifiziert. Die Generierung des Endvektors erfolgte unter Verwendung der Kits pKOSG-IBA-Dicty1 und Stargate Transfer Reagent Set (IBA) nach Angaben des Herstellers.

pKOSG *rbdB*

Der *Knockout*-Vektor wurde analog zu dem Plasmid pKOSG *rbdA* unter Verwendung der genannten Kits kloniert. Für die Amplifikation des linken *Knockout*-Arms wurden die Primer BB104 und BB105 und zur Amplifikation des rechten *Knockout*-Arms die Primer BB106 (#2882) und BB107 verwendet.

pDneo2a RbdB GFP

Die kodierende Region des *rbdB* Gens wurde von genomischer DNA des Stammes AX2 mit Hilfe der Primer DM033 und DM034 amplifiziert und in den Klonierungsvektor pJET1.2/*blunt* ligiert. Mit Hilfe der durch die Primer angefügten PstI Schnittstellen wurde das Gen in den entsprechend linearisierten Vektor pDneo2a GFP (Dubin et al. 2010) eingebracht.

pDbsr2a RbdB GFP

Das Plasmid wurde analog zu dem Vektor pDneo2a RbdB GFP kloniert. Das von zwei PstI Erkennungssequenzen flankierte *rbdB*-Gen wurde aus dem Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* herausgeschnitten und in den mit PstI linearisierten Vektor pDbsr2a GFP (Dubin et al. 2010) kloniert.

pDM323 RbdB GFP

Die kodierende Region des *rbdB* Gens wurde von genomischer DNA aus dem Stamm AX2 mit den Primern DM066 und DM053 amplifiziert. Das PCR Produkt wurde anschließend in den Klonierungsvektor pJET1.2/*blunt* ligiert und über die Schnittstellen BclI und SpeI, die zuvor durch die Primer angefügt worden sind, herausgeschnitten. Daraufhin konnte das *Insert* in den mit BglII und SpeI geschnittenen Vektor pDM323 (Veltman et al. 2009) ligiert werden.

pDM323 DIRS-1 ORFs und pDM317 DIRS-1 ORFs Vektoren

Die kodierende Region der einzelnen DIRS-1 ORFs wurde ohne das Stopp-Kodon von genomischer DNA amplifiziert. Dazu wurden die Primer DM086/DM087 (ORF1), DM98/DM099 (ORF2) und DM100/DM101 (ORF3) verwendet. Gleichzeitig wurden jeweils eine BamHI und eine SpeI Schnittstelle angefügt, sodass die einzelnen ORFs aus dem pJET1.2/*blunt* Zwischenvektor in die mit BglII und SpeI linearisierten Vektoren pDM323 und pDM317 (Veltman et al. 2009) ligiert werden konnten.

pDM304 ITR GFP

Die linke ITR des Retrotransposons DIRS-1 wurde von genomischer DNA mit Hilfe der Primer DM132 und DM133 amplifiziert. Durch die angefügten Schnittstellen XhoI und BglII konnte die ITR in das Plasmid pDM304 (Veltman et al. 2009) ligiert werden, das zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Auf diese Weise wurde der vor der MCS gelegene *act15* Promotor gegen die linke DIRS-1 ITR ersetzt. Die GFP-Variante S65T wurde mit Hilfe der Primer DM021 und DM022 vom Plasmid pDM317 (Veltman et al. 2009) amplifiziert. Durch die Primer wurden N-terminal eine BamHI Schnittstelle und C-terminal ein Stopp-Kodon sowie eine BglII Schnittstelle angefügt. Im Anschluss daran wurde das PCR-Produkt in den Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* ligiert, der fortan als pJET1.2 BamHI GFP S65T BglII bezeichnet wurde. Das Gen für GFP wurde mit den angefügten Schnittstellen aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und in den mit BglII linearisierten Vektor pDM304, der bereits die ITR enthielt, ligiert.

pDM304 rITR rc GFP

Das Plasmid wurde analog wie für das Konstrukt pDM304 ITR GFP beschrieben, kloniert. Dazu wurde der *act15* Promotor des Vektors pDM304 gegen die DIRS-1 rechte ITR in revers komplementärer Orientierung ausgetauscht, bevor schließlich das Gen für GFP über die vorhandene BglII Schnittstelle in den Vektor ligiert wurde. Für die Amplifikation der rechten ITR wurden die Primer DM144 und DM145 verwendet.

pDM304 ITR GFP rITR

Für die Klonierung dieses Vektors wurde das Plasmid pDM304 ITR GFP mit den Restriktionsenzymen SpeI und HindIII geschnitten, wodurch der *act8* Terminator entfernt werden konnte. Daraufhin wurde die rechte ITR des Retrotransposons DIRS-1 von genomischer DNA mit den Primern DM134 und DM135 amplifiziert. Gleichzeitig wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme SpeI und HindIII angefügt, sodass das *Insert* anschließend in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert werden konnte.

pDM304 ITR MCS rITR (*Knockdown*-Vektor)

Als Ausgangspunkt für die Klonierung dieses Plasmides diente ein Derivat des Vektors pDM304, bei dem der *act15* Promotor bereits gegen die linke ITR des DIRS-1 Retrotransposons ausgetauscht wurde (vgl. Klonierungsstrategie für den Vektor pDM304 ITR GFP). Analog wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurde der *act6* Terminator dieses Plasmides durch die rechte ITR von DIRS-1 ersetzt.

pDM323 DIRS-1 ORF1 GFP : ORF1 HA

Dieser Expressionsvektor wurde ausgehend von dem Plasmid pDM323 DIRS-1 ORF1 kloniert, das seinerseits das GAG Protein des Transposons DIRS-1 als Fusion mit einem C-terminal gelegenen GFP-*Tag* kodierte. Das verwendete Set an Vektoren erlaubt die Expression zweier Fusionsproteine von nur einem Plasmid, was in der Regel für eine gleichmäßige und stabile Expression beider Gene in einer Zelle sorgt (Veltman et al. 2009). Dazu wird das zweite Gen von Interesse in einen *Shuttle*-Vektor kloniert, aus dem schließlich die gesamte Expressionskassette mit dem Restriktionsenzym NgoMIV herausgeschnitten und in den Endvektor ligiert werden kann. Das durch PCR generierte Gen für DIRS-1 GAG wurde in den mit BglII und SpeI linearisierten *Shuttle*-Vektor pDM344 (Veltman et al. 2009) eingebracht, der zuvor so modifiziert wurde, dass das klonierte Gen mit einem C-terminalen 3 x HA-*Tag* fusioniert wird (Zenk 2014). Die gesamte Expressionskassette wurde daraufhin wie oben beschrieben in den Expressionsvektor pDM323 DIRS-1 ORF1 ligiert. Das Plasmid kodiert somit die Fusionsproteine DIRS-1 GAG GFP und DIRS-1 GAG 3 x HA.

pDM304 3xHA AgnA und pDM304 AgnA 3xHA

Die kodierende Region von *agnA* wurde ohne das Stopp-Codon mit Hilfe der Primer DM092 und DM093 von genomischer DNA amplifiziert. Gleichzeitig wurden eine N-terminale BamHI und eine C-terminale SpeI Erkennungssequenz angefügt. Das Gen für *agnA* wurde mit Hilfe der angefügten Schnittstellen in die mit BglII und SpeI linearisierten Plasmide pDM304 N-term 3x HA und pDM304 C-term 3 x HA ligiert (C. Joppich, Abteilung Genetik, Universität Kassel, unveröffentlicht) ligiert.

pET28a RbdB cDNA

Der kodierende Bereich des *rbdB* Gens ist im Bereich der dsRB-Domäne von einem Intron unterbrochen. Für die Expression des Proteins bzw. seiner funktionellen dsRB-Domäne in *E. coli* musste die cDNA des Gens kloniert werden. Dazu wurde in einer RT-PCR das N-terminale Teilstück des *rbdB* Gens amplifiziert. Für die cDNA Synthese wurde der Primer DM030 verwendet, der am 5'-Ende mit der im Gen enthaltenen KpnI Schnittstelle abschließt. Die anschließende PCR wurde mit den Primern DM027 und DM030 durchgeführt. Das amplifizierte cDNA Fragment wurde anschließend in den pJET1.2/*blunt* Klonierungsvektor ligiert, der fortan als pJET1.2 *rbdB* cDNA *fragment* [1-582] bezeichnet wurde. Parallel dazu wurde das Volllänge-Gen für *rbdB* mit Hilfe der Primer DM027 und DM028 von genomischer DNA amplifiziert und ebenfalls in den pJET1.2/*blunt* Zwischenvektor eingebracht. Dieses Plasmid wurde daraufhin mit den Enzymen BamHI und KpnI geschnitten, sodass der N-terminale Teil des *rbdB* Gens, der das Intron enthielt, herausfiel. Das äquivalente cDNA Fragment wurde aus dem Plasmid

pJET1.2 rbdB cDNA *fragment* [1-582] herausgeschnitten und in den linearisierten Vektor ligiert. Auf diese Weise entstand der Zwischenvektor pJET1.2 rbdB [cDNA]. Aufgrund der durch die Primer angefügten Schnittstellen konnte die cDNA mit EcoRI und SalI aus dem Zwischenvektor geschnitten und in den entsprechend linearisierten Expressionsvektor pET-28a (Novagen) ligiert werden.

pMal-c2X dsRBD [RbdB]

Der Zwischenvektor pJET1.2 rbdB [cDNA] (vgl. Klonierungsstrategie von pET-28a RbdB cDNA) diente als Template, um die dsRB-Domäne von RbdB für die Expression in *E. coli* zu klonieren. Für die Amplifikation des Fragmentes wurden die Primer DM027 und DM158 verwendet, durch die eine EcoRI und eine SalI Schnittstelle angefügt wurden. Dieses Fragment konnte daraufhin in den mit EcoRI und SalI linearisierten Vektor pMal-c2X (NEB) ligiert werden.

pMal-c2X dsRBD [DrnB]

Für die Expression der *drnB* eigenen dsRB-Domäne in *E. coli*, wurde ihr kodierender Bereich von dem Plasmid pGEM-T DrnB cDNA (Zenk 2014) mit den Primern DM159 und DM161 amplifiziert. Mit Hilfe der angefügten Schnittstellen für EcoRI und SalI wurde das Insert in den entsprechend linearisierten Expressionsvektor pMal-c2X (NEB) ligiert.

pDM323 SrtA und pDM317 SrtA

Der kodierende Bereich des in *D. discoideum* kodierten Serrate (SE)-Homologes wurde in zwei Teilen amplifiziert. Für den N-terminalen Teil wurden die Primer DM196 und DM197 (#3379) verwendet. Mit Hilfe des *forward* Primers DM196 wurde eine BamHI Schnittstelle angefügt. C-terminal das PCR-Produkt von einer endogenen KpnI Schnittstelle flankiert. Unter Verwendung der Primer DM198 und DM199 wurde der C-terminale Teil des SE-Homologes amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde N-terminal von der endogenen KpnI Schnittstelle und C-terminal von einer SpeI Schnittstelle flankiert, die ihrerseits mit Hilfe des *reverse* Primers DM199 angefügt wurde. Beide Fragmente wurden jeweils in *forward* Orientierung in den Zwischenvektor pGEM[®]-T Easy ligiert. Der Zwischenvektor mit dem C-terminalen Teil des *serrate*-Homologes wurde mit KpnI und der in der MCS gelegenen SpeI Schnittstelle, linearisiert. Der N-terminale Teil des Gens wurde mit KpnI und SpeI aus dem Zwischenvektor geschnitten, und konnte daraufhin in den linearisierten Vektor ligiert werden, wodurch das Plasmid pGEM[®]-T Easy BamHI SE SpeI entstand. Anschließend wurde das vollständige *serrate*-Gen in drei weiteren Klonierungsschritten sukzessiv in die Endvektoren pDM323 und pDM317 (Veltman et al. 2009) ligiert.

pDM304 ITR *srtA* fragment rITR (*srtA* Knockdown-Vektor)

Der *srtA* Trigger (Nukleotide 613 bis 1436 der kodierenden Sequenz) wurde von cDNA mit Hilfe der Primer DM200 und DM201 amplifiziert und in den Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* ligiert. Der

Trigger konnte anschließend mit BglII und SpeI herausgeschnitten und in den entsprechend linearisierten *Knockdown*-Vektor pDM304 ITR MCS rITR kloniert werden.

pDM323 RbdB K59A/K60A

Das Plasmid wurde ausgehend von dem Vektor pDM323 RbdB K59A/K60A trunc1 GFP (Buttler 2013) kloniert, das mit BamHI und KpnI geschnitten wurde. Auf diese Weise konnte ein 725 bp großes Fragment des *rbdB*-Gens isoliert werden, das die Mutation K59A/K60A aufwies. Der Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* BclI RbdB SpeI wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI geschnitten, um ein äquivalentes Fragment des wildtypischen *rbdB*-Gens zu entfernen. Schließlich wurde das Fragment mit der Mutation in den Zwischenvektor kloniert. Das vollständige Gen für *rbdB* mit der Mutation K59A/K60A konnte daraufhin mit BclI und SpeI aus dem pJET1.2/*blunt* Vektor geschnitten und in den mit BglII und SpeI linearisierten Endvektor pDM323 ligiert.

pDM323 RbdB K19A, pDM323 RbdB Y27A und pDM323 H36A

Die Mutationen, die allesamt in der dsRNA bindenden Domäne des *rbdB*-Gens liegen, wurden durch *Overlap-Extension* PCRs (vgl. 3.2.9) generiert. Als Template für die zwei einzelnen PCR-Reaktionen diente das Plasmid pDM323 RbdB GFP.

pDM323 RbdB K19A

Der N-terminale Teil des *rbdB*-Gens (inklusive des Actin15 Promotors) wurde mit Hilfe der Primer DM206 und DM114 amplifiziert. Das PCR-Produkt wies die erwartete Länge von 389 bp auf. Das C-terminale Fragment des *rbdB*-Gens wurde unter Verwendung der Primer DM113 und DM207 vervielfältigt. Aus den beiden PCR Produkten konnte in einer *Overlap-Extension* PCR ein gemeinsames Template generiert werden, das schließlich mit Hilfe der Primer DM206 und DM207 amplifiziert wurde. Das PCR Produkt (2390 bp) mit der entsprechenden Mutation wurde in den pJET1.2/*blunt* Zwischenvektor kloniert. Dieser wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI geschnitten. So konnte ein Fragment isoliert werden, das den *act15* Promotor und ein Teilstück des *rbdB*-Gens (inklusive der eingefügten Mutation K19A) enthielt. Das Plasmid pDM323 RbdB GFP wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten. Der Promotor und ein Teil des wildtypischen *rbdB* Gens wurden auf diese Weise entfernt. Anschließend konnte das *Insert*, das abgesehen von der Mutation äquivalent zu dem herausgeschnittenen Fragment war, in den Vektor ligiert werden.

pDM323 RbdB Y27A

Dieses Plasmid wurde analog zu dem Vektor pDM323 RbdB K19A kloniert. Der N-terminale Teil (418 bp) des *rbdB*-Gens wurde mit den Primern DM206/DM116 und das C-terminale Fragment (2013 bp) mit den Primern DM115/DM207 amplifiziert. Für die *Overlap-Extension* PCR konnten

die Primer DM206 und DM207 verwendet werden. Das PCR Produkt (2390 bp) wurde in den Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* ligiert. Dieser wurde daraufhin mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI geschnitten. Das isolierte *Insert*, das Teile des *rbdB* Gens inklusive der eingefügten Mutation enthielt, wurde wie für pDM323 RbdB K19A beschrieben, in das mit XhoI und KpnI geschnittene Plasmid pDM323 RbdB GFP eingebracht.

pDM323 RbdB H36A

Dieser Vektor konnte ebenfalls analog zu dem Plasmid pDM323 RbdB K19A kloniert werden. Der N-terminale Teil *rbdB*-Gens (438 bp) wurde diesmal mit den Primern DM206/DM118 amplifiziert; für das C-terminale Fragment (1994 bp) wurden die Primer DM117/DM207 (#3296/#3389) verwendet. Die *Overlap-Extension* PCR wurde mit Hilfe der Primer DM206 und DM207 durchgeführt und das generierte PCR Produkt von 2390 bp in den Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* ligiert. Mit Hilfe der Enzyme XhoI und KpnI konnte schließlich ein Fragment des *rbdB*-Gens herausgeschnitten werden, das die Mutation H36A enthielt. Dieses konnte wie oben beschrieben in den Vektor pDM323 RbdB GFP eingebracht werden.

pDM317 NLS/NoLS [RbdB]

Der *rbdB*-Gen Abschnitt, der die Aminosäuren 643-713 kodierte, wurde mit Hilfe der Primer DM167 und DM172 amplifiziert und in den Zwischenvektor pJET1.2/*blunt* ligiert. Mit Hilfe der angefügten BglII und SpeI Schnittstellen konnte das *Insert* aus dem Vektor geschnitten und in den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Expressionsvektoren pDM317 (Veltman et al. 2009) ligiert werden.

pDM317 NLS2 [RbdB]

Die vorhergesagte NLS Sequenz des *rbdB* Gens (Aminosäuren 643-664) wurde durch zwei überlappende Oligonukleotide generiert, die in einer PCR-Reaktion ohne Template durch die Taq-Polymerase verlängert wurden. Durch die verwendeten Primer DM208 und DM209 wurden eine N-terminale BglII und eine C-terminale SpeI Schnittstelle angefügt. Das geschnittene PCR-Produkt konnte daraufhin in den mit BglII und SpeI linearisierten Expressionsvektoren pDM317 (Veltman et al. 2009) ligiert werden.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) wurde bei 37 °C entweder schüttelnd (240 rpm) in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert. Je nach Stamm (vgl. 2.12) oder zur gezielten Selektion wurde das Nährmedium mit Antibiotika versetzt (vgl. 2.11).

3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden nach der Calciumchlorid-Methode hergestellt (Oishi et al. 1972). Dazu wurde eine 5 mL Vorkultur mit Zellen des jeweiligen *E. coli* Stammes angeimpft und über Nacht in LB-Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL der Vorkultur inokuliert und so lange schüttelnd kultiviert, bis die Zellen eine Dichte von $OD_{600} = 0,5$ erreicht hatten. Dann wurden die Zellen bei 1700 rcf, 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 50 mL einer kalten 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut bei 1700 rcf, 4 °C für 5 min pelletiert und schließlich in 10 mL einer Lösung bestehend aus 50 mM $CaCl_2$ /15 % Glycerin resuspendiert. Daraufhin wurden je 100 μ L Zellsuspension in geeignete Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Plasmide wurden durch die Hitzeschock-Methode in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (Cohen et al. 1972). Dazu wurde ein 100 μ L Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und zwischen 50 ng bis 1 μ g Plasmid-DNA oder ein kompletter Ligationsansatz (vgl. 3.2.3) dazu gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 s, wobei die Plasmide von den Bakterien aufgenommen wurden. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf Eis inkubiert, bevor 1 mL LB-Medium dazu gegeben wurde. Nach einer sich anschließenden 30-minütigen Regeneration bei 37 °C wurden die Zellen bei 4000 rcf 3 min lang pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienzellen in dem verbliebenen Restmedium resuspendiert und schließlich auf LB-Agar-Platten mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum ausplattiert (vgl. 2.11). Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht, sodass resistente Zellen zu sichtbaren Kolonien anwachsen konnten.

3.1.4 Kultivierung von *D. discoideum*

Die Anzucht des axenischen *D. discoideum* Stammes AX2 und seiner Derivate erfolgte bei Dauerlicht und einer Temperatur von 22 °C in Flüssigkultur oder in Assoziation mit Bakterien (*Klebsiella aerogenes*). Ein Überblick über die verwendeten und teilweise angepassten Protokolle zur Kultivierung wird in Fey et al. (2007) gegeben.

Für die Anzucht in Flüssigkultur wurde das axenische HL5-Flüssigmedium zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen mit 100 u/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin versetzt (HL5⁺-Medium vgl. 2.11). Bei der Verwendung von Blastocidin S und/oder Geneticin (G418) resistenten Stämmen wurden dem Medium zusätzlich 10 µg/mL Blastocidin S bzw. 10 µg/mL G418 beigefügt (vgl. 2.11). Die Kultivierung erfolgte entweder als adhärenzte Zellschicht in Petrischalen bzw. Multiwellplatten oder in Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler bei 150 rpm. Die bewachsenen Petrischalen bzw. Multiwellplatten wurden alle zwei Tage gespült und mit neuem Medium aufgefüllt, sodass niemals eine vollständige Konfluenz erreicht wurde. Die Zelldichte der Schüttelkulturen wurde mit Hilfe eines Zellzählers bestimmt und zwischen 1×10^5 bis 5×10^6 Zellen/mL gehalten.

Die Kultivierung mit Bakterienzellen als Nahrungsquelle erfolgte entweder auf mit *K. aerogenes* bewachsenen SM-Agarplatten (KA-Platten) oder in einer Suspension aus Phosphatpuffer und *K. aerogenes* Zellen. KA-Platten wurden hergestellt, indem 250 µL einer *K. aerogenes* Suspension auf je einer SM-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 22 °C inkubiert wurden. Auf diese Weise entstand ein vollständiger Bakterienrasen. Die *D. discoideum* Zellen wurden entweder mit einem sterilen Zahnstocher oder aus einer Zellsuspension (ca. 2×10^5 Zellen) auf die KA-Platte überimpft. Alternativ wurden *D. discoideum* Zellen wie z.B. beim Subklonieren (vgl. 3.1.6) gemeinsam mit 250 µL der *K. aerogenes* Suspension auf einer SM-Platte ausplattiert.

3.1.5 Transformation von *D. discoideum*

Die Transformation von *D. discoideum* Stämmen erfolgte durch Elektroporation (Gaudet et al. 2007). 2×10^7 Zellen des in Flüssigkultur gehaltenen Stammes wurden abgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 390 rcf/4°C für 5 min pelletiert und einmal mit 5 mL Soerensen Phosphatpuffer und zweimal mit EP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in 700 µL EP-Puffer resuspendiert, mit 10 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt, in eine vorgekühlte EP-Küvette überführt und darin 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde bei 1 kV und 25 µF durchgeführt. Im Anschluss daran wurde der Ansatz erneut 10 min lang auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der komplette Transformationsansatz auf eine Petrischale gegeben und mit 10 mL HL5⁺-Medium aufgefüllt. Am folgenden Tag wurde das

Medium vorsichtig abgenommen und gegen das benötigte Selektionsmedium ausgetauscht. Bei erfolgreicher Transformation wurden nach 5-10 Tagen erste Einzelkolonien sichtbar, die ggf. subkloniert wurden (vgl. 3.1.6). Nach der Transformation von integrierenden Expressionsvektoren oder von *Knockout*-Konstrukten wurden die Zellen grundsätzlich vereinzelt. Gesamte Zellpopulationen aus unabhängigen Transformationen wurden dann analysiert, wenn *D. discoideum* Zellen mit extrachromosomalen Expressionsvektoren transformiert wurden.

3.1.6 Subklonieren von *D. discoideum*

Um nach einer erfolgten Transformation (vgl. 3.1.5) Einzelklone zu erhalten, wurden die selektierten Zellen mit 1 mL Soerensen-Phosphatpuffer von der Petrischale gespült. Von dieser Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) hergestellt und je 100 μ L einer jeden Verdünnung mit 200 μ L KA-Suspension auf einer SM-Agarplatte ausplattiert. Nach ca. drei bis vier Tagen konnten vom Fraßrand klar abgegrenzter Plaques Zellen in Multiwellplatten mit Flüssigmedium überimpft werden. Das Protokoll basiert auf Angaben von Fey et al. (2007).

3.1.7 Herstellung von Sporensuspensionen

Um eine Sporensuspension für die dauerhafte Lagerung von *D. discoideum* Stämmen bei -80°C herzustellen, wurden $1,5 \times 10^8$ Zellen einer Kultur mit einer Zelldichte von ca. 5×10^6 Zellen/mL bei 390 rcf/ 4°C geerntet und 2-mal mit 20 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 μ L Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert und auf einer Phosphatagarplatte ausplattiert. Nachdem der Puffer verdunstet war, wurde die Agarplatte mit dem Deckel nach unten für 30 h bei 22°C gelagert. Bedingt durch den Nahrungsmangel traten die Zellen in den Entwicklungszyklus ein und bildeten schließlich Fruchtkörper aus. Die enthaltenen Sporen wurden durch Abklopfen der Fruchtkörper in den Deckel einer Petrischale geerntet, in 1 mL Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen und schließlich in ein Cryo-Gefäß überführt. So konnten die Sporen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C dauerhaft gelagert werden.

3.1.8 Fluoreszenzmikroskopie von *D. discoideum*

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von fixierten *D. discoideum* Zellen wurde entweder ein Leica DM IRB Fluoreszenzmikroskop oder ein Leica DM 5500 verwendet, wobei die Präparate mit DAPI- und GFP-Filtern betrachtet wurden. Die Bildaufzeichnung erfolgte mit Hilfe der jeweils eingebauten Digitalkamera. Lebende Zellen wurden ausschließlich mit dem Leica DM IRB Fluoreszenzmikroskop untersucht. Alle Bilder wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerung aufgenommen und als Graustufenbilder im TIF-Format exportiert. Die Bearbeitung der Bilder

erfolgte entweder mit dem Programm Adobe Photoshop CS6 (64 Bit) oder mit Hilfe von ImageJ. Dazu wurden die Bilder in den RGB-Modus konvertiert und eingefärbt. Ggf. wurden Bilder unterschiedlicher Farbkanäle überlagert.

Fixieren von Zellen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Fixierung von Zellen wurde in Anlehnung an Manu Dubin (Dubin 2010) durchgeführt. 200 μ L einer *D. discoideum* Kultur mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL wurden auf ein HCl gereinigtes Deckgläschen aufgebracht. Nach 20 min wurde das Medium abgenommen und die Zellen einer Methanol- oder einer Paraformaldehyd-Fixierung unterzogen. Im ersten Fall wurden die Deckgläschen mit den Zellen 5 min lang bei -20°C in 100 % Methanol inkubiert. Im zweiten Fall wurden die Zellen mit 200 μ L Formalin (1:10 mit 1 x PBS verdünnt, Endkonzentration 4 %) überschichtet, 5 min bei Raumtemperatur fixiert und zusätzlich 5 min lang in 1 x PBS mit 0,2 % (v/v)

Triton X-100 permeabilisiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen 2-mal mit 1 x PBS gewaschen und zur Visualisierung der genomischen und der mitochondrialen DNA 3 min lang mit einer DAPI Lösung (1 mg/mL DAPI-Stammlösung, 1:15000 in 1 x PBS verdünnt) inkubiert. Zur Einbettung wurden die Deckgläschen mit Gelvatol auf einen Objektträger aufgebracht.

Mikroskopie lebender Zellen

Für die Mikroskopie lebender *D. discoideum* Zellen wurden diese vorsichtig pelletiert, mit Soerensen Phosphatpuffer gewaschen und in einer geeigneten Menge *Low Fluorescence Axenic* Medium resuspendiert. Nach einer Inkubation von mindestens 5 h wurden Zellen mit einer Dichte von ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL auf ein 50 x 50 mm Deckgläschen pipettiert. Nach 20 min konnte die subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

3.1.9 Entwicklungszyklus von *D. discoideum*

Um zu untersuchen, ob Gene während des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* differentiell exprimiert werden, wurden je 5×10^7 Zellen ohne Nahrungsquelle auf einem Nitrocellulose-Filter ausgebracht. Nach ausgewählten Zeitpunkten im Entwicklungszyklus wurden die Zellen geerntet, um die RNA zu isolieren. Zur Vorbereitung wurde die benötigte Anzahl an Zellen aus einer Schüttelkultur entnommen und 10 min lang auf Eis inkubiert, bevor sie bei 390 rcf/ 4°C 4 min lang geerntet wurden. Daraufhin wurden die Zellen 2-mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und in einem geeigneten Volumen des gleichen Puffers resuspendiert, sodass man eine Zelldichte von 1×10^8 Zellen/mL erhielt. Je 500 μ L dieser Zellsuspension wurden auf einen Filter ausgebracht. Nachdem die Zellen das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht hatten, wurden

sie mit 10 mL Soerensen Phosphatpuffer vom Filter gespült und bei 390 rcf/4 °C 6 min lang pelletiert. Anschließend konnte die RNA-Isolierung nach 3.2.12 durchgeführt werden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Beim Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurden die jeweiligen Herstellerangaben beachtet. Die Reaktionsvolumina wurden entsprechend der eingesetzten DNA Menge angepasst: Ein analytischer Verdau von Plasmid-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µL durchgeführt, wobei 0,8-1 µg des jeweiligen Plasmids eingesetzt wurden. Bei einem präparativen Verdau von Plasmiden wurden 2-3 µg DNA verwendet und das Reaktionsvolumen wurde auf 50 µL erhöht.

3.2.2 Gelelution von DNA-Fragmenten

Benötigte DNA-Fragmente wurden nach ausreichender Auftrennung mit Hilfe des NucleoSpin[®] Extract-II-Kits nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel eluiert.

3.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Von der Plasmid-DNA wurden ca. 100 ng in den Reaktionsansatz eingesetzt; die *Insert*-DNA wurde im drei- bis fünffachen molaren Überschuss dazugegeben. Der komplette Reaktionsansatz wurde 10-30 min bei RT inkubiert und das Enzym anschließend durch Erhitzen bei 70 °C für 5 min inaktiviert. Beim Klonieren von PCR-Produkten wurden das CloneJet[™] PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) oder das pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega) nach Angaben der Hersteller verwendet. Im Anschluss an die jeweilige Ligationsreaktion wurde der komplette Ansatz in kompetente *E. coli* Top10 Zellen transformiert (vgl. 3.1.3).

3.2.4 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Eine Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA wurde durchgeführt, um die Rezirkularisierung während einer Ligation zu vermeiden. Dazu wurde 1 µL FastAP (Thermo Fisher Scientific) in einen präparativen Restriktionsverdau (vgl. 3.2.1) eingesetzt. Das Enzym wurde entweder durch Hitze bei 75 °C für 5 min inaktiviert oder im Zuge der Agarosegelelektrophorese (vgl. 3.2.21) und der sich anschließenden Gelelution (vgl. 3.2.2) entfernt.

3.2.5 Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Um strangspezifische ^{32}P markierte DNA-Sonden herzustellen, wurden Oligonukleotide mit Hilfe der T4 PNK (Thermo Fisher Scientific) wie in Tab. 7 phosphoryliert. In einer Reaktion wurden dazu bis zu acht verschiedene Oligonukleotide eingesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, auf 150 μL mit ddH₂O aufgefüllt und anschließend über eine G50 Sephadex Säule gereinigt (vgl. 3.2.3).

Tab. 7: Reaktionsansatz einer T4 PNK vermittelten Phosphorylierung

Reaktionsansatz	
4 μL	Oligonukleotid (5 pmol / μL) oder Oligonukleotid-Mischung (je 5 pmol/ μL)
2 μL	10 x Reaktionspuffer A
1 μL	T4 PNK
2 μL	(γ - ^{32}P)-ATP
ad 20 μL	ddH ₂ O

3.2.6 Polymerasekettenreaktion

PCR-Reaktionen (Mullis et al. 1986) zur Amplifikation von DNA Abschnitten wurden in analytischem Maßstab (25 μL Reaktionsvolumen) oder in präparativem Maßstab (50 μL Reaktionsvolumen) durchgeführt. Wenn DNA-Fragmente kloniert werden sollten, wurde die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) zur Amplifikation verwendet, wobei die Herstellerangaben berücksichtigt wurden. Alle anderen PCR-Reaktionen wurden der Taq-Polymerase (*homemade*) durchgeführt. Tab. 8 zeigt einen dafür allgemeinen Reaktionsansatz.

Tab. 8: Präparativer Reaktionsansatz einer PCR unter Verwendung der Taq-Polymerase

Reaktionsansatz	
0,1-10 ng	Plasmid-DNA oder 50-250 ng gDNA
5 μL	10 x PCR Puffer (Thermo Fisher Scientific)
5 μL	dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)
5 μL	Primer <i>forward</i>
5 μL	Primer <i>reverse</i>
1 μL	Taq-Polymerase (<i>homemade</i>)
ad 50 μL	H ₂ O

Die *Cycling*-Bedingungen wurden hinsichtlich der eingesetzten Primer (Länge, GC-Gehalt) und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes angepasst (vgl. Tab. 9)

Tab. 9: Cycling Bedingungen einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Taq-Polymerase

Programm einer Standard-PCR			
Denaturierung (initial)	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 sec] 30 x
Anlagerung	50 °C	40 sec	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Elongation (final)	72 °C	4-8 min	1 x

3.2.7 Quantitative Real-Time PCR

Bestimmung der relativen mRNA Expression eines Zielgens

Mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR) wurde die relative mRNA Expression eines Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen bestimmt. Als Referenzgen wurde *cinD-1* verwendet. Für die cDNA-Synthese und die sich direkt anschließende PCR wurde das SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Kit (Bioline) nach Angaben des Herstellers verwendet. Wenn möglich wurden die PCR-*Amplicons* so gewählt, dass sie ein Intron überspannten. Ggf. wurden vorab PCR-Reaktionen ohne die Reverse Transkriptase durchgeführt, um eine Kontamination der Proben mit gDNA auszuschließen. Die Echtzeitquantifizierung wurde auf dem Mastercycler® ep *realplex* (Eppendorf) in 96-Well-Platten (FrameStar® 96 Skirted, 4titude®) durchgeführt. Der 10-minütigen cDNA Synthese bei 45 °C für 10 min schloss sich die initiale Denaturierung bei 95 °C für 2 min an. Dabei wurde die reverse Transkriptase inhibiert und die Polymerase aktiviert. Es folgten 40 Zyklen bei 95 °C für 5 s und bei 60 °C für 15 s (Zwei-Schritt *Cycling*) und im Anschluss die Aufnahme der Schmelzkurve. Für die Expressionsanalysen wurden mindestens drei verschiedene RNA-Präparationen (biologische und/oder technische Replikate) verwendet, die ihrerseits in Triplikaten vermessen worden sind. Wenn einer der gemessenen Ct-Werte um 0,5 oder mehr von den anderen abwich, wurde dieser nicht bei der Datenauswertung berücksichtigt. Die relative Expression der Ziel-mRNA (R) wurde mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode (Pfaffl 2001) bestimmt.

3.2.8 Reverse Transkriptase PCR

Als Template zur Herstellung von cDNA wurden 5 µg Gesamt-RNA verwendet. In der Regel wurden genspezifische Primer für die cDNA-Synthese einer bestimmten RNA verwendet. Dabei kam die Tetro Reverse Transkriptase (Bioline) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben zum Einsatz. Der Ansatz wurde 40 min bei 45 °C inkubiert und das Enzym anschließend für 5 min bei 85 °C inaktiviert. Zwei µL des Reaktionsansatzes wurden anschließend in die PCR (vgl. 3.2.6) eingesetzt.

3.2.9 *Overlap-Extension* PCR

Für die Expression mutagenisierter Proteine in *D. discoideum* wurde die Sequenz des entsprechenden Gens mit Hilfe eines PCR-basierten Ansatzes verändert und in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert. Zunächst wurden zwei PCR Produkte mit überlappenden Enden hergestellt. Durch die verwendeten Primer wurde innerhalb der sich überlappenden Sequenzen die gewünschte Mutation eingefügt. Durch einer *Overlap-Extension* PCR (Ho et al. 1989) wurden die beiden aus dem Gel aufgereinigten PCR Produkte in einer weiteren Reaktion kombiniert: Bei 98 °C wurden die PCR-Produkte 2 min lang aufgeschmolzen, bei 60 °C konnten sich die Stränge an den überlappenden Enden 20 s lang anlagern und bei 72 °C wurden die 3'-Enden von der *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase (Thermo Scientific) verlängert. Nach fünf Zyklen wurden die äußeren nicht mutagenisierten Primer zu dem Reaktionsansatz (vgl. Tab. 10) gegeben und die aus zwei PCR-Produkten generierte *Template* DNA konnte in einer weiteren PCR-Reaktion (vgl. 3.2.6) amplifiziert werden.

Tab. 10: Ansatz einer *Overlap-Extension* PCR

Reaktionsansatz: <i>Overlap-Extension</i> PCR	
5 ng	PCR Produkt 1 (aufgereinigt)
5 ng	PCR Produkt 2 (aufgereinigt)
10 µL	5 x HF PCR-Puffer
5 µL	dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)
0,5 µL	<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA Polymerase
ad 48 µL	ddH ₂ O
nach 5 Zyklen: 98 °C, 2min – 60 °C, 20 s – 72 °C, 20-40 s	
1 µL	Primer <i>forward</i> (25 pmol/µL)
1 µL	Primer <i>reverse</i> (25 pmol/µL)

3.2.10 Erzeugen von 5' A-Überhängen an stumpfen DNA-Enden

Um PCR-Produkte mit stumpfen Enden in den linearisierten Klonierungsvektor pGEM[®] T-Easy zu klonieren, der T-Überhänge am 5'-Ende aufweist, wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase 5'-A-Überhänge erzeugt.

Tab. 11: Reaktionsansatz zur Erzeugung von 5' A-Überhängen an stumpfen DNA-Enden

Reaktionsansatz: <i>A-tailing</i> von stumpfen DNA Enden	
10 µL	Aufgereinigtes PCR Produkt (präparativer Ansatz)
5 µL	10 x PCR Puffer (Thermo Fisher Scientific)
10 µL	dATP (10 mM)
1 µL	Taq-Polymerase (<i>homemade</i>)
24 µL	ddH ₂ O
Σ 50 µL	

Der Reaktionsansatz wurde daraufhin 20 min bei 72 °C inkubiert. Nachdem die DNA mit Hilfe des NucleoSpin® Gel und PCR *Clean-up* Kits (Thermo Fisher Scientific) gereinigt worden ist, wurde sie für eine Ligationsreaktion verwendet (vgl. 3.2.3).

3.2.11 Plasmidpräparation

Für Plasmidminipräparationen wurden 4 mL einer *E. coli* Top10 Kultur verwendet, die über Nacht in LB-Medium angezogen wurde. Die Zellen wurden bei 4000 rcf 5 min lang pelletiert und der Überstand verworfen. Die Plasmidisolation erfolgte mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers.

Für die Präparation von Plasmiden in größerem Maßstab (Midi) wurden 100 mL einer über Nacht angewachsenen Top10 *E. coli* Kultur verwendet. Zur Aufreinigung der Plasmide wurde das NucleoBond PC 100 Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.12 Isolierung von Gesamt-RNA aus *D. discoideum*

Gesamt RNA wurde in Anlehnung an Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al. 1987) unter Verwendung des TRIzol-Reagenz durchgeführt. Dazu wurden 2×10^7 Zellen bei 390 rcf/4 °C für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 mL TRIzol resuspendiert und 5 min lang inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12.000 rcf wurde der Überstand überführt und mit 200 µL Chloroform versetzt. Die Probe wurde mehrmals invertiert und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Phasentrennung schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 rcf an. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, mit 0,8 Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Zur Fällung wurde die RNA bei 12.000 rcf/4 °C für 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Probe mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen. Die getrocknete RNA wurde anschließend in 50-100 µL DEPC-H₂O aufgenommen.

3.2.13 Isolierung von gDNA aus *D. discoideum*

Zur Isolation von genomischer DNA aus *D. discoideum* wurden 2×10^7 Zellen verwendet, die bei 390 rcf/4 °C 5 min lang pelletiert und anschließend einmal in 1 x PBS gewaschen wurden. Die gDNA Gewinnung erfolgte mit Hilfe des GeneJET *Genomic DNA Purification* Kits (Thermo Fisher Scientific), wobei das Herstellerprotokoll für kultivierte Säugetierzellen verwendet wurde.

3.2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Lösungen wurde das NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie) verwendet.

3.2.15 Fraktionierung in Cytoplasma und Nukleoplasma zur DNA-Isolation

Zur Gewinnung von DNA aus dem Cytoplasma bzw. dem Nukleoplasma von *D. discoideum* wurde ein Zellpellet von 5×10^7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden 2-mal mit je 20 mL eiskaltem Soerensen Phosphatpuffer gewaschen und bei 390 rcf/4 °C für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 4,5 mL Zellysepuffer resuspendiert und sukzessiv mit bis zu 500 µL 10 % NP40 versetzt, um die Zellmembranen aufzulösen. Nicht lysierte Zellen wurden anschließend bei 390 rcf/4 °C 3 min lang abzentrifugiert, bevor der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Zellkerne wurden anschließend durch Zentrifugation bei 3000 rcf/4 °C 15 min lang pelletiert und der Überstand (cytoplasmatische Fraktion) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Kerne wurden in 5 mL 1 x TE Puffer resuspendiert und zur Lyse mit 180 µL 20 % SDS versetzt (Kernfraktion). Auch zur cytoplasmatischen Fraktion wurden 180 µL einer 20%igen SDS-Lösung gegeben. Beide Fraktionen wurden anschließend mit 100 µL einer Proteinase K-Lösung (20 mg/mL) versetzt und bei 65 °C für 1 h im Hybridisierungsofen rotierend inkubiert. Daraufhin schloss sich ein RNaseA Verdau für 1 h bei 37 °C an, wobei 100 µL einer RNaseA-Lösung (25 mg/mL) zu den beiden Fraktionen gegeben worden sind. Im Anschluss daran wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (vgl. 3.2.18) und der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die enthaltenen Nukleinsäuren wurden nach 3.2.19 gefällt und in 50 µL ddH₂O aufgenommen.

3.2.16 Nuklease Verdau von cytoplasmatischer und genomischer DNA

Cytoplasmatische und genomische DNA wurden wie in 3.2.15 beschrieben gewonnen. 10 µL einer jeden Fraktion wurden mit den Nukleasen DNaseI, Exonuclease III (ExoIII), Exonuclease I (ExoI), S1 Nuklease (S1) und Micrococcal Nuklease (MNase) (Thermo Fisher Scientific) in einem Reaktionsvolumen von 20 µL nach Herstellerangaben behandelt. Wenn möglich wurde das Enzym durch Hitze inaktiviert, bevor alle Reaktionsansätze mit 6 x Ladepuffer versetzt und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert wurden.

3.2.17 Exonuclease Verdau von Gesamt-RNA

Um die 5'-Enden kleiner RNAs auf das Vorhandensein eines Mono- oder Triphosphats hin zu untersuchen, wurden 10 µg RNA nach Herstellerangaben in Puffer A und/oder Puffer B mit der TerminatorTM 5'-Phosphat abhängigen Exonuclease verdaut. Im Anschluss daran wurde die RNA in einem PAA-Gel aufgetrennt (vgl. 3.2.21) und ein Northern Blot (vgl. 3.2.24) durchgeführt. Mit Hilfe von spezifischen ³²P markierten Sonden konnten daraufhin kleine regulatorische RNAs nachgewiesen (vgl. 3.2.26) und im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen quantifiziert werden.

3.2.18 Phenol-Chloroform-Extraktion

Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion wurden Proteine aus Nukleinsäurelösungen entfernt. Die Nukleinsäure-haltige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform versetzt und mehrmals invertiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde die Probe bei 15.000 rcf 15 min lang zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die Nukleinsäuren nach 3.2.19 präzipitiert.

3.2.19 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurde die Probe entweder mit dem 0,8fachen Volumen Isopropanol oder dem 2,5fachen Volumen Ethanol sowie mit dem 0,1fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,7) versetzt. Anschließend wurde sie bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 h oder über Nacht inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation für 45 min bei 20.000 rcf/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ an. Der Überstand wurde verworfen und die gefällten Nukleinsäuren mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 15 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert und die Nukleinsäuren vollständig getrocknet waren, wurden sie in einer geeigneten Menge ddH₂O gelöst.

3.2.20 Illumina Sequenzierung

Kleine angereicherte RNA Moleküle aus verschiedenen *D. discoideum* Stämmen wurden mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung in Kooperation mit J. Vogel und C. Sharma (Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg) analysiert.

2×10^7 axenisch wachsende Zellen der Stämme AX2, rdbB- und agnA- wurden bei 390 rcf/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min lang pelletiert und einmal mit 10 mL Soerensen Phosphatpuffer gewaschen. Unter Verwendung des NucleoSpin® miRNA Kits (Macherey-Nagel) wurden kleine RNAs (< 200 Nukleotide) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Vorbereitung der RNA-Proben, die Sequenzierung und die anschließende bioinformatische Aufarbeitung der Daten wurden am Zentrum für Infektionsforschung (Universität Würzburg) durchgeführt.

Die isolierten RNA-Moleküle wurden am 3'-Ende mit einem Poly-A-Schwanz versehen und vorhandene 5'-Triphosphat Enden in ein Monophosphat konvertiert, bevor schließlich ein RNA Adapter ligiert wurde. Als Primer für die cDNA Synthese wurde ein Poly-T-Oligo verwendet. Die generierten cDNA-Moleküle konnten daraufhin mittels PCR amplifiziert werden.

Die cDNA Bibliotheken wurden mit einer Illumina HiSeq 2000 Maschine sequenziert, wobei 5,3 Millionen, 6,6 Millionen und 4,9 Millionen *Reads* mit ausreichender Qualität für den AX2 Wildtyp, den rdbB- und den agnA- Stamm generiert werden konnten. Die prozessierten Reads wurden mit Hilfe des *read mappers segemehl* dem DIRS-1 Element SB41 (accession no. M11339.1)

und dem *Dictyostelium* Genom (DDB0169550, DDB0215151, DDB0232428, DDB0232430, DDB0232432, DDB0237465, DDB0215018, DDB0220052, DDB0232429, DDB0232431, DDB0232433) zugeordnet. Basierend auf diesen Alignments wurden so genannte *Coverage Plots* im *wiggle* Format generiert, die mit Hilfe der Browser *Integrative Genomics Viewer* (Thorvaldsdottir et al. 2013) und *Integrated Genome Browser* (Nicol et al. 2009) analysiert wurden. Wenn die *Reads* mehreren Positionen im DIRS-1 Element bzw. im Genom zugeordnet werden konnten, erschien im *Coverage Plot* ein zu der Anzahl der Bindepositionen proportionaler Anteil. Die gewonnenen RNA-Expressionsdaten wurden in der *Gene Expression Omnibus* (GEO) Online Datenbank unter der Zugangsnummer GSE56111 hinterlegt. Die Browser gestützte Auswertung der Daten wurde in der Abt. Genetik (Universität Kassel) durchgeführt.

3.2.21 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

TBE-Agarosegele (nativ)

TBE-Agarosegele wurden zur Auftrennung von DNA unter nativen Bedingungen verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde eine geeignete Menge Agarose (0,8-2 %) in 1 x TBE gelöst, aufgeköcht und zum Färben der Nukleinsäuren mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde das noch flüssige Gel in eine horizontale Gelkammer gegossen. Als Elektrodenpuffer diente 1 x TBE. Die aufzutrennenden DNA Proben wurden mit 6 x DNA Auftragspuffer versetzt und auf das Gel geladen. Der Gellauf fand bei 5-10 V/cm statt. Um die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Gel mit UV-Licht (256 nm) bestrahlt. Der in die DNA interkalierte Farbstoff fluoreszierte bei 560 nm. Die Dokumentation fand mit Hilfe des Intas-Geldokumentationssystems statt.

MOPS-Agarosegele (halbdenaturierend)

Zur Auftrennung von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA oder von Gesamt-RNA wurden halbdenaturierende MOPS-Agarosegele durchgeführt. Dazu wurden die Nukleinsäuren vor dem Gellauf denaturiert, indem 12 µL der DNA bzw. der RNA Lösung mit 4 µL 10 x MOPS, 4 µL 37 % Formaldehyd und 20 µL Formamid (deionisiert) versetzt, 5 min bei 70 °C erhitzt und kurz auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurde die Probe mit 6 x DNA Auftragspuffer versetzt und in einem nativen 1 x MOPS-Agarosegel mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid und unter Verwendung von 1 x MOPS als Elektrodenpuffer aufgetrennt.

GTC/TBE-Agarosegele (denaturierend)

Mit Hilfe von GTC/TBE-Agarosegelen wurde Gesamt-RNA unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Ein TBE-Agarosegel wurde nach dem Erhitzen auf 60 °C abgekühlt, mit GTC (20 mM finale Konzentration) sowie mit Ethidiumbromid (0,5 µg/mL) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Zu den RNA Proben wurden 3 x RNA Auftragspuffer mit

Ethidiumbromid gegeben, bevor sie 5 min bei 80 °C erhitzt und anschließend kurz auf Eis inkubiert wurden. Nachdem die Proben auf das Gel geladen worden sind, fand die Auftrennung bei 5-10 V/cm unter Verwendung von 1 x TBE als Elektrodenpuffer statt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung niedermolekularer RNA wurden denaturierende PAA-Urea Gele (vgl. Tab. 12) verwendet. Die RNA wurde mit einer geeigneten Menge an 3 x RNA-Auftragspuffer versetzt und bei 80 °C 5 min lang erhitzt und kurz auf Eis gelagert. Nachdem die Proben auf das Gel geladen worden sind, fand der Gellauf bei 25 mA, 28 W und 150 V statt. Als Elektrodenpuffer wurde 20 mM MOPS (pH 7,0) verwendet.

Tab. 12: Zusammensetzung eines 11%igen, denaturierenden PAA Gels.

Komponente	Menge	finale Konz.
40% Acrylamid-/Bisacrylamid (19:1)	8,25 mL	11 %
Urea	12,6 g	7 M
1 M MOPS (pH 7,0)	0,6 mL	20 mM
H ₂ O	ad 30 mL	-

3.2.22 Southern Blot

Southern Blots wurden in Anlehnung an E.M. Southern (Southern 1975) durchgeführt. Um extrachromosomale DNA-Intermediate nachzuweisen, wurde DNA aus dem Cytoplasma und aus dem Nucleoplasma isoliert (vgl. 3.2.15) und ggf. mit verschiedenen Nukleasen (vgl. 3.2.15) behandelt. Die DNA wurde entweder in nativen TBE-Agarosegelen oder halbdenaturierend, in MOPS-Agarosegelen aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 30 min in Denaturierungspuffer und 30 min in Neutralisierungspuffer geschwenkt, bevor die DNA per Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Amersham Hybond™-NX, GE-Healthcare) transferiert wurde. Die Nukleinsäuren wurden über Nacht gebロットet und durch UV-Licht (0,560 J/cm²) auf der Membran fixiert. Mit Hilfe von ³²P markierten Sonden wurden spezifische DNA-Fragmente detektiert.

3.2.23 Agarose-Northern Blot

Agarose-Northern Blots wurden zur gezielten Detektion von mRNAs verwendet. Dazu wurden 12 µg RNA halbdenaturierend in 1 x MOPS-Agarosegelen oder in denaturierenden TBE/GTC-Agarosegelen (vgl. 3.2.21) aufgetrennt.

Die RNA wurde per Kapillartransfer und unter Verwendung von 20 x SSC als Laufpuffer auf eine Nylonmembran (Amersham Hybond™-NX, GE-Healthcare) transferiert. Gebლობet wurde über einen Zeitraum von 16 bis 24 h. Anschließend wurden die Nukleinsäuren auf der Membran

fixiert, indem sie mit UV-Licht ($0,560 \text{ J/cm}^2$) bestrahlt wurden. Zur Detektion spezifischer mRNAs wurde die Membran mit einer ^{32}P markierten Sonde hybridisiert (vgl. 3.2.26).

3.2.24 Northern Blot für kleine RNAs

Northern Blots zum Nachweis kleiner RNAs wurden nach dem Protokoll von G.S. Pall durchgeführt (Pall et al. 2007). Dazu wurden $12 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA in denaturierenden 11 % PAA-Urea MOPS (pH 7) Gelen aufgetrennt (vgl. 3.2.21). Die RNA wurde durch ein *Semidry* Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran (HybondTM-NX-Membran, GE Healthcare) übertragen, wobei die Blotapparatur FastBlot B34 (Biometra) verwendet wurde. Als Elektrodenpuffer diente DEPC-ddH₂O; der Transfer fand bei 20 V für 10-12 min im Kühlraum (4 °C) statt. Um die Nukleinsäuren kovalent an die Membran zu binden, wurde eine Carbodiimid-vermittelte Methode verwendet (Pall et al. 2007). Ein Whatman-Papier wurde mit einer geeigneten Menge an frisch hergestellter *Crosslinking*-Lösung (0,13 M 1-Methylimidazol (pH 8), 0,16 M EDC) getränkt, sodass dieses gerade gesättigt war. Anschließend wurde die Membran mit der RNA nach oben auf das Whatman-Papier gelegt und in eine Plastikfolie eingeschweißt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 55 °C im Hybridisierungsöfen. Daraufhin wurde die Membran mit DEPC-ddH₂O gespült und mit einer ^{32}P markierten Sonde zur Detektion von kleinen RNAs hybridisiert (vgl. 3.2.26).

3.2.25 Quantifizierung von Northern Blots

Die Pixelintensitäten einzelner Northern Blot Banden wurden mit der Multi Gauge V 3.2-Software (Fujifilm) bestimmt und das Hintergrundsignal subtrahiert. Anschließend wurden die Werte für das Signal und die dazugehörige Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (Signal/Ladekontrolle) und der Quotient in der Regel auf den AX2 Wildtyp normiert.

3.2.26 Hybridisierung von Membranen mit ^{32}P markierten Sonden

Bevor eine Membran mit gekoppelten Nukleinsäuren mit einer ^{32}P markierten Sonden inkubiert wurde, fand eine Prähybridisierung mit Church-Puffer (Church et al. 1984) bei 42 °C für 60 min im Hybridisierungsöfen statt. Im Anschluss daran wurde die ^{32}P markierte Sonde dazugegeben. Es schloss sich eine Inkubation bei 42 °C über Nacht im Hybridisierungsöfen an. Daraufhin wurde die Sonde entfernt und die Membran 30 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS, 20 min mit 1 x SSC/0,1 % SDS und 10 min mit 0,5 x SSC/0,1 % SDS gewaschen.

3.2.27 Detektion von ^{32}P markierten Sonden

Zur Detektion von ^{32}P markierten Nukleinsäuren auf einer Membran wurde diese in eine Folie eingeschweißt und auf einen Phosphoimager-Screen gelegt. Nach einer ausreichend langen

Expositionszeit wurde der Screen mit dem Imager (FujiFilm FLA 7000) ausgelesen. Die Bildbearbeitung und die Quantifizierung von Banden erfolgten mit dem Programm Multi-Gauge.

3.2.28 Stripping von Northern Blots

Um alte ^{32}P markierte Sonden von einer Nylonmembran zu entfernen, wurde diese 3-mal für 20 min mit *Stripping*-Puffer (0,1 x SSC, 1 % SDS) bei 80 °C im Hybridisierungssofen inkubiert.

3.2.29 Gelfiltration

Um radioaktive Nukleotide von DNA-Fragmenten abzutrennen, wurden Sephadex®G50 Säulen verwendet. Dazu wurde der Boden einer 1 mL-Einmalspritze zunächst mit Glaswolle verschlossen und mit Sephadex®G50 bis zum oberen Rand befüllt. Die Sephadex®G50 Säule wurde in ein 15 mL Falcon gestellt und 1 min bei 400 rcf gepackt. Anschließend wurde der zu filtrierende Ansatz (Mindestvolumen 100 µL) auf die Säule gegeben. Es schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 400 rcf an. Die DNA-Fragmente befanden sich im Durchfluss, während Nukleotide in der Sephadex®G50 Matrix zurückgehalten wurden.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Fraktionierung in Cytoplasma und Nucleoplasma zur Isolation von Proteinen

Die Zellyse von 1×10^8 Zellen zur Fraktionierung von Cytoplasma und Zellkernen erfolgte wie unter 3.2.15 beschrieben, außer dass der Zellysepuffer mit einer halben Tablette eines Protease Inhibitor Cocktails (cOmplete, Mini, EDTA-frei (Roche)) versetzt wurde. Die pelletierten Kerne wurden in 50 µL 1 x PBS resuspendiert und mit 50 µL 2 x Lämmli-puffer versetzt (Kernfraktion). Die Proteine der cytoplasmatischen Fraktion wurden durch Zugabe von TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % gefällt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis schloss sich eine 45-minütige Zentrifugation bei 15000 rcf/4 °C an, um die Proteine zu pelletieren. Das Pellet aus cytoplasmatischen Proteinen wurde anschließend 4-mal mit 80 % eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet und in 20 µL 1 x PBS resuspendiert. Anschließend wurden 20 µL 2 x Lämmli-puffer dazu gegeben. Die Proben wurden daraufhin 10 min lang bei 94 °C erhitzt und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.3.2 Herstellung von Proteinlysat aus *D. discoideum* Zellen

Zur Herstellung von Proteinlysat aus *D. discoideum* wurde eine geeignete Anzahl an Zellen aus einer Schüttelkultur entnommen und 5 min bei 390 rcf/4 °C abzentrifugiert. Nachdem das Medium vollständig abgenommen wurde, wurden die Zellen in 2 x Lämmli-puffer (Laemmli 1970) resuspendiert, wobei 1 µL des Puffers zum Aufschluss von 5×10^4 Zellen verwendet wurde.

Schließlich wurden die Proben 10 min bei 95 °C gekocht und bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.3.3 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Laemmli 1970) werden Proteine ihrer Größe entsprechend innerhalb eines Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die Proteinproben wurden mit 2 x oder 10 x Lämmli-puffer versetzt, für 5-10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Auftrennung erfolgte durch eine diskontinuierliche Elektrophorese in acht bis zwölf prozentigen PAA-Gelen, die ihrerseits aus einem Trenn- und einem Sammelgel bestanden (vgl. Tab. 13). Der Gellauf erfolgte in Mini-PROTEAN® Tetra Cell Kammern von Biorad unter Verwendung von 1 x Proteingel-Laufpuffer bei 100-200 V.

Tab. 13: Komponenten eines SDS-Polyacrylamidgels. Exemplarisch sind die Angaben für ein 10%iges Trenngel gezeigt. Bei Trenngelen anderer Prozentigkeit wurden die Menge an Acrylamid/Bisacrylamid und die Wassermenge entsprechend angepasst.

Komponente	Sammelgel	Trenngel 10%
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	170 µL	2 mL
1 M Tris HCl pH 6,8	130 µL	-
1,5 M Tris HCl pH 8,8	-	1,3 mL
H ₂ O	680 µL ddH ₂ O	1,6 mL
10 % SDS	10 µL	50 µL
TEMED	1 µL	2 µL
APS (20 %)	10 µL	50 µL

3.3.4 Coomassie Färbung von Proteinen in PAA-Gelen

Zur Anfärbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde kolloidales Coomassie (Kang et al. 2002) verwendet. Die Gele wurden 5 min lang in heißem ddH₂O geschwenkt, bevor sie mit dem kolloidalen Coomassie überschichtet und über Nacht gefärbt wurden. Daraufhin wurde das kolloidale Coomassie entfernt und das PAA-Gel für 2-6 h in ddH₂O geschwenkt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

3.3.5 Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von Proteinkomplexen

Die Co-IP von Proteinkomplexen wurde in Anlehnung an ein in *D. discoideum* etabliertes Protokoll durchgeführt (Dubin et al. 2011). Insgesamt wurden 5 x 10⁸ Zellen verwendet, die durch Zentrifugation bei 390 rcf/4 °C geerntet wurden. Diese wurden 2-mal mit 40 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und schließlich in 10 mL 1 x PBS/5 mM DTBP aufgenommen und für 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. DTBP ist membranpermeabel und besitzt zwei Imidoester, die mit primären Aminen reagieren, sodass die Chemikalie als *Crosslinker* für

Proteine genutzt werden kann (Hand et al. 1962, Mattson et al. 1993). Anschließend wurden die Zellen mit 10 mL 1 x TBS gewaschen, bevor das Zellpellet in 8 mL Co-IP Lysepuffer resuspendiert wurde. Der Zellysepuffer wurde zuvor mit einer Tablette eines Protease Inhibitor Cocktails (cOmplete, Mini, EDTA-frei (Roche)) versetzt. Die Lyse wurde mit Hilfe eines Zellhomogenisierers (EMBL, Heidelberg unter Verwendung der 8,006 mm großen Kugel) unterstützt. Dazu wurde je 1 mL der Zellsuspension mit Hilfe von Einwegspritzen (1 mL Volumen) 20-mal durch die Kammer des Zellhomogenisierers gepresst. Im Anschluss daran wurden unlösliche Zellbestandteile durch zweimaliges Zentrifugieren bei 15.000 rcf/4 °C für 15 min pelletiert. Um Proteine zu entfernen, die an Sepharose binden, wurde ein *Preclearing* durchgeführt. Dazu wurde der Überstand mit 300 µL SephadexTM G50 versetzt, die zuvor in Co-IP Lysepuffer äquilibriert wurde. Das *Preclearing* wurde 30 min lang bei 4 °C auf dem Drehrad durchgeführt. Das Sephadex-Material wurde anschließend bei 2000 rcf für 3 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit 25 µL äquilibrierten GFP-Trap[®] Agarosebeads (Chromotek, (Rothbauer et al. 2008)) versetzt. Es schloss sich eine Inkubation bei 4°C für 90 min auf dem Drehrad an, sodass GFP-Fusionsproteine an die Matrix binden konnten (*Binding*). Die GFP-Trap[®] Agarosebeads wurden daraufhin 5-mal mit Co-IP Waschpuffer gewaschen, bevor sie schließlich in 80 µL 2 x Lämmli-puffer aufgenommen und 15 min lang bei 95 °C erhitzt wurden. Im Folgenden wurden präzipitierte Proteine durch SDS-PAGE (vgl. 3.3.3) und Western Blot (vgl. 3.3.6) nachgewiesen.

3.3.6 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots (Renart et al. 1979) wurden Proteine aus einem PAA-Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Towbin et al. 1979) übertragen. Durch den Einsatz von Antikörpern (Tab. 14) konnten daraufhin Zielproteine immunologisch nachgewiesen werden.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte entweder in einem Puffertank (*tank blot*-Verfahren) unter Verwendung des Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell Systems (Biorad) oder durch ein halbtrockenes Verfahren (*Semidry* Blot-Verfahren), bei dem die Blotapparatur FastBlot B34 (Biometra) zum Einsatz kam. Beim Aufbau des Blots wurden die Herstellerangaben berücksichtigt. Als Elektrodenpuffer wurde im ersten Fall *Tankblot*-Transferpuffer genutzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 250 mA und 100 V für 50 min. Im zweiten Fall wurde *Semidry*-Transferpuffer verwendet; der Transfer fand bei 100 mA/Gel für 45 min statt.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran 20 min lang mit einer Blockierlösung (5 % Milchpulver (w/v) in 1 x PBS) schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 1 x PBS 5 min lang gewaschen, bevor die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in 1 x PBS) über Nacht bei 4 °C stattfand. Daraufhin wurde die Membran

2-mal für 5 min mit 1 x PBS und einmal mit PBS-T gewaschen. Es schloss sich eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei RT an. Dieser war entweder an die alkalische Phosphatase oder an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die jeweils eine spezifische Detektionsreaktion katalysierten. Nachdem die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen wurde, wurde die entsprechende Nachweisreaktion durchgeführt.

Tab. 14: Eingesetzte Antikörper-Verdünnungen zum Nachweis von Proteinen im Western Blot

Antikörper	Verdünnung in 1 x PBS
Maus α alpha-Actinin 1 (AbpA)	1:10
Maus α CoroninA (CorA)	1:10
Maus α GFP	1:4
Maus α HA	1:5000
Maus α His-Tag	1:4
Maus α Porin (PorA)	1:20
Maus α SeverinA (SevA)	1:10
Ziege α Maus, AP konjugiert	1:10000
Ziege α Maus, HRP konjugiert	1:5000

Nachweis der Zielproteine mit Hilfe der alkalischen Phosphatase

Die Membran wurde mit AP-Puffer überschichtet und kurz darin geschwenkt. Schließlich wurden 35 μ L BCIP (25 mg/1 mL DMF) in 20 mL AP-Puffer gelöst und über die Membran gegeben. Zur Detektion der Zielproteine wurde die Membran 15 min bis 2 h inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Substratlösung abgenommen und gegen ddH₂O ausgetauscht. Die Membran wurde mit Hilfe des Intas Geldokumentationssystems fotografiert.

Nachweis der Zielproteine mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase

Zum Nachweis der Zielproteine wurde mit Hilfe des Kits Pierce™ ECL Western Blotting *Substrate* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben eine Substratlösung hergestellt und auf die Membran gegeben. Nachdem eine Schutzfolie über die Membran gelegt wurde, konnte ein Film aufgelegt werden, der nach einer geeigneten Expositionszeit entwickelt wurde. Zur Dokumentation wurde der Film eingescannt.

3.3.7 Quantifizierung von Western Blot

Mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health) wurden Banden auf einem Western Blot quantifiziert. In jeder Spur wurden die Intensität des Signals und der Ladekontrolle bestimmt und anschließend ins Verhältnis gesetzt (Signal/Ladekontrolle). Die durch ImageJ bestimmten Intensitäten korrelieren dabei mit dem Gehalt des angefärbten Proteins in der jeweiligen Bande. In der Regel wurden die errechneten Quotienten auf den AX2 Wildtyp normiert.

3.3.8 Zentrifugation zur Isolierung von Protein/Nukleinsäure-Partikeln

Durch eine Zentrifugation bei 100.000 rcf sollten Partikel, die Proteine und Nukleinsäuren enthalten, in der Pellet-Fraktion gesammelt werden. Dazu wurden 6×10^7 *D. discoideum* Zellen bei 390 rcf/4 °C pelletiert und einmal mit 10 mL Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin in 1 mL 1 x Homogenisierungspuffer aufgenommen. Zuvor wurde der 1,5 x Homogenisierungspuffer mit Soerensen Phosphatpuffer verdünnt und mit einer Tablette eines Protease Inhibitor Cocktails (cOmplete Mini, EDTA-frei (Roche)) pro 10 mL Puffer versetzt. Zu der Probe wurden anschließend noch 25 µL einer 10%igen NP40 Lösung gegeben. Die Lyse der Plasmamembran wurde mit Hilfe eines Zellhomogenisierers (EMBL, Heidelberg unter Verwendung der 8,006 mm großen Kugel) unterstützt. Die Zellsuspension wurde dazu 30-mal durch die Kammer des Zellhomogenisierers gepresst. Die homogenisierten Zellen wurden anschließend bei 1000 rcf/4 °C 3 min lang zentrifugiert, um größere, unlösliche Zellbestandteile und die intakten Kerne zu pelletieren. Je 175 µL des Überstandes wurden in drei Zentrifugenröhrchen (Polyethylen Tubes, 175 µL) pipettiert. Im Anschluss daran wurden die Proben für 30 min in der Ultrazentrifuge bei 100.000 rcf (Airfuge™, Air Driven), Beckmann Coulter) zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand der drei Zentrifugenröhrchen vorsichtig abgenommen und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Die Pellets wurden in je 175 µL 1 x Homogenisierungspuffer resuspendiert und ebenfalls in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vereinigt. Von jeder Fraktion wurden 60 µL abgenommen und mit 7 µL 9 x Lämmli-puffer versetzt. Die Proben wurden 8 min lang bei 95 °C gekocht und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Mit Hilfe einer SDS-PAGE (vgl. 3.3.3) und eines Western Blots (vgl. 3.3.6) konnten Proteine in der Pellet-Fraktion und im Überstand nachgewiesen werden. Das verbliebene Probenmaterial wurde genutzt, um Nukleinsäuren zu isolieren. Jede Fraktion wurde dazu mit 30 µL 10 % SDS versetzt und mit 200 µL ddH₂O auf ein Volumen von ca. 700 µL aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 55 °C mit Proteinase K (1 mg) und 30 min bei 37°C mit RNaseA (1 mg) verdaut. Im Anschluss daran wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt (vgl. 3.2.18) und der Überstand nach 3.2.19 gefällt. Die Nukleinsäuren wurden in einem Volumen von 50 µL ddH₂O aufgenommen.

3.3.9 Expressionsnachweis von 6xHis RbdB in *E. coli*

Um geeignete Bedingungen für die Expression von 6xHis RbdB Fusionsproteinen in *E. coli* zu definieren, wurde von einem *E. coli* Rosetta2 Klon, der am Vortag mit dem Plasmid pET-28a RbdB (cDNA) (vgl. 3.3.10) transformiert worden war, eine Vorkultur angeimpft. Bei dem verwendeten Anzuchtmedium handelte es sich um LB_{Amp, Kan}-Flüssigmedium. Am folgenden Tag wurden 200 mL LB_{Amp, Kan}-Flüssigmedium mit 2 mL der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde

solange schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie eine OD_{600} von 0,6 erreicht hatte. Die Hauptkultur wurde anschließend auf 9 Kolben á 20 mL verteilt. Je drei Kulturen wurden mit 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM IPTG induziert und die Proteinexpression bei verschiedenen Temperaturen, nämlich 16 °C, 22 °C und 37 °C durchgeführt. Nach 60 min, 120 min und 4 h wurde von jeder Kultur 1 ml abgenommen und die Zellen bei 5000 rcf/4 °C 10 min lang pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 50 µL 2 x Lämmli-puffer aufgenommen und bei 95 °C 10 min lang denaturiert. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE (vgl. 3.3.3) und Western Blot (vgl. 3.3.6) auf die Expression von 6xHis RbdB untersucht.

3.3.10 Expression rekombinanter dsRB-Domänen in *E. coli*

Für die Expression von rekombinanten dsRB-Domänen aus *D. discoideum* in *E. coli* wurden kompetente Rosetta2 Zellen mit dem Plasmid pMal-c2X dsRBD [RbdB] oder dem Plasmid pMal-c2X dsRBD [DrnB] (vgl. 2.17.2) wie unter 3.1.3 beschrieben, transformiert. Schließlich wurden 20 mL $LB_{Amp, Cam}$ -Medium (+0,2 % Glucose) mit den gewünschten *E. coli* Rosetta2 Klonen inokuliert. Am folgenden Tag wurden $LB_{Amp, Cam}$ -Medium (+0,2 % Glucose) mit 5 mL der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde schüttelnd bei RT bis zu einer OD_{600} von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,7 mM IPTG induziert und die Zellen für weitere 3 Stunden schüttelnd bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 4000 rcf/4 °C 20 min lang zentrifugiert und die trockenen Pellets bei -80 °C bis zur Aufreinigung der MBP-dsRBD Fusionsproteine aufbewahrt.

3.3.11 Aufreinigung rekombinanter MBP dsRB-Domänen aus *Escherichia coli*

Die induzierten Bakterienpellets (aus 500 mL Kultur) wurden in 40 mL MBP-Lysepuffer resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch eine French Press, wobei die Zellsuspension 2-mal mit großem Druck durch das Ventil des Gerätes gepresst wurde. Der Rohextrakt wurde anschließend bei 10.000 rcf/4 °C 20 min lang zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein frisches 50 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL Amylose-Matrix (New England Biolabs), die zuvor in MBP-Lysepuffer äquilibriert wurden, versetzt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte durch die Bindung des jeweiligen MBP-Fusionsproteins an die Matrix. Dazu wurde die Probe 2 Stunden bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Amylose-Beads mit den gebundenen MBP-Fusionsproteinen wurde durch Zentrifugation bei 2000 rcf/4 °C für 2 min am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Daraufhin wurden sie 4-mal mit je 10 mL MBP-Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Amylose-Beads mit 500 µL MBP-Elutionspuffer versetzt und 10 min lang darin inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 2000 rcf/4 °C für zwei Minuten wurde der Überstand abgenommen und in einem 1,5 mL

Reaktionsgefäß (Elution) aufbewahrt. Der Schritt wurde mit einer 5-minütigen Inkubationszeit wiederholt. Die beiden Elutionen wurden vereinigt und in einen nach Herstellerangaben behandelten Dialyseschlauch gefüllt. Die Elutionsfraktion wurde 3 h in Dialysepuffer 1 und über Nacht in Dialysepuffer 2 inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µL der Proteinlösung gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe des Proteins BSA in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (vgl. 3.3.4). Die Banden wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert. Dabei herrschte ein linearer Zusammenhang zwischen der BSA-Konzentration und der Intensität der jeweiligen Signale, sodass anhand dieser linearen Funktion die Konzentration des aufgereinigten Proteins (in µg) bestimmt werden konnte.

4 Ergebnisse

4.1 MiRNAs und ihre Prozessierung in *D. discoideum*

4.1.1 Proteine mit dsRB-Domänen in *D. discoideum*

Wie einleitend beschrieben, werden neben Proteinen der Dicer Familie auch solche, die in der Regel mehrere dsRBDs aufweisen, für die miRNA-Prozessierung in Tieren und Pflanzen benötigt (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009). In Protisten ist bisher nur wenig über die Biogenese dieser regulatorischen RNAs bekannt. Die Untersuchung der miRNA-Prozessierung in *D. discoideum* kann daher zu einem besseren Verständnis dieses Regulationsmechanismus beitragen und ist aufgrund der phylogenetischen Stellung des Modellorganismus auch aus evolutionärer Sicht interessant.

Durch die Klonierung und Sequenzierung kleiner RNAs konnten in *D. discoideum* erstmals zwei miRNAs identifiziert werden, deren Prozessierung von dem Dicer-Homolog DrnB abhängig war (Hinas et al. 2007). Ob für die Akkumulierung von ddi-miR-1176 und ddi-miR-1177 auch Proteine dsRBDs notwendig sind, war jedoch unklar. Um entsprechende Kandidaten in der Proteindatenbank von *D. discoideum* zu identifizieren, wurde eine BLAST-Suche durchgeführt. Allerdings wurden keine Proteine gefunden, die homolog zu HYL1, DGCR8, Pasha oder Loqs waren (Daten nicht gezeigt). Bei ihnen handelt es sich um bekannte dsRBPs, die an der miRNA-Prozessierung in Tieren oder Pflanzen beteiligt sind (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009). Daraufhin wurde die Datenbank InterPro (Hunter et al. 2012, Mitchell et al. 2015) genutzt, um alle in der Amöbe kodierten Proteine mit dsRBDs zu identifizieren. Es stellte sich heraus, dass der Wildtypstamm AX4 nur 10 davon besitzt (vgl. Tab. 15).

Tab. 15: Übersicht über die in AX4 kodierten Proteine mit dsRB-Domänen

Proteine mit dsRBDs wurden mit Hilfe der Datenbank InterPro (Hunter et al. 2012) identifiziert. In grau sind ribosomale Proteine und solche, die an der Translation beteiligt sind, dargestellt.

Accession	Proteinname	<i>D. discoideum</i> Datenbank
P27685	40 S ribosomal protein S2	DDB_G0293742 [rps2]
Q54CA5	ribosomal protein	DDB_G0293090
Q54IC8	Class I peptide chain release factor	DDB_G0288835 [prfB]
Q54RE7	peptide chain release factor 1	DDB_G0283175 [prfA]
Q552X5	putative uncharacterized protein	DDB_G0275735
Q55E25	uncharacterized protein	DDB_G0269426
Q55FS1	putative uncharacterized protein drnB	DDB_G0268410 [drnB]
Q869Z1	DEAD/DEAH box helicase	DDB_G0275313 [dhx9]
Q86L44	putative uncharacterized protein helF	DDB_G0294407 [helF]
Q95ZG5	uncharacterized protein	DDB_G0273051 [drnA-1]

Nicht weiter berücksichtigt wurden ribosomale Proteine und solche, die für die Translation benötigt werden. Bei zwei der verbliebenen Proteine handelte es sich um die Dicer-Homologe DrnA und DrnB. Die Proteine Helf und Dhx9 weisen neben den identifizierten dsRB-Domänen auch je eine Helikase-Domäne auf. Sie waren insofern interessante Kandidaten, als den Dicer Homologen in *D. discoideum* die mit einer RNA Helikase Aktivität assoziierten Domänen DEXDc und HELICc fehlen (Cerutti et al. 2006). Frühere Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass Helf nicht an der Prozessierung von miRNAs beteiligt ist (Moog 2011). Da ein *Knockout* des nukleären Proteins Dhx9 vermutlich letal ist, konnte nicht überprüft werden, ob sein Fehlen die miRNA-Prozessierung in *D. discoideum* beeinträchtigt (pers. Mitteilung von J. Kruse, Abt. Ribogenetics, Jacobs Universität Bremen).

Darüber hinaus konnten zwei weitere Proteine identifiziert werden, die je eine dsRBD zur Bindung doppelsträngiger RNA und sonst keine weiteren bekannten Domänen enthielten. Letzteres ist typisch für dsRBPs aus Tieren und Pflanzen, die an der Prozessierung von miRNAs beteiligt sind (vgl. Kapitel 1.4.2) Die entsprechenden Gene werden fortan als *rbdA* (DDB_G0275735) und *rbdB* (DDB_G0269426) bezeichnet. In Abb. 15 ist schematisch der Aufbau aller erwähnten Proteine gezeigt.

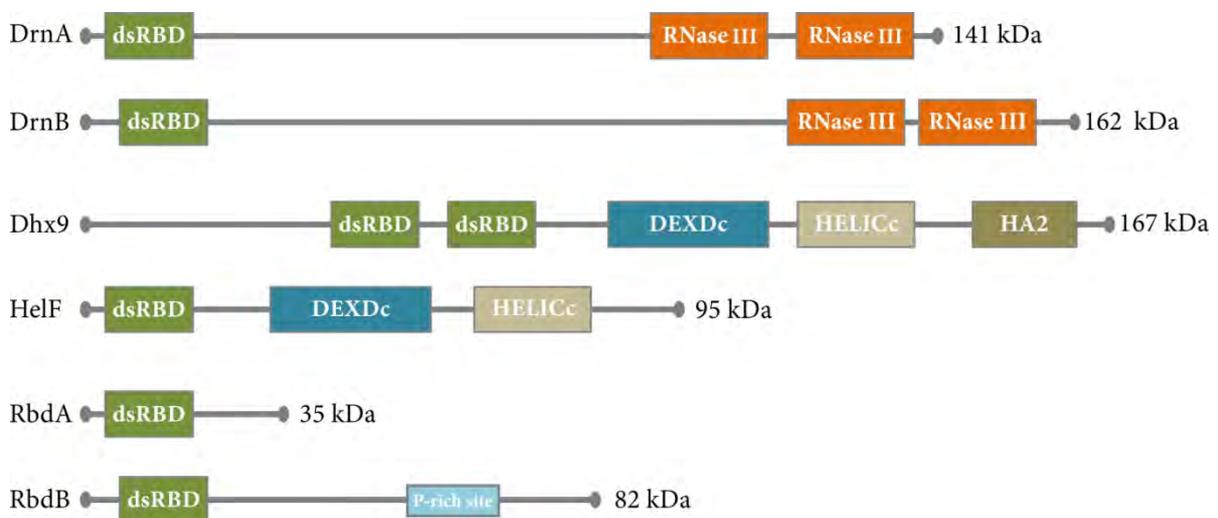


Abb. 15: Schematische Übersicht über Proteine mit dsRB-Domänen in *D. discoideum*

DrnA (1203 aa: dsRBD [5-72], RNase III (1) [890-1033], RNase III (2) [1081-1203]), **DrnB** (1385 aa: dsRBD [9-75], RNase III (1) [1059-1200], RNase III (2) [1230-1356]), **Dhx9** (1472 aa: dsRBD (1) [365-440], dsRBD (2) [532-607], DEXDc [715-903], HELICc [963-1069], HA2 [1132-1243]), **Helf** (837 aa: dsRBD [2-76], DEXDc [228-431], HELICc [608-687]), **RbdA** (297 aa: dsRBD [4-70]), **RbdB** (733 aa: dsRBD [9-75], P-rich site [511-584]). Die Zahlen in den eckigen Klammern geben die Position der Proteindomänen (Aminosäuresequenz) an. dsRBD (*double stranded RNA binding domain*), RNaseIII (*Ribonuclease III domain*), HELICc (*helicase superfamily c-terminal domain*), DEXDc (*Dead-like Helicases superfamily domain*), HA2 (*Helicase associated domain 2*), P-rich site (Prolin reicher Abschnitt). Die Position der Domänen wurde mit Hilfe der Datenbank SMART bestimmt (Schultz et al. 1998, Letunic et al. 2014).

Um zu untersuchen, ob RbdA und RbdB an der Prozessierung von miRNAs in *D. discoideum* beteiligt sind, sollten *Knockout*-Stämme generiert und das Expressionslevel bekannter miRNAs kontrolliert werden.

4.1.2 *Knockout* von *rbdA* und *rbdB* in *D. discoideum* AX2

Knockout-Konstrukte für die Anwendung in *D. discoideum* bestehen aus einer Blasticidin-Resistenzkassette mit flankierenden Sequenzen, die homolog zum Zielgen oder zu seinen benachbarten Bereichen sind (linker und rechter Arm). Transformiert man ein solches Konstrukt, dann führt ein Rekombinationsereignis in jedem Arm dazu, dass das Zielgen durch die Resistenzkassette unterbrochen oder ggf. teilweise bzw. komplett deletiert wird (Faix et al. 2004, Manis 2007, Wiegand et al. 2011). Tab. 16 gibt eine Übersicht über die Zielgene *rbdA* und *rbdB* und die angrenzenden Sequenzabschnitte.

Tab. 16: Übersicht über die Zielgene sowie *up-* und *downstream* gelegene, kodierende Sequenzen

Der Tabelle enthält relevante Angaben zur Position von *rbdA* und *rbdB* sowie der angrenzenden Gene im Genom. Die angegebenen Start- und Endpunkte entsprechen dem Start- bzw. dem Stopp-Codon des jeweiligen Gens, oder wie im Fall der tRNA, dem Start- und Endnukleotid des gespleißten Transkriptes. Die lokalen Koordinaten sind relativ zum ATG-Startcodon des Zielgens angegeben.

Accession	Gen- <i>Knockout</i>	Gen (<i>upstream</i>)	Gen (<i>downstream</i>)
Gen-Name	<i>rbdA</i>	<i>masA</i>	tRNA-Gln-UUG-9
Gen-ID	DDB_G0275735	DDB_G0275887	DDB_G0294955
Chromosom	2	2	2
chromosomale Koordinaten	5.905.995 bis 5.906.888	5.903.117 bis 5.904.832	5.908.030 bis 5.907.958
lokale Koordinaten	+1 bis +894	-2.879 bis -1.164	+2.036 bis +1.964
Gen-Name	<i>rbdB</i>	<i>gxcB</i>	<i>Pseudogen</i>
Gen-ID	DDB_G0269426	DDB_G0269424	DDB_G0270514
Chromosom	1	1	1
chromosomale Koordinaten	2.738.058 bis 2.740.498	2.736.502 bis 2.732.721	2.741.124 bis 2.742.151
lokale Koordinaten	+1 bis +2.441	-1556 bis -5337	+3066 bis +4093

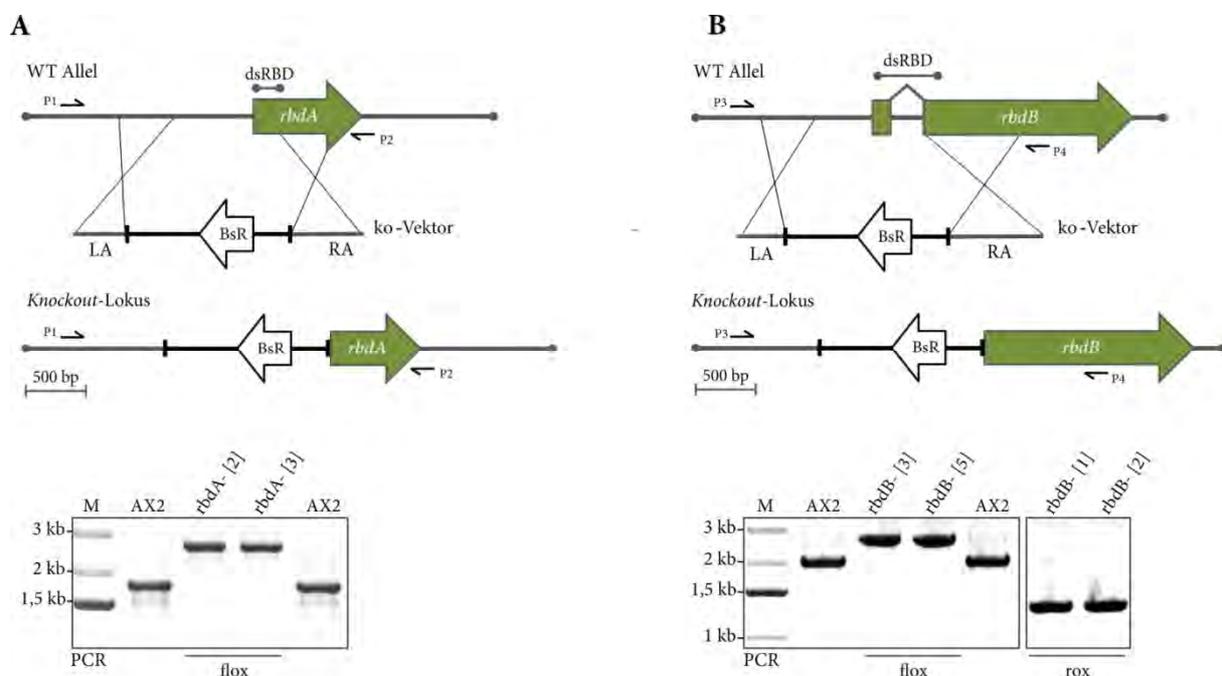
Um zu gewährleisten, dass von *rbdA* oder *rbdB* kein funktionelles Genprodukt mehr hergestellt werden kann, wurden die *Knockout*-Arme so gewählt, dass der jeweilige Promotor sowie die N-terminal gelegene dsRB-Domäne bei erfolgreicher Rekombination fast vollständig deletiert wurden (vgl. Tab. 17 und Abb. 16A). Im Fall von *rbdA* wurden 709 bp und im Fall von *rbdB* 865 bp deletiert. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, einen möglichst großen Abstand zu kodierenden Sequenzen benachbarter Gene einzuhalten, um deren Funktion nicht zu beeinträchtigen (vgl. Tab. 16 und Tab. 17).

Tab. 17: Verwendete *rbdA* und *rbdB* Knockout-Plasmide und ihre Knockout-Effizienz

In der Tabelle sind die verwendeten *Knockout*-Plasmide zur Herstellung von *rbdA*- und *rbdB*- Stämmen aufgeführt. Die Position der Arme ist relativ zum Startcodon des entsprechenden Zielgens angegeben. Anhand positiver Klone (Kontrolle durch PCR) wurde die *Knockout*-Effizienz bestimmt.

Gen-Knockout	Plasmid	linker Arm	rechter Arm	positive Klone	Effizienz
<i>rbdA</i>	pKOSG <i>rbdA</i> -	-999 bis -552	+157 bis +749	9/10	90 %
<i>rbdB</i>	pKOSG <i>rbdB</i> -	-883 bis -503	+362 bis +1.106	5/10	50 %

Die *Knockout*-Plasmide wurden jeweils in zwei unabhängigen Ansätzen in den AX2 wt transformiert. Im Fall des *rbdA* *Knockouts* wurden die Klone 2 [T1] und 3 [T2] und im Fall des *rbdB* *Knockouts* die Klone 3 [T1] und 5 [T2] für weitere Experimente verwendet, wobei T1 und T2 die beiden unabhängigen Transformationen angeben. Die richtige Integration der BsR-Resistenzkassette konnte mit Hilfe von PCR-Analysen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 16).

**Abb. 16: Nachweis von *rbdA* und *rbdB* Knockout-Mutanten mittels PCR.**

A, oben: Schematische und maßstabgerechte Darstellung des *rbdA* *Knockouts*. Gezeigt sind das Wildtyp-Allel und der *Knockout*-Lokus nach erfolgreicher Integration der BsR-Kassette. Dabei wurden Teile des Promotors und der dsRBD deletiert. Die Bindepositionen der Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet. Unten: PCR zum Nachweis von *rbdA* *Knockout*-Mutanten. Als Template diente gDNA aus den angegebenen Stämmen. Die Primer P1 (BB116) und P2 (BB117) generierten für *rbdA* *Knockout*-Mutanten ein Produkt von 2631 bp und für den AX2 ein Produkt von 1835 bp. **B**, oben: Schematische und maßstabgerechte Darstellung des *rbdB* *Knockouts* mit dem Wildtyp- und dem *Knockout*-Lokus. Auch hier wurden Teile des Promotors und der dsRBD deletiert. Die Pfeile geben die Bindepositionen der Primer an. Unten: PCR auf genomische DNA aus den angegebenen Stämmen zum Nachweis von *rbdB* *Knockout*-Mutanten unter Verwendung der Primer P3 (BB118) und P4 (BB119). Im AX2 Wildtyp lieferte die PCR ein Produkt von 2092 bp und im *Knockout* ein Produkt von 2730 bp. Die Entfernung der BsR-Kassette aus den *rbdB* *Knockout*-Mutanten konnte mit der gleichen PCR bestätigt werden. In diesem Fall wurde ein Produkt

von 1320 bp erwartet. Mit dem Zusatz *flox* werden Mutanten bezeichnet, in denen das Zielgen von einer BsR-Kassette mit *LoxP-sites* unterbrochen wurde. Nachdem die Kassette mit Hilfe der Cre-Rekombinase entfernt wurde, erhielten sie den Zusatz *rox*.

Zusätzlich wurden Southern Blots durchgeführt, die neben der erfolgreichen Integration der BsR-Kassette zeigten, dass das Konstrukt nicht an einer weiteren Stelle in das Genom integrierte (Daten nicht gezeigt). Die *Knockout*-Effizienz betrug im Fall von *rbdA* 90 % und im Fall von *rbdB* 50 % (vgl. Tab. 17).

Aus den beiden *rbdB*- Stämmen wurde die BsR-Resistenzkassette durch transiente Expression der Cre-Rekombinase vom Plasmid pDEX RH NLS-Cre entfernt (Faix et al. 2004). Je ein Klon wurde für weitere Experimente verwendet. Durch PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass die BsR-Kassette erfolgreich entfernt wurde (vgl. Abb. 16B). Die entsprechenden Stämme wurden fortan als *rbdB*- [1] und *rbdB*- [2] bezeichnet.

4.1.3 RbdB ist für die Prozessierung bekannter miRNAs relevant

Die *rbdA* und *rbdB* *Knockout*-Mutanten wurden im Folgenden auf molekulare Phänotypen in der miRNA Prozessierung hin untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus den *Knockout*-Stämmen und dem Wildtyp isoliert und das Expressionslevel der maturen miRNAs *ddi-miR-1176* und *ddi-miR-1177* durch Northern Blot Analysen bestimmt. Ihr Nachweis in *drnB* und *agnA* *Knockout*-Mutanten diente der Kontrolle. Es war bereits bekannt, dass sie im *drnB*- Stamm stark angereichert sind und im *agnA*- Stamm angereichert vorliegen (Hinas et al. 2007, Boesler 2012).

In den *rbdB*- Stämmen konnten keine reifen miRNAs nachgewiesen werden (vgl. Abb. 17). Sie zeigten den gleichen Phänotyp wie der *drnB*- Stamm, bei dem das für die miRNA Prozessierung relevante Dicer Homolog *DrnB* ausgeschaltet worden war (Hinas et al. 2007). Die Ergebnisse weisen also darauf hin, dass neben *DrnB* auch das Protein *RbdB* für die miRNA Prozessierung benötigt wird.

In den untersuchten *rbdA*- Stämmen war die miRNA Expression hingegen auf dem Niveau des Wildtyps (vgl. Abb. 17). Das Protein hat demnach keine Funktion bei der Generierung dieser Klasse an kleinen regulatorischen RNAs. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Untersuchungen die signifikante Anreicherung von maturen miRNAs im *agnA*- Stamm (Boesler 2012) reproduziert werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde kürzlich auch für den *rrpC*- Stamm gemacht, bei dem die RNA-abhängige RNA-Polymerase deletiert wurde (Avesson et al. 2012).

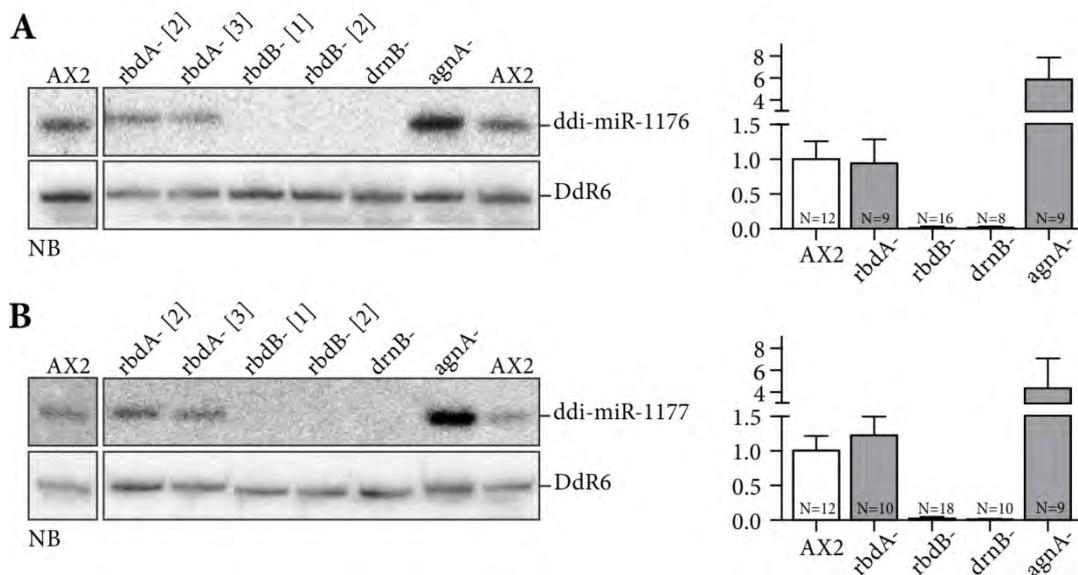


Abb. 17: Mature miRNAs in rbdA- und rbdB- Stämmen

Die Expression von ddi-miR-1176 (**A**, links) und ddi-miR-1177 (**B**, links) wurde anhand von Northern Blots in verschiedenen *Knockout*-Mutanten untersucht. Pro Spur wurden 12 µg Gesamt-RNA in einem 11%igen PAA Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion der 21 nt langen miRNAs erfolgte mit den ³²P markierten Oligonukleotiden #2601 (α Ddi-miR-1176) und #2602 (α Ddi-miR-1177). Der Nachweis der snoRNA DdR6 mit Hilfe des ³²P markierten Oligonukleotids #2654 diente als Ladekontrolle. Die Signale für ddi-miR-1176 (**A**, rechts) und für ddi-miR-1177 (**B**, rechts) wurden von verschiedenen Northern Blots quantifiziert, gegen das Signal für DdR6 referenziert und auf den AX2 Wildtyp (entspricht dem Wert 1) normalisiert. Fehlerbalken: Standardabweichung. Signifikanz: gepaarter t-Test. ddi-miR-1176: AX2/rbdB- $p < 0,0001$ (***), AX2/drnB- $p < 0,0001$ (***), AX2/agnA- $p < 0,0001$ (***). ddi-miR-1177: AX2/rbdB- $p < 0,0001$ (***), AX2/drnB- $p < 0,0001$ (***), AX2/agnA- $p = 0,0026$ (**).

4.1.4 Primäre miRNA Vorläufermoleküle akkumulieren in rbdB- Stämmen

Im Folgenden sollte näher untersucht werden, an welchem Schritt der miRNA Prozessierung RbdB beteiligt ist. Eine Akkumulierung von bestimmten miRNA Vorläufermolekülen im rbdB-Stamm ließe Rückschlüsse darauf zu, ob das Protein für die Prozessierung von pri-miRNA oder von pre-miRNAs benötigt wird: So hat der *Knockdown* des cytoplasmatischen dsRBD Proteins Loqs aus *Drosophila* eine Anreicherung von pre-miRNAs zur Folge (Forstemann et al. 2005), während in *Arabidopsis* Mutanten, denen das kernlokalisierte dsRBD Protein HYL1 fehlt, pri-miRNAs akkumulieren (Song et al. 2007).

Mit Hilfe von RT-PCRs konnte gezeigt werden, dass die primären Transkripte von ddi-miR-1176 und ddi-miR-1177 sowohl in rbdB- als auch in drnB- Stämmen angereichert waren (vgl. Abb. 18). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass beide Proteine an der Prozessierung der entsprechenden Vorläufermoleküle beteiligt sind.

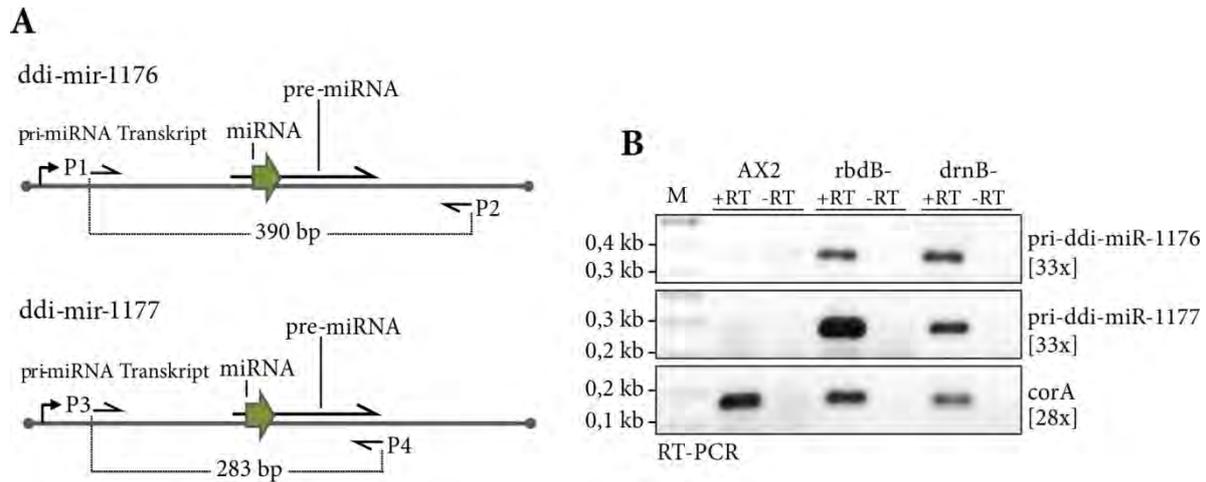


Abb. 18: Primäre miRNAs akkumulieren in rdbB- und in drnB- Stämmen

A: Schematische Abbildung der miRNA Gene von ddi-miR-1176 und ddi-miR1177. Die Pfeile repräsentieren die Primer, die für den Nachweis der primären Transkripte verwendet worden sind. Die RT-Reaktionen für pri-ddi-miR-1176 und pri-ddi-miR-1177 wurden mit den spezifischen Primern P2 (DM059) und P4 (DM083) durchgeführt. Die anschließende Amplifikation der cDNA erfolgte im Fall von pri-ddi-miR-1176 mit den Primern P1 (DM058) und (DM059) und im Fall von pri-ddi-miR-1177 mit den Primern P3 (DM082) und P4 (DM083). **B:** Semiquantitative Expressionsanalyse von pri-ddi-miR1176 und pri-ddi-miR1177 mittels RT-PCR in den angegebenen Stämmen. Als Kontrolle wurde eine RT-PCR auf *corA* unter Verwendung der Primer #1828/#1829 durchgeführt. Die erwarteten Amplifikate für den Nachweis von pri-ddi-miR-1176, pri-ddi-miR-1177 und *corA* haben eine Größe von 390 bp, 283 bp und 200 bp. Die in Klammern angegebenen Zahlen stehen für die Anzahl der PCR-Zyklen. In der Minus-RT Kontrolle traten bei der Amplifikation von ddi-miR-1176 im AX2 wt wiederholt Kontaminationen auf, die vermutlich auf einen unvollständigen DNaseI Verdau zurückzuführen sind.

Da die Prozessierung von primären miRNA Transkripten sowohl in Pflanzen als auch in Tieren im Nukleus stattfindet, sollte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen geklärt werden, ob RdbB ebenfalls im Kern von *D. discoideum* lokalisiert.

4.1.5 RdbB lokalisiert in diskreten nukleären Spots

In Tieren wird die pri-miRNA im Nukleus durch einen Komplex bestehend aus Drosha und einem dsRNA bindenden Protein zur pre-miRNA prozessiert (Lee et al. 2003, Denli et al. 2004, Han et al. 2004). Durch die Aktivität von Dicer und einem weiteren dsRNA bindenden Protein entstehen daraus im Cytoplasma mature miRNA/miRNA*-Duplexe (Hutvagner et al. 2001, Chendrimada et al. 2005). In Pflanzen finden beide Schritte der miRNA Prozessierung im Nukleus statt. Dafür sind drei Proteine essentiell: das Dicer Homolog DCL1, das dsRNA bindende Protein HYL1 und das Zinkfingerprotein SE (Dong et al. 2008). All diese Proteine lokalisieren in distinkten subnukleären Strukturen, die als *D-Bodies* bezeichnet werden (Fang et al. 2007).

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse sollte die Lokalisation von RdbB in *D. discoideum* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden RdbB GFP Fusionsproteine ektopisch in

D. discoideum exprimiert. Dazu wurde das Gen für *rbdB* in das integrierende *high copy* Plasmid pDneo2a GFP (Dubin et al. 2010) sowie in den extrachromosomalen Vektor pDM323 (Veltman et al. 2009) kloniert (vgl. 2.17.2) und in den AX2 wt und den *rbdB*- Stamm transformiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Western Blot kontrolliert (Daten nicht gezeigt), bevor die Zelllinien fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. Unabhängig vom Ausgangsstamm und dem verwendeten Plasmid exprimierten ca. 90 % der Zellen RbdB GFP. Da die subzelluläre Lokalisation des Proteins in den Stämmen gleich war, werden die Ergebnisse exemplarisch für den Stamm AX2 pDneo2a RbdB GFP gezeigt (vgl. Abb. 19).

In fixierten Präparaten war RbdB GFP diffus im Nukleoplasma verteilt und in diskreten, nukleären Spots am Rande des Zellkerns angereichert. Diese waren mit den Nukleoli der Zelle assoziiert. Oftmals war neben diesen Spots eine leichte Anreicherung des Proteins in den gesamten Nukleoli zu beobachten (vgl. Abb. 19A). Bei einigen Zellen war die Färbung der Nukleoli zum Teil so stark, dass keine distinkten Foci mehr identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Der Nukleolus in *D. discoideum* ist mit der inneren Kernhülle assoziiert und besteht aus zwei bis vier abgegrenzten Bereichen (Kawashima et al. 1979, Maclean et al. 1984), die nicht von DAPI gefärbt werden (Moerman et al. 1998). Um eine bessere Auflösung der subnukleären Strukturen zu erzielen, wurde ein Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung (OptiGrid Technologie) verwendet. Bei der Überlagerung des GFP- und des DAPI-Signals wurde deutlich, dass RbdB-GFP in Nukleoli-assoziierten Spots lokalisierte, die nicht oder nur sehr schwach mit DAPI angefärbt werden konnten (vgl. Abb. 19, B-C). Diese subnukleären Strukturen haben Ähnlichkeiten zu den pflanzlichen *D-Bodies*, die häufig an der Peripherie der Nukleoli zu finden sind (Song et al. 2007).

Das Protein DrnB war ebenfalls in distinkten Foci am Rande des Zellkerns angereichert (Dubin et al. 2010). Zudem haben unabhängige Untersuchungen gezeigt, dass RbdB und DrnB in diesen Nukleoli-assoziierten Strukturen co-lokalisierten (Kruse 2014, Zenk 2014).

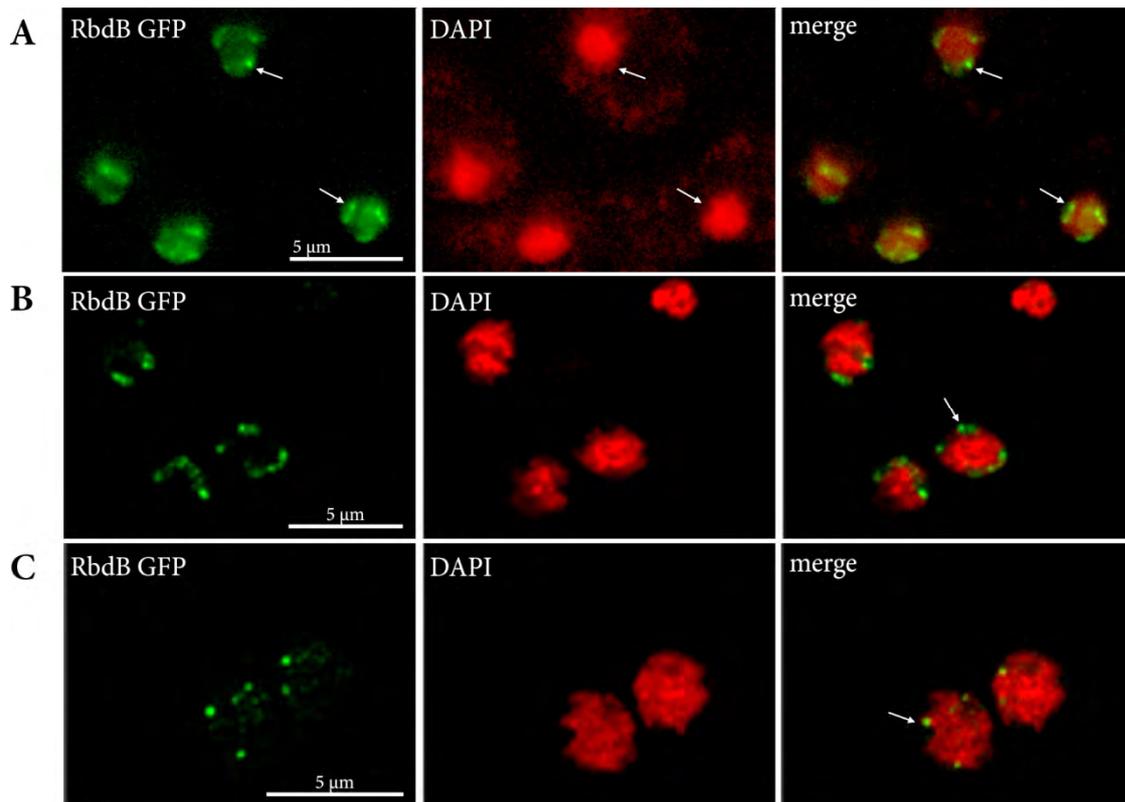
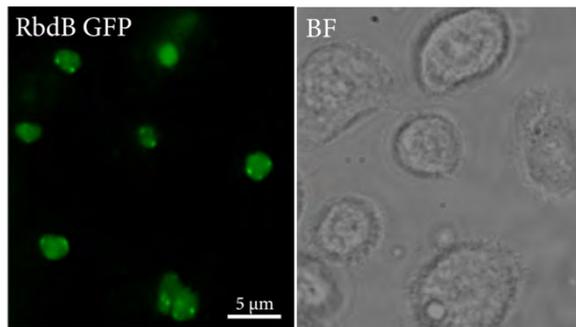


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von RbdB GFP

Zellen des Stammes AX2 pDneo2a RbdB-GFP wurden mit Methanol (MeOH) fixiert und die chromosomale DNA mit DAPI gefärbt. Die Expositionszeiten, mit denen die Bilder aufgenommen wurden, betragen 700-900 ms (GFP) und 40 ms (DAPI). Merge: Überlagerung der ersten beiden Bilder (GFP und DAPI). **A:** Repräsentativer Ausschnitt von Zellen, die RbdB GFP exprimierten. Das Protein lokalisierte diffus im Zellkern und wies am Rand subnukleäre Anreicherungen auf, die mit den Nukleoli assoziiert waren (Pfeile). **B, C:** Zur besseren Darstellung der subnukleären Strukturen wurden die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit Hilfe eines OptiGrid Mikroskops (Leica DM 5500) durchgeführt. Die Nukleoli waren aufgrund der fehlenden DAPI-Färbung insbesondere in der Überlagerung gut zu erkennen. Die diskreten Nukleoli-assoziierten Spots von RbdB GFP traten am Rande des Zellkerns deutlich hervor (Pfeile).

Im Zuge der Fixierung von *D. discoideum* Zellen konnte in der Vergangenheit für manche überexprimierte Kernproteine eine unspezifische Anreicherung in den Nukleoli beobachtet werden. Um einen Fixierungsartefakt auszuschließen, wurden lebende Zellen des Stamms rbdB-pDM323 RbdB GFP fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Auch in lebenden Zellen war das Fusionsprotein diffus im Nukleoplasma verteilt. Die distinkten Foci am Rande des Zellkerns waren ebenfalls zu erkennen (Abb. 20). Eine leichte bis starke Anreicherung der gesamten Nucleoli konnte im Vergleich zu den fixierten Präparaten allerdings nur sehr selten beobachtet werden.

Abb. 20: Subzelluläre Lokalisation von RbdB GFP in lebenden Zellen

Lebende Zellen wurden in *Low Fluorescence Axenic Medium* mikroskopiert. Links: Phasenkontrastbild lebender Zellen. Rechts: Das GFP Signal wurde mit einer Expositionszeit von 1,5 s aufgenommen. Das Bild zeigte eine diffuse Lokalisation von RbdB GFP im Nukleoplasma und distinkte Foci am Rande des Zellkerns.

4.1.6 RbdB hat ein C-terminales Kern-Lokalisationssignal

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass RbdB GFP Fusionsproteine ausschließlich im Kern von *D. discoideum* lokalisierten und angereichert in Nukleoli assoziierten Spots vorlagen. Darüber hinaus war bekannt, dass eine verkürzte Variante des RbdB-GFP Proteins, bei der die C-terminalen Aminosäuren 504-733 der RbdB deletiert wurden, nicht mehr vorherrschend im Kern lokalisierte. Eine weitere Deletionsvariante, bei der lediglich die Aminosäuren 503-612 des RbdB-Proteins fehlten, zeigte hingegen die gleiche Lokalisation wie das Volllänge RbdB GFP Fusionsprotein (Buttlar 2013). Diese Beobachtungen legten nahe, dass im Bereich der Aminosäuren 612-733 ein Kernlokalisierungssignal (NLS) vorhanden ist.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden verschiedene Programme zur Identifikation von putativen NLS-Sequenzen verwendet. Es handelte sich um den cNLS Mapper (Kosugi et al. 2009), um NLStradamus (Nguyen Ba et al. 2009) und um WoLF PSORT (Horton et al. 2007). Unter Verwendung der jeweiligen Standardeinstellungen identifizierte lediglich der cNLS Mapper zwei sich überlappende Kernlokalisierungssignale im C-terminalen Bereich des Proteins (vgl. Abb. 21). Dem ersten zweiteiligen NLS (NLS1), das die Aminosäuren 643-660 umfasste, wurde ein Score von 10,5 zugewiesen. Das zweite NLS (NLS2) schloss vier weitere Aminosäuren mit ein (643-664) und erhielt einen Score von 7,6. Der Score korreliert mit der Stärke eines NLS, wobei ein Wert größer oder gleich acht darauf hinweist, dass ein Protein ausschließlich im Kern lokalisiert (Kosugi et al. 2009).

Importin α erkennt und bindet das zweiteilige NLS, das aus zwei Clustern von basischen Aminosäuren besteht, die in der Regel von zehn bis zwölf Aminosäuren getrennt werden (Lange et al. 2007). Daraufhin wird Importin β rekrutiert und der gesamte Komplex bestehend aus Importin α , Importin β und dem zu transportierenden Protein gelangt durch die Kernpore in den Nukleus (Gorlich et al. 1995).

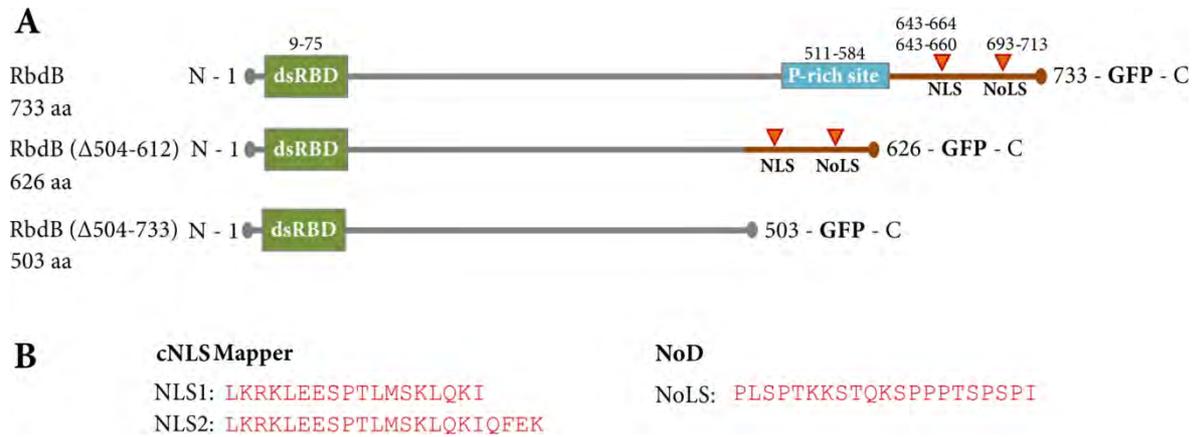


Abb. 21: Proteinstruktur von RbdB GFP Fusionsproteinen und abgeleiteten Deletionsvarianten sowie die Position vorhergesagter Lokalisationssignale. A: Proteinstruktur von RbdB GFP und den Deletionsvarianten RbdB (Δ504-610) GFP und RbdB (Δ504-733) GFP. Das Volllänge Fusionsprotein besitzt neben der dsRBD ein vorhergesagtes Sequenzmotiv (*P-rich site*), das reich an den Aminosäuren Prolin und Threonin ist (Mitchell et al. 2015). Dieses Motiv wurde in der Variante RbdB (Δ504-610) deletiert. Bei dem Protein RbdB (Δ504-733) GFP fehlte der komplette C-terminale Teil des Proteins, inklusive der Prich-*site* und der identifizierten NLS und NoLS Sequenzen. B: Aminosäuresequenz der Lokalisationssignale. Mit Hilfe von Vorhersage-Programmen konnten zwei überlappende NLS-Sequenzen (cNLS Mapper) und eine NoLS Sequenz (NoD) im C-terminalen Bereich des Proteins identifiziert werden (Kosugi et al. 2009, Scott et al. 2011), die in der zweiten RbdB Deletionsvariante fehlten.

Das folgende Muster stellt die typische Konsensus-Sequenz eines zweiteiligen NLS dar: (K/R) (K/R) X₁₀₋₁₂ (K/R)_{3/5} (Robbins et al. 1991). Das erste basische Cluster besteht aus zwei Aminosäuren, bei denen es sich entweder um Lysin (K) oder um Arginin (R) handelt, während das zweite Cluster durch fünf aufeinanderfolgende Aminosäuren charakterisiert ist, von denen mindestens drei ein Lysin oder ein Arginin darstellen. Die in RbdB identifizierten NLS-Sequenzen passen jedoch nicht in dieses klassische Muster, da jeweils das zweite basische Cluster die Bedingungen nicht erfüllt. Mittlerweile ist bekannt, dass Aminosäuren, die die beiden basischen Cluster trennen, Einfluss auf die Stärke eines NLS haben können: so gelten z.B. saure Aminosäuren wie Asparaginsäure (D) oder Glutaminsäure (E), die auch im *Linker* der vorhergesagten NLS-Sequenzen vorkommen, als aktivierend (Kosugi et al. 2008). Solche Aktivitätsprofile wurden durch den cNLS Mapper berücksichtigt (Kosugi et al. 2009).

Da RbdB nicht diffus im Zellkern lokalisierte, sondern in distinkten Nukleoli assoziierten Spots vorkam, wurde innerhalb der Sequenz von RbdB nach Signalsequenzen gesucht, die für die subnukleäre Lokalisation des Proteins verantwortlich sein könnten. Das Programm NoD detektiert nukleoläre Lokalisationssequenzen (NoLS) in eukaryotischen und viralen Proteinen und identifizierte eine solche Sequenz im C-terminalen Bereich von RbdB (Scott et al. 2011).

Um die Funktionalität der identifizierten Signalsequenzen zu untersuchen, wurde das längere NLS (NLS2, Aminosäuren 643-664), das die Sequenz des kürzeren NLS (NLS1, Aminosäuren 643-660)

vollständig umfasste, alleine oder in Kombination mit der NoLS Signalsequenz und dem endogenen *Linker* (Aminosäuren 643-713) an das C-terminale Ende eines GFP-Reportergens fusioniert. Nach der Transformation in den AX2 wt wurde die Expression mit Hilfe von Western Blots kontrolliert (Daten nicht gezeigt) und die Lokalisation der Reporterproteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

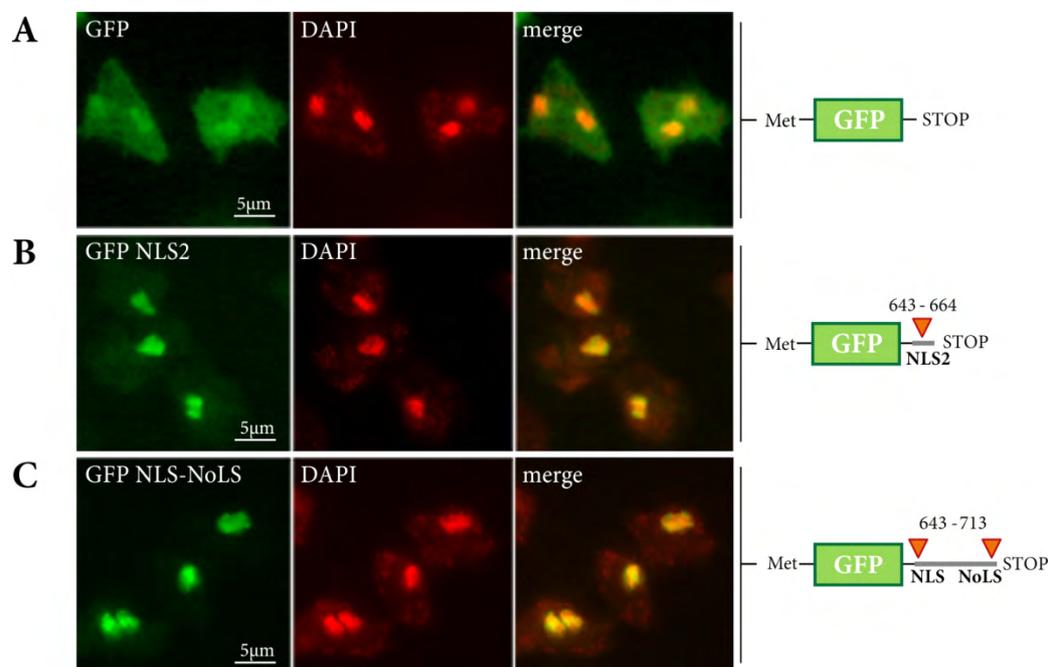


Abb. 22: Analyse vorhergesagter NLS und NoLS Signalsequenzen

Fluoreszenzmikroskopische Funktionsanalyse der vorhergesagten NLS und NoLS Sequenzen. Die NLS2 Sequenz (Aminosäuren 643-663) von RbDB und der Sequenzabschnitt 643-713, der die vorhergesagten NLS und NoLS Sequenzen enthält, wurde im Kontext des extrachromosomalen Plasmides pDM317 C-terminal an das Gen für GFP fusioniert. Die verschiedenen Konstrukte wurden in den AX2 wt transformiert, mit Formalin fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Expositionszeiten mit denen die Bilder aufgenommen wurden, betrugen je 700-900 ms (GFP) und 20 ms (DAPI). Neben den Fluoreszenzbildern ist schematisch das verwendete GFP-Konstrukt abgebildet. **A:** Als Kontrolle wurde die subzelluläre Verteilung von GFP im AX2 wt untersucht. Das Protein war diffus im Cytoplasma und im Nukleoplasma verteilt. **B:** Wenn die NLS2 Sequenz an das Gen für GFP fusioniert wurde, lokalisierte das Reporterprotein ausschließlich diffus im Nukleus. **C:** Wurde das Gen für GFP mit den NLS Sequenzen und der NoLS Sequenz fusioniert, akkumuliert das Reporterprotein nach wie vor im Kern der *D. discoideum* Zellen. Allerdings konnte keine Anreicherung in den Nukleoli oder in damit assoziierten Foci beobachtet werden.

In der Regel gilt, dass Proteine, die kleiner als 50 kDa sind, passiv in den Kern diffundieren können. Das trifft auf GFP selbst (ca. 30 kDa), als auch auf die Fusionsproteine GFP NLS2 (ca. 33 kDa) und GFP NLS NoLS (ca. 38 kDa) zu.

Wurde lediglich GFP vom extrachromosomalen Plasmid pDM317 (Veltman et al. 2009) in Zellen von *D. discoideum* exprimiert, so war das Protein im Cytoplasma und im Nukleoplasma verteilt (vgl. Abb. 22A). Die Aminosäuren 643-664 waren ausreichend, um das GFP-Reporterprotein

vollständig in die Kerne von *D. discoideum* einzuschleusen (Abb. 22B). Dies entsprach, was das kürzere NLS betrifft, der Vorhersage des cNLS Mappers (Kosugi et al. 2009). Der Unterschied zur Kontrolle, bei der GFP zu einem großen Anteil im Cytoplasma lokalisierte, war deutlich zu erkennen. Wurden die Aminosäuren 643-713 an GFP fusioniert, akkumulierte das Protein nach wie vor im Nukleoplasma der Zellen. Das Reporterprotein war zwar nicht von den Nukleoli ausgespart, jedoch konnte keine spezifische Anreicherung in diesen oder damit assoziierten Strukturen beobachtet werden (vgl. Abb. 22C). Gleiches gilt für das zuvor untersuchte Reporterkonstrukt GFP NLS2.

4.1.7 Das Serrate Homolog in *D. discoideum*

In *A. thaliana* wird neben DCL1 und HYL1 auch das Zinkfingerprotein Serrate für die miRNA Prozessierung benötigt (Lobbes et al. 2006, Yang et al. 2006). Es lokalisiert ebenfalls in subnukleären *D-Bodies* und interagiert dort mit DCL1 und HYL1 (Fang et al. 2007). Da DrnB und RbdB ebenfalls in nukleären Foci co-lokalisierten, sollte überprüft werden, ob das Serrate-Homolog in *D. discoideum* (Ostlund et al. 2010), dessen Proteinstruktur in Abb. 23A gezeigt ist und das fortan als SrtA bezeichnet wird, eine ähnliche Verteilung zeigt.

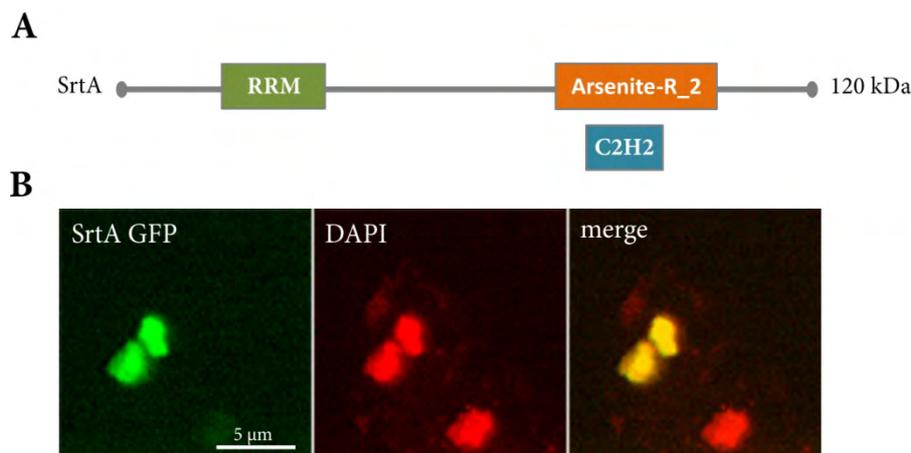


Abb. 23: SrtA lokalisiert diffus im Nukleoplasma

A: Proteinstruktur von SrtA aus *D. discoideum*. RRM: *RNA recognition motif domain*, Arsenite-R_2: *Arsenite-resistance protein 2*, C2H2: *Zinc finger domain* (Mitchell et al. 2015). **B:** Das Gen für SrtA wurde in den Vektor pDM323 kloniert und in den AX2 WT transformiert. Die Zellen, die SrtA GFP exprimierten, wurden mit MeOH fixiert und die subzelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Expositionszeiten betragen 900 ms (GFP) und 30 ms (DAPI). Merge: Überlagerung des GFP- und des DAPI-Bildes.

Dazu wurde das Gen in die GFP-Expressionsvektoren pDM323 und pDM317 (Veltman et al. 2009) kloniert (vgl. 2.17.2) und im AX2 wt exprimiert. Allerdings konnte durch fluoreszenzmikroskopische Analysen lediglich eine diffuse Verteilung der GFP Fusionsproteine im Nukleoplasma und keine subnukleären Anreicherungen nachgewiesen werden. Zudem waren die

Nukleoli ausgespart und SrtA zeigte folglich eine vollständige Überlagerung mit dem DAPI-Signal. Exemplarisch sind die Bilder für den Stamm AX2 SrtA GFP gezeigt (vgl. Abb. 23B).

Neben der subzellulären Lokalisation von Serrate sollte überprüft werden, ob der *Knockout* des Gens einen negativen Einfluss auf die miRNA Prozessierung hat. Allerdings ist es nicht gelungen, einen solchen Stamm zu generieren (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise handelt es sich um ein essentielles Gen, dessen Unterbrechung durch die BsR-Resistenzkassette letal ist. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe einer auf dem DIRS-1 Transposon basierenden *Knockdown*-Strategie (Friedrich et al. 2015) die Serrate-Expression reduziert. Zu diesem Zweck wurde ein Fragment des Gens als *Trigger* in den *Knockdown*-Vektor (vgl. 2.17.2) kloniert und in zwei unabhängigen Ansätzen in den AX2 wt transformiert. Die Produktion srtA spezifischer siRNAs wurde durch Northern Blot Analysen kontrolliert (vgl. Anhang A2). Daraufhin wurde die Expression bekannter miRNAs untersucht. Überraschenderweise waren die miRNAs ddi-miR-7097 (vgl. Anhang A2) und ddi-miR-1176 signifikant in srtA [RNAi] Stämmen angereichert, was exemplarisch für erstere gezeigt ist (vgl. Abb. 24). Um auszuschließen, dass der *Knockdown*-Vektor den beobachteten Phänotyp verursacht, wurde ein weiterer Stamm analysiert, bei dem die Expression des Actin bindenden Proteins (AbpA) ebenfalls mit Hilfe der DIRS-1 basierten Strategie reduziert wurde (Friedrich et al. 2015). Dieser Stamm zeigte jedoch keine Veränderungen in der miRNA-Expression (vgl. Anhang A2).

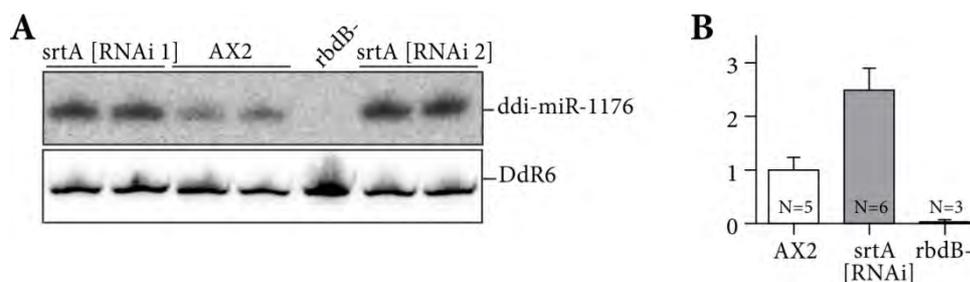


Abb. 24: Expression reifer miRNAs im srtA Knockdown-Stamm

A: Die Expression von ddi-miR-1176 wurde mit Hilfe eines Northern Blots im AX2 wt und in srtA *Knockdown*-Stämmen untersucht. Die Stämme srtA [RNAi 1] und srtA [RNAi 2] sind aus unabhängigen Transformationen des *Knockdown*-Vektors pDM304 ITR srtA fragment rITR entstanden. Als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus dem rbdB- Stamm. Der Nachweis von ddi-miR-1176 erfolgte mit einem ^{32}P markierten Oligonukleotid (#2601). Als Ladekontrolle wurde die snoRNA DdR6 mit Hilfe des ^{32}P markierten Oligonukleotids #2654 detektiert. **B:** Die Signale für ddi-miR-1176 wurden quantifiziert, gegen das Signal für DdR6 referenziert und auf den AX2 wt normalisiert. Fehlerbalken: Standardabweichung. Signifikanz: gepaarter t-Test. AX2/srtA [RNAi] $p < 0,0001$ (***)

4.1.8 Identifikation neuer miRNAs durch Illumina®-RNA-Sequenzierung

Die Hochdurchsatzsequenzierung ist mittlerweile eine gängige Methode, um kleine regulatorische RNAs in Pro- und Eukaryoten zu identifizieren (Dugar et al. 2013, Shi et al. 2013). Zu Beginn dieser Arbeit waren in *D. discoideum* lediglich zwei miRNAs bekannt, deren Akkumulierung von DrnB abhängig war (Hinas et al. 2007). Es stellte sich daher die Frage, ob die miRNA vermittelte Genregulation überhaupt ein verbreiteter Mechanismus in der Amöbe ist. Vor diesem Hintergrund sollte in einem *Deep Sequencing* basierten Ansatz nach weiteren putativen miRNAs gesucht werden.

Eine bewährte Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung kleiner regulatorischer RNAs ist es, Proben aus dem Wildtyp und aus verschiedenen RNAi-Mutanten zu analysieren, in denen kleine RNAs differentiell exprimiert sind (Lu et al. 2006). Da die bekannten miRNAs aus *D. discoideum* im agnA- Stamm angereichert (Boesler 2012) und im rbdB- Stamm stark reduziert waren (vgl. Abb. 17), konnte ein äquivalenter Ansatz angewendet werden.

Mit Hilfe der Illumina®-Technologie wurden kleine RNA-Moleküle (<400 nt) aus dem AX2 wt und aus den jeweiligen Mutanten sequenziert. Die Analyse der normalisierten *Reads* erfolgte anschließend mit dem *Integrated Genome Browser* (Nicol et al. 2009). Bei der Suche nach neuen miRNA-Kandidaten wurden verschiedene stringente Kriterien berücksichtigt (vgl. Tab. 18). Was typische miRNA-Kandidaten betrifft, so wurde Kriterium Nr. 4 nicht als notwendig angesehen, da man davon ausgeht, dass miRNA*-Moleküle in der Regel schnell abgebaut werden und daher schwer nachweisbar sind. Kriterium Nr. 6 wurde bereits als erfüllt angesehen, wenn putative miRNAs oder ihre *miRNA im agnA- Stamm nachweisbar waren.

Tab. 18: Kriterien zur Identifikation von miRNAs

In der Tabelle sind alle Kriterien aufgelistet, die zur Identifikation und Validierung neuer miRNAs aus *D. discoideum* angewendet wurden.

Kriterium	Beschreibung
1	Die RNAs weisen eine Länge von 20-24 nt auf.
2	Die relative Expression ist im agnA- Stamm mindestens 3-mal höher als im AX2
3	Die relative Expression ist im rbdB- Stamm mindestens 3-mal niedriger als im AX2
4	In relativer Nähe zur putativen miRNA liegt eine *miRNA-Sequenz
5	Die Mfold Analyse zeigt, dass die miRNA Sequenz innerhalb einer Haarnadelstruktur eingebettet ist.
6	Die putative miRNA ist im Northern Blot nachweisbar.

Parallel zu diesen Untersuchungen erschien ein Artikel, in dem bereits 15 neue miRNAs aus *D. discoideum* veröffentlicht wurden (Avesson et al. 2012). Dennoch konnte im Rahmen dieser

Arbeit der Pool an bestehenden miRNAs um einige Kandidaten erweitert werden, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tab. 19: Übersicht der identifizierten miRNA Kandidaten

In der Tabelle sind die neu identifizierte (kanonische und nicht-kanonische) miRNAs aufgelistet. Das exakte 5'- bzw. 3'-Ende ihrer Sequenz kann um einige wenige Nukleotide abweichen. Anhand der normalisierten *Read Counts* konnte die relative Expression ermittelt werden. nd = nicht detektierbar. Wenn miRNA-Duplexe nachweisbar waren, wurde jene Sequenz auf die mehr *Read Counts* entfielen, als miRNA definiert. Zum Vergleich sind die Daten der bekannten miRNAs ddi-miR-1176 und ddi-miR-1177 (Hinas et al. 2007, Avesson et al. 2012) ebenfalls gezeigt. In Anhang A3 sind die genauen Genom-Koordinaten der identifizierten miRNAs angegeben.

miRNA	Sequenz [nt]	Kriterien	relative Expression		
			AX2	rbdB-	agnA-
miRNA*					
bekannte miRNAs					
ddi-miR-1176	CCAAUUUUUAUCAAGGAAAGC	1,2,3,5,6	1	1/5	86
ddi-miR-1176*	nd		-	-	-
ddi-miR-1177	CCAGUUAGGGUUUAAUGGUUC	1,2,3,4,5,6	1	nd	12
ddi-miR-1177*	ACCGUUGAGCCCUUCUGAUU		1	nd	24
neu identifizierte (kanonische) miRNAs					
miRNA_can_D1	UCUUUCUCUAAUUUCAUUUAUU	1,2,3,4,5,(6)	1	nd	12
miRNA_can_D1*	AAAUGAAAUUAGAGAAAGGGAU		1	1/4	9
miRNA_can_D2	UUCUCGACAGACAUAGCAUUGG	1,2,3,5,6	1	1/5	94
miRNA_can_D2*	nd		-	-	-
ddi-miR-7097 ⁽¹⁾	TCTCTACTAGTGCCGAAATCA	1,2,3,4,5	1	1/5	43
ddi-miR-7097*	TTTGGCAGAAGTAGAGACGAA		1	1/2	50
miRNA_can_D3 ⁽²⁾	AUUAAUUUCGGCAGCCAUUU	1,2,3,4,5,6	1	nd	8
miRNA_can_D3*	UAUGGCUGCUGAAAUUAAUGUGG		1	nd	3
neu identifizierte (nicht kanonische) miRNA					
miRNA_non_can_D4	UCGAACUAGUCCAAUCUUUAAU	1,2,3,6	1	1	30
miRNA_non_can_D4*	nd		-	-	-

⁽¹⁾ Ddi-miR-7097 wurde in einer früheren Untersuchung, jedoch mit geringer Evidenz (drei *Reads* in der Hochdurchsatzsequenzierung, Einbettung in einer Haarnadelstruktur) identifiziert (Avesson et al. 2012). Im Rahmen der hier durchgeführten RNA-Illumina®-Sequenzierung waren ddi-miR-7097 und die vorhergesagte miRNA* durch eine weitaus höhere Anzahl an *Reads* repräsentiert. Ihre Expression und die Abhängigkeit von DrnB und RbdB konnte ferner durch Northern Blot Analysen bestätigt werden (vgl. Anhang A3).

⁽²⁾ Diese putative miRNA befindet sich in *antisense* Orientierung zu einem Intron innerhalb des ThugS-Elementes und ist mehrfach im Genom von *D. discoideum* kodiert (vgl. Anhang A3). Die Northern Blot- und Faltungsanalysen sind ebenfalls in Anhang A3 gezeigt. Kleine RNAs, die vom Thug-S Element abstammen konnten bereits durch Avesson et al. 2012 identifiziert werden, wobei sie zum größten Teil in Entwicklungsstadien von *D. discoideum* detektiert werden konnten.

⁽³⁾ Diese miRNA ist viermal im Genom des AX2 wt kodiert und in keiner typischen Haarnadelstruktur eingebettet (vgl. Anhang 3). Auffällig war, dass zwei Loci im Bereich der Telomere lagen. Basierend auf der Hochdurchsatzsequenzierung konnte keine Anreicherung dieser miRNA im rbdB- Stamm festgestellt werden. Northern Blot Analysen zeigten jedoch eine deutliche Reduktion sowohl im rbdB- als auch im drnB- Stamm, weshalb Kriterium Nr. 3 als erfüllt angesehen wurde.

In der folgenden Abbildung ist exemplarisch die Validierung hinsichtlich der Kriterien Nr. 4 und Nr. 5 für drei der in Tab. 19 aufgeführten miRNAs gezeigt. Dabei handelt es sich um zwei der kanonischen miRNAs, nämlich miRNA_can_D1 und miRNA_can_D2, und um die nicht kanonische miRNA miRNA_non_can_D4. Im Gegensatz zu den ersten beiden Kandidaten ist die nicht kanonische miRNA in keiner typischen Haarnadelstruktur eingebettet (vgl. Abb. 25A).

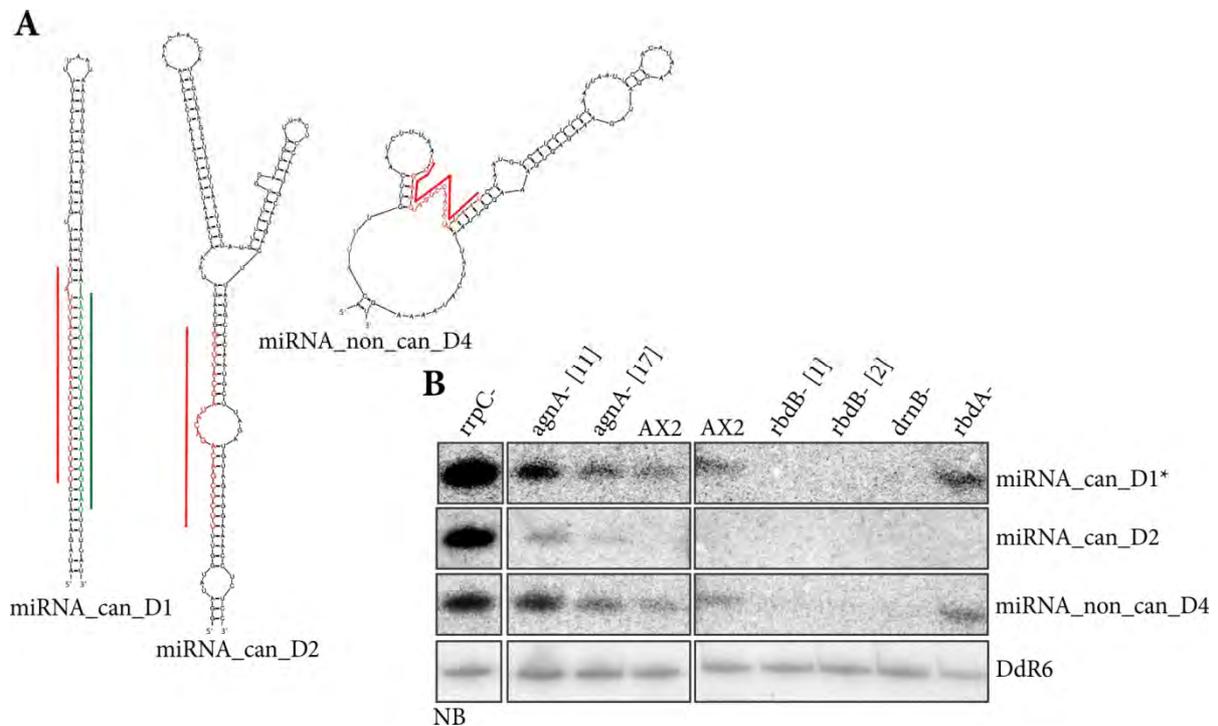


Abb. 25: Validierung der neu identifizierten miRNAs aus *D. discoideum*

Ausgewählte miRNA-Kandidaten wurden im Hinblick auf ihre *precursor*-Strukturen und ihre Expression im Northern Blot untersucht. **A:** Ausschnitte aus den *precursor* Strukturen der angegebenen miRNA Kandidaten, die mit dem Programm Mfold vorhergesagt wurden (Zuker 2003). Dabei bildeten lediglich die ersten beiden Kandidaten miRNA_can_D1* und miRNA_can_D2 eine typische Haarnadelstruktur aus. Die nicht kanonische miRNA (miRNA_non_can_D4) war nicht in einer solchen Sekundärstruktur eingebettet. Die Faltung ist exemplarisch für den Locus auf Chromosom 6 (Koordinaten 3669-3690) gezeigt. rot: miRNA, grün: miRNA* **B:** Gesamt-RNA wurden in einem 11%igen PAA Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis der miRNAs bzw. der *miRNAs erfolgte mit ³²P markierten Oligonukleotiden: DM122 (miRNA_can_D1*), DM123 (miRNA_can_D2), BB177 (miRNA_non_can_D4). Als Ladekontrolle diente die snoRNA DdR6, die mit dem ³²P markierten Oligonukleotid #2654 nachgewiesen wurde. Zwischen den einzelnen Hybridisierungen wurden die Sonden vollständig von der Membran entfernt.

Im Fall von miRNA_can_D1 konnte lediglich die vorhergesagte miRNA* detektiert werden. Sie zeigte die typischen Expressionsunterschiede in den untersuchten RNAi-Mutanten und war folglich im rbdB- Stamm nicht detektierbar und im agnA- Stamm angereichert. Neben den agnA-Stämmen wurde die Expression der neu identifizierten miRNAs auch im rrpC- Stamm analysiert, in dem RNAs dieser Klasse ebenfalls stark angereichert vorliegen (Avesson et al. 2012). Gleiches

gilt für die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte miRNA_{can_D1}*. Was miRNA_{can_D2} betrifft, so war diese lediglich in agnA- und rrpC- Stämmen nachweisbar. Die nicht kanonische miRNA (miRNA_{non_can_D4}), die keine typische *Precursor*-Struktur aufwies, konnte neben den agnA- und rrpC- Stämmen auch im AX2 wt detektiert werden und zeigte insgesamt das für miRNAs typische Expressionsmuster (vgl. Abb. 25B). Im Gegensatz zu den Daten der Hochdurchsatzsequenzierung konnte eine deutliche Abreicherung im rbdB- Stamm festgestellt werden. Ihr Fehlen im drnB- Stamm zeigte weiterhin, dass Proteine der RNAi-Maschinerie, die für die Prozessierung typischer miRNAs verantwortlich sind, auch für die Akkumulierung dieser nicht kanonischen RNA benötigt werden.

4.1.9 Die Expression von RbdB-GFP Fusionsproteinen kompensiert den *rbdB Knockout*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die ektopische Expression von RbdB-GFP Fusionsproteinen in der *rbdB Knockout*-Mutante zu einem *Rescue* der miRNA-Prozessierung führt. Dies war eine notwendige Voraussetzung, um die Funktionalität von RbdB-Mutanten *in vivo* zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden zwei integrierende Vektoren kloniert, die das Gen für *rbdB* als Fusion mit einem C-terminalen GFP-*Tag* kodierten, nämlich pDneo2a RbdB GFP und pDbsr2a RbdB GFP (vgl. 2.17.2). Sie unterscheiden sich lediglich in der Resistenzkassette, die zur Selektion in *D. discoideum* verwendet wurde. Integrierende Plasmide mit einer Neomycin-Resistenzkassette (z.B. pDneo2a GFP) sind in ca. 100 Kopien im Genom vorhanden, während integrierende Vektoren, die eine Blasticidin-Resistenzkassette besitzen (z.B. pDbsr2a GFP), in ca. ein bis drei Kopien vorliegen (Nellen et al. 1985, Windhof et al. 2013). Auf diese Weise konnte die Expressionsstärke von RbdB GFP variiert werden. Die beiden Plasmide wurden jeweils in die beiden *rbdB*- Stämme [1] und [2] transformiert. Nach der Subklonierung wurden pro Transformation zwei Einzelklone für weitere Analysen verwendet, sodass insgesamt acht verschiedene *Rescue*-Stämme zur Verfügung standen. Die Expression der RbdB-GFP Fusionsproteine wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen untersucht. Ein Signal konnte nur in jenen Stämmen detektiert werden, die mit dem Plasmid pDneo2a RbdB GFP transformiert worden waren (vgl. Abb. 26A). Auffällig war, dass die RbdB GFP Fusionsproteine, die ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 109 kDa besitzen, im Gel bei einem Molekulargewicht von ~140 kDa migrierten. Die gleiche Diskrepanz konnte bei RbdB Fusionsproteinen beobachtet werden, die von extrachromosomalen Plasmiden oder mit einem anderen *Tag* exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Um einen besseren Eindruck von der Expressionsstärke der Transgene in den verschiedenen *Rescue*-Stämmen zu erhalten, wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt. Neben dem Wildtyp wurden je zwei Stämme untersucht, die RbdB GFP von einem Plasmid mit hoher bzw. mit

niedriger Kopienzahl exprimierten. Im Mittel zeigten jene *Rescue*-Stämme, die mit dem Plasmid pDbsr2a RbdB GFP transformiert worden waren, eine 10-mal stärkere *rbdB*-mRNA Expression als der AX2 wt. In *Rescue*-Stämmen, die Plasmide mit hoher Kopienzahl enthielten, war die Expression sogar 100-mal stärker (vgl. Abb. 26B).

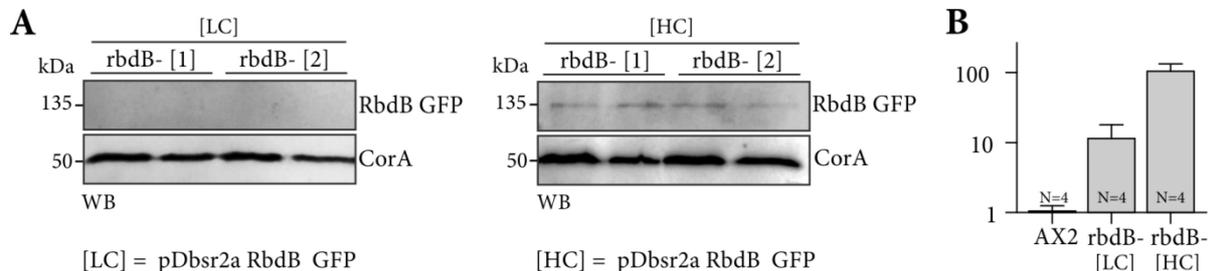


Abb. 26: Expression von RbdB GFP Fusionsproteinen in *rbdB*- Stämmen

A: Western Blots zum Expressionsnachweis von RbdB GFP Fusionsproteinen (aus Gesamt-Proteinlysate). Zur Detektion wurde ein GFP spezifischer Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente der immunologische Nachweis von CorA. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte über das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym AP. RbdB GFP konnte nur in den Replikaten des Stammes *rbdB*-pDneo2a RbdB GFP (*rbdB*- [HC]) detektiert werden. In den Replikaten des Stammes *rbdB*-pDbsr2a RbdB GFP (*rbdB*- [LC]) waren sie nicht nachweisbar. Die detektierten GFP Fusionsproteine migrierten höher (ca. 30 kDa) als das vorhergesagte Molekulargewicht von 109 kDa. **B:** Expressionsanalyse der *rbdB* mRNA mittels qRT-PCR im AX2 wt und in verschiedenen *Rescue*-Stämmen. Als Referenzgen diente *corA*. Die Primer-Sets DM108/DM109 und #1828/#1829 wurden zur Amplifikation der *rbdB* bzw. der *corA* mRNA verwendet. Für die Stämme *rbdB*- pDbsr2a RbdB GFP (*rbdB*- [LC]) und *rbdB*- pDneo2a RbdB GFP (*rbdB*- [HC]) wurden je zwei biologische und zwei technische Replikate vermessen. Beim AX2 wt handelte es sich um vier technische Replikate. Die relative Expression wurde auf den AX2 wt normalisiert (entspricht dem Wert 1) und aufgrund der besseren Übersichtlichkeit logarithmisch aufgetragen. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Daraufhin wurde die miRNA-Expression in den verschiedenen Stämmen mit Hilfe von Northern Blot Analysen untersucht. Es stellte sich heraus, dass diese in allen untersuchten Stämmen nachweisbar waren (vgl. Abb. 27C). Eine Quantifizierung unabhängiger Northern Blots ergab, dass das miRNA-Expressionslevel in den *Rescue*-Stämmen und im AX2 wt gleich war (vgl. Abb. 27D) und der *Knockout*-Phänotyp somit vollständig durch RbdB GFP Fusionsproteine kompensiert werden konnte. Die starke Überexpression hatte zudem keine Anreicherung der muren miRNAs zur Folge.

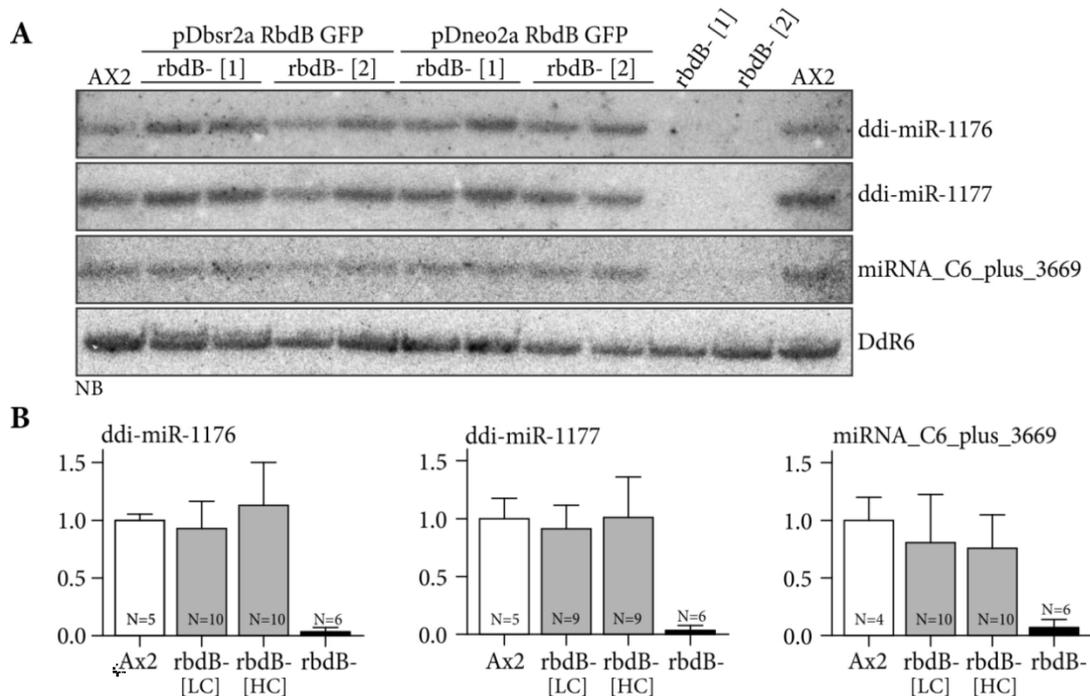


Abb. 27: In den RbdB *Rescue*-Stämmen kann die miRNA Prozessierung wiederhergestellt werden.

A: Northern Blots mit Gesamt-RNA zur Detektion von ddi-miR-1176, ddi-miR-1177 und miRNA_C6_plus_0003669 in den angegebenen *Rescue*-Stämmen. Der Nachweis erfolgte mit den ^{32}P markierten Oligonukleotiden #2601 (α ddi-miR-1176), #2602 (α ddi-miR-1177) und #2952 (α C6_plus_003669). Die Detektion der snoRNA DdR6 mit dem ^{32}P markierten Oligonukleotid #2654 diente als Ladekontrolle. **B:** Die Northern Blot Signale für die einzelnen miRNAs wurden gegen das Signal für DdR6 referenziert und relativ zum AX2 wt (entspricht dem Wert 1) aufgetragen. In die Auswertung gingen drei unabhängige Northern Blot Analysen ein. Die biologischen und technischen Replikate der *Rescue*-Stämme (rbdB- [LC], rbdB- [HC]) und der rbdB- Stämme sowie die technischen Replikate des AX2 wt wurden jeweils zusammengefasst. Zwischen dem Wildtyp und den *Rescue*-Stämmen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der miRNA-Expression.

4.1.10 Mutagenese konservierter Aminosäuren in der dsRBD von RbdB

Da RbdB GFP Fusionsproteine den mutanten Phänotyp in der miRNA Prozessierung retten konnten, sollten verschiedene Aminosäuren in der dsRB-Domäne mutiert werden, um ihre Bedeutung für die Funktion des Proteins *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden mittels *Overlap-Extension* PCR (vgl. 3.2.9) im Kontext des extrachromosomalen Expressionsvektors pDM323 verschiedene Mutationen in das *rbdB*-Gen eingefügt. Auf diese Weise entstanden die Plasmide pDM323 RbdB Y27A, pDM323 RbdB H36A und pDM323 RbdB K59A/K60A.

Der extrachromosomale Expressionsvektor wurde verwendet, weil er im Vergleich zu den integrierenden Plasmiden eine deutlich bessere Transformationseffizienz aufweist. Im Rahmen einer anderen Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die ektopische Expression von RbdB

GFP unter Verwendung von pDM323 den mutanten Phänotyp in der miRNA Prozessierung ebenfalls vollständig kompensiert (Buttlar 2013).

Bei den mutierten Aminosäuren handelte es sich um ein Tyrosin und ansonsten um die basischen Aminosäuren Histidin und Lysin, die jeweils in ein Alanin umgewandelt wurden und die innerhalb von Domänen zur Bindung von doppelsträngiger RNA konserviert sind (vgl. Abb. 28).

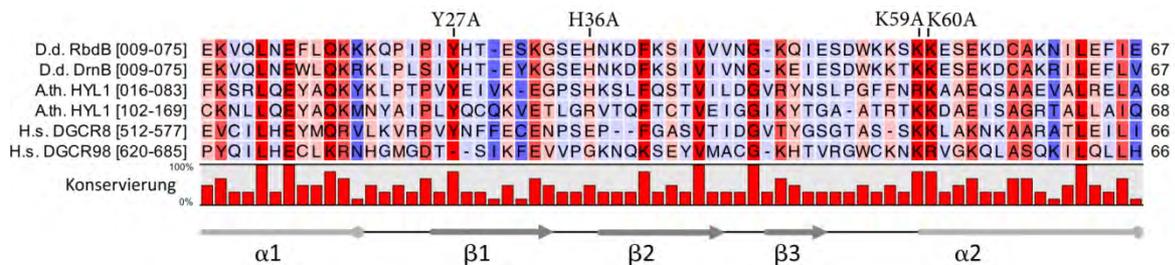


Abb. 28: Sequenz-Alignment verschiedener annotierter dsRB-Domänen

Die dsRBDs wurden mit Hilfe der Programme SMART oder Pfam identifiziert (Schultz et al. 1998, Punta et al. 2012). Die Domänen stammen von kernlokalisierten RNA bindenden Proteinen aus verschiedenen Organismen, die an der miRNA Prozessierung beteiligt sind. D.d.: *Dictyostelium discoideum*, A.th.: *Arabidopsis thaliana*, H.s.: *Homo sapiens*. Oben werden die Aminosäuren gezeigt, die im Gen von *rbdB* mutiert worden sind. Unten ist schematisch die Sekundärstruktur der dsRBD dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem CLC Sequence Viewer 7 erstellt.

Bevor die Funktionalität der mutierten RbdB-Varianten in der miRNA Prozessierung analysiert wurde, sollte ihre subzelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert werden. Dies erschien notwendig, da eine verkürzte Variante des DCL1-Proteins aus *A. thaliana*, in der eine der beiden dsRNA bindenden Domänen fehlte, nicht mehr in subnukleären *D-Bodies* lokalisierte (Fang et al. 2007).

Es stellte sich heraus, dass die Mutationen in der dsRNA bindenden Domäne von RbdB ebenfalls Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins hatten. Die mutierten Varianten waren überwiegend diffus im Nukleoplasma verteilt und akkumulierten kaum noch in Nukleoli-assoziierten Foci (vgl. Abb. 29). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen weisen aber auch darauf hin, dass die mutierten RbdB GFP Varianten nicht von den Nukleoli ausgespart sind. Die veränderte Lokalisation der Variante RbdB GFP K59A/K60 wurde bereits in früheren Untersuchungen erkannt (Zenk 2014) und konnte unabhängig davon reproduziert werden.

Trotz der eingefügten Mutationen und der leicht veränderten Lokalisation waren die RbdB GFP Fusionsproteine in der Lage, die miRNA Prozessierung im *rbdB Knockout*-Hintergrund zu retten: Jedes Konstrukt wurde je zweimal in die *Knockout*-Stämme *rbdB*- [1] und [2] transformiert, sodass pro Mutation insgesamt vier Stämme auf ihre miRNA Prozessierung hin untersucht werden konnten.

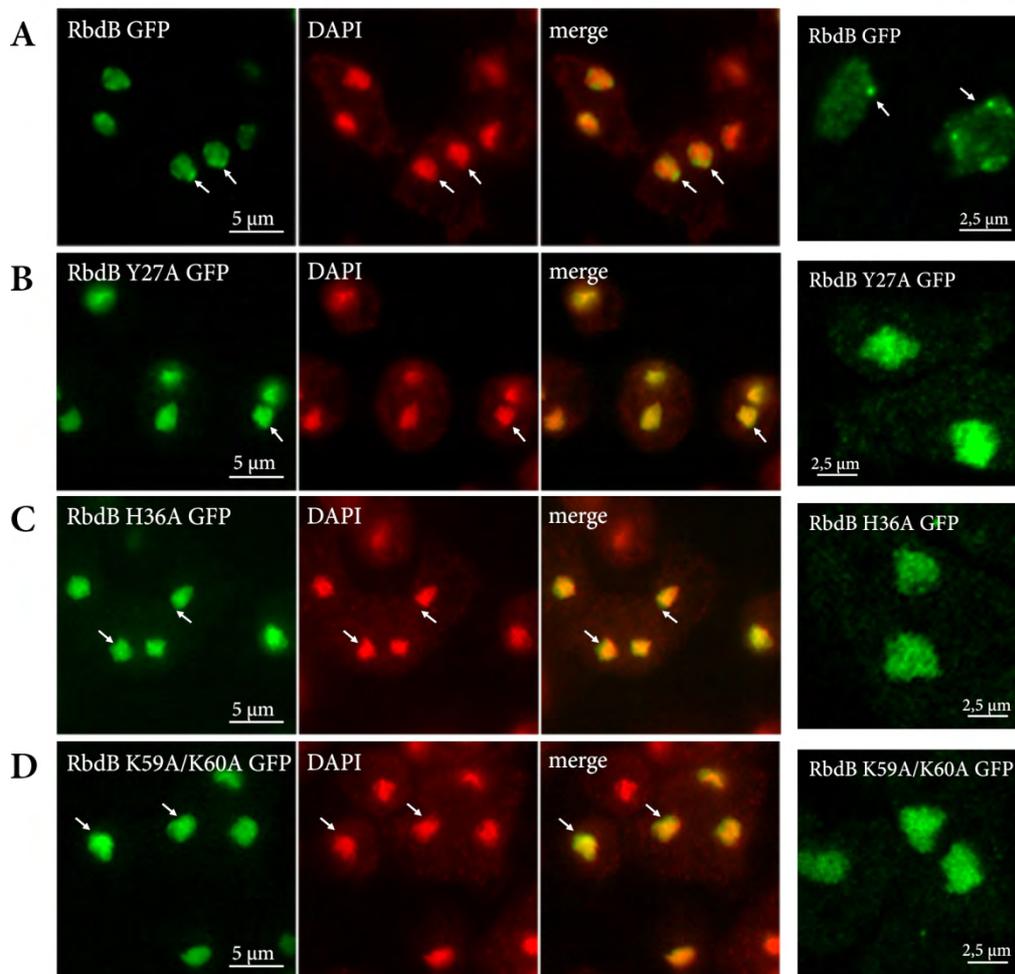


Abb. 29: Subzelluläre Lokalisation von RdbB-GFP Mutationsvarianten

Zellen der Stämme *rdB*- RdbB GFP (A), *rdB*- RdbB Y27A GFP (B), *rdB*- RdbB H36A (C) und *rdB*- RdbB K59A/K60A (D) wurden mit MeOH fixiert und die chromosomale DNA mit DAPI gefärbt. Die Expositionszeiten, mit denen die Bilder aufgenommen wurden, betrugen 900-1000 ms (GFP) und 40 ms (DAPI). Merge: Überlagerung der ersten beiden Bilder (GFP und DAPI). Die mutierten RdbB GFP Varianten lokalisierten diffus im Nukleoplasma; die Proteine zeigten zum überwiegenden Teil keine Anreicherungen in subnukleären Strukturen. Allerdings waren die Nukleoli auch nicht ausgespart (Pfeile in B-D). Im Vergleich dazu sind die distinkten Nukleoli assoziierten Foci am Rande der Kerne in einem *Knockout*-Stamm, der die wildtypische Variante von RdbB als GFP-Fusion exprimiert (A), gut zu erkennen (Pfeile). Die letzten Bilder einer jeden Zeile (A-D) wurden mit Hilfe eines CLSM aufgenommen. Die vergrößerte Darstellung der Kerne mit diesem Mikroskop hebt die Unterschiede in der subnucleären Lokalisation nochmal deutlich hervor.

Northern Blot Analysen zeigten, dass die miRNA *ddi-miR-1176* in allen putativen *Rescue*-Stämmen das gleiche Expressionsniveau wie im AX2 wt erreichte (vgl. Abb. 30). Im Gegensatz dazu war die miRNA Prozessierung in *D. discoideum* beeinträchtigt, wenn *DrnB* durch die Deletion des NLS zwar noch im Kern aber nicht mehr in den Nukleoli-assoziierten Foci lokalisierte (Kruse 2014).

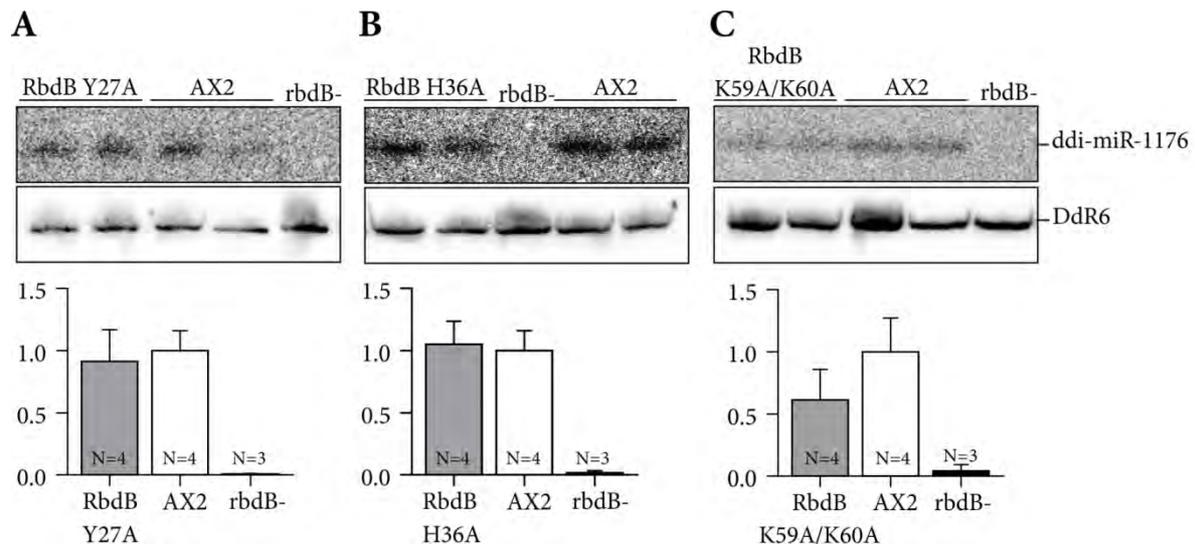


Abb. 30: Komplementierung der miRNA Prozessierung durch die Expression von mutierten RbdB-GFP Fusionsproteinen im rbdB- Stamm

Oben: Northern Blots mit Gesamt-RNA aus den Stämmen rbdB- RbdB Y27A GFP (A), rbdB- RbdB H36A GFP (B) und rbdB- RbdB K59A/K60A (C) zur Expressionsanalyse von ddi-miR-1176. Die miRNA wurde mit einem ^{32}P markierten Oligonukleotid (#2601) detektiert. Als Ladekontrolle wurde die snoRNA DdR6 (#2654) nachgewiesen. Von den vier biologischen Replikaten sind exemplarisch zwei gezeigt. Als Kontrolle wurde RNA aus dem AX2 wt (technische Replikate) aufgetragen. Unten: Die miRNA Signale wurden quantifiziert, gegen die snoRNA DdR6 referenziert und schließlich auf den Wildtyp normalisiert. Fehlerbalken: Standardabweichung. Zwischen den *Rescue*-Stämmen, die auf der Expression mutierter RbdB GFP Fusionsproteine basieren und dem AX2 wt konnten keine signifikanten Unterschiede in der ddi-miR-1176 Expression festgestellt werden.

4.1.11 Expression von dsRB-Domänen in *E. coli*

Mit Hilfe von *in vitro* basierten Untersuchungen kann die Bindung von RbdB an verschiedene doppelsträngige RNA-Substrate charakterisiert werden. Dazu musste das Protein in *E. coli* exprimiert und in ausreichender Menge aufgereinigt werden. In einem ersten Ansatz wurde die *rbdB* cDNA in den Expressionsvektor pET-28a kloniert und auf diese Weise an ein N-terminal gelegenes 6xHis-Tag fusioniert (vgl. 2.17.2). Das Plasmid wurde in *E. coli* Rosetta2 Zellen transformiert und die Proteinexpression in verschiedenen Klonen untersucht, wobei die eingesetzte Menge an IPTG sowie die Dauer und die Temperatur der Expression variiert wurden. Eine robuste Expression konnte lediglich bei der Verwendung von 1 mM IPTG und einer vierstündigen Expression bei 16 °C oder 22 °C durch Western Blot Analysen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 31). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Protein im löslichen Überstand enthalten war (Daten nicht gezeigt). Dennoch konnte das rekombinante Protein nur unter denaturierenden Bedingungen (7 M Urea) aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt), weil vermutlich erst dann der 6xHis-Tag zugänglich war.

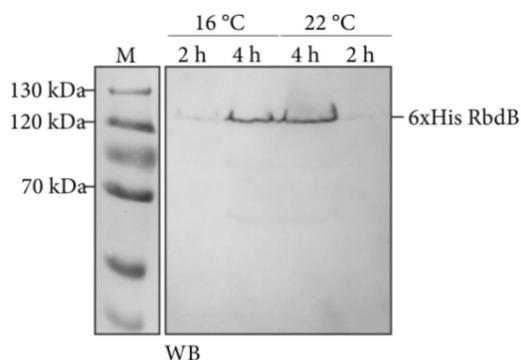


Abb. 31: Expression von His-RbdB in *E. coli*

Western Blot zum Nachweis von 6xHis RbdB in *E. coli*. Je 10 μ L Proteinlysate wurden pro Spur geladen. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert. Das beste Ergebnis war vier Stunden nach der Induktion nachweisbar, wobei die Proteinexpression entweder bei 16 °C oder bei 22 °C stattfand. Das erwartete Molekulargewicht von 6xHis RbdB lag bei 86 kDa. Das Fusionsprotein migrierte im Gel deutlich höher als erwartet.

Im Folgenden wurde RbdB als Fusion mit MBP in *E. coli* exprimiert. MBP ist mit einem Molekulargewicht von 42 kDa deutlich größer als der zuvor verwendete 6xHis-Tag. Es sollte getestet werden, ob das rekombinante Protein dadurch besser an die Affinitätsmatrix bindet und unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden kann. Allerdings wurde das Protein als MBP-Fusion bei einer Vielzahl getesteter Expressionsbedingungen sehr stark degradiert, sodass von einer Aufreinigung abgesehen werden musste (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde lediglich die dsRNA bindende Domäne von RbdB kloniert und in *E. coli* exprimiert. Da das Dicer-Homolog DrnB ebenfalls an der miRNA-Prozessierung beteiligt ist und über eine dsRB-Domäne verfügt (Cerutti et al. 2006, Hinas et al. 2007), sollte auch diese für vergleichende Analysen rekombinant hergestellt werden. Die dsRBDs wurden als MBP-Fusion in den Vektor pMAL-c2X kloniert und in Rosetta2 Zellen exprimiert. Für spätere Kontroll-Experimente wurde auch der MBP-Tag vom Leervektor exprimiert. Alle MBP-Fusionsproteine wurden über eine Amylose-Matrix aufgereinigt und dialysiert. Anschließend wurden sie gemeinsam mit einer BSA-Verdünnungsreihe in einem 12 % SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Ihre Konzentration konnte relativ zum BSA Standard bestimmt werden (vgl. Abb. 32).

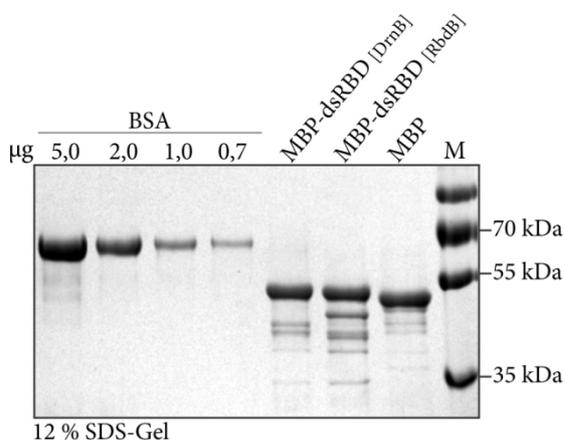


Abb. 32: Aufreinigung rekombinanter MBP-dsRBDs

SDS-PAGE zur Konzentrationsbestimmung rekombinant aufgereinigter Domänen zur Bindung von dsRNA. Sie stammen aus den in *D. discoideum* kodierten Proteinen DrnB und RbdB. Die MBP-Fusionsproteine haben eine Größe von 52 kDa. Für spätere Kontrollen wurde auch MBP (51 kDa inkl. der Linker-Sequenz bis zum Stopp-Codon) aus *E. coli* Zellen isoliert. Neben den angegebenen Mengen an BSA (69 kDa) wurden 2 μ L der jeweiligen Proteinlösung aufgetragen. M=Marker (PAGE-Ruler™ Plus Prestained).

Die Quantifizierung mit Hilfe von ImageJ ergab die in Tab. 20 angegebenen Proteinkonzentrationen:

Tab. 20: Größe und Konzentration der rekombinant aus *E. coli* aufgereinigten dsRBDs

Protein	Molekulargewicht	Konzentration	
MBP	51 kDa	0,9 µg/µL	17,65 pmol/µL
MBP dsRBD [DrnB]	52 kDa	1,1 µg/µL	19,23 pmol/µL
MBP dsRBD [RbdB]	52 kDa	1,1 µg/µL	19,23 pmol/µL

Die aufgereinigten Proteine wurden J. Kruse (Abt. Ribogenetics, Jacobs Universität Bremen) zur Verfügung gestellt, um damit RNaseIII [DrnB] abhängige Prozessierungsassays in Anwesenheit der verschiedenen dsRBDs durchführen zu können. Darüber hinaus können die aufgereinigten Proteindomänen in Zukunft genutzt werden, um ihre Bindung an dsRNA Substrate mit Hilfe von *Electro-Mobility-Shift Assays* (EMSAs) oder in *Atomic-Force-Microscopy* (AFM) basierten Untersuchungen zu analysieren.

4.1.12 Relevante und weiterführende Ergebnisse anderer Arbeiten

In diesem Abschnitt sollen relevante Ergebnisse anderer Arbeiten vorgestellt werden, die für die spätere Diskussion der miRNA-Prozessierung in *D. discoideum* von Bedeutung sind.

Wie bereits erwähnt, konnte in zwei unabhängigen Untersuchungen bestätigt werden, dass RbdB und DrnB in subnukleären Foci, die häufig mit den Nucleoli assoziiert waren, co-lokalisieren (Kruse 2014, Zenk 2014). Funktionsanalysen mit RbdB und DrnB Deletionsvarianten zeigten weiterhin, dass weder der Prolin und Threonin reiche Abschnitt von RbdB (Prich-site, aa 504-612) noch die N-terminalen Aminosäuren von DrnB (aa 2-464), in denen die dsRBD enthalten war, für die miRNA Prozessierung notwendig waren (Buttlar 2013, Kruse 2014). Im Gegensatz zu DCL1 aus *A. thaliana* hatte die Deletion der DrnB-eigenen dsRBD keinen Einfluss auf die subnukleäre Lokalisation des Proteins (Fang et al. 2007, Kruse 2014). Das Protein akkumulierte nach wie vor in Nucleoli-assoziierten Spots am Rand des Kerns (Kruse 2014).

Die Interaktion von DrnB und RbdB konnte durch verschiedene Co-IP Experimente bestätigt werden: Sowohl DrnB 3xHA als auch Δ dsRBD (Δ 2-464) DrnB 3xHA Fusionsproteine konnten mit Hilfe von RbdB (Δ 504-612) GFP präzipitiert werden (Zenk 2014).

Da die DrnB eigene dsRBD nicht für die Prozessierung von miRNAs notwendig war, sollte überprüft werden, ob diese überhaupt funktionell ist. Das Sequenz-Alignment der dsRNA bindenden Domänen aus DrnB und RbdB zeigte, dass sie sich in lediglich zehn Aminosäuren unterscheiden (vgl. Abb. 33). Um die Funktionalität der ersteren zu untersuchen, wurde ein Domänen-*Shuffling* durchgeführt, indem die dsRBD des *rbdB*-Gens gegen die von *drnB*

ausgetauscht wurde. Die Expression der chimären Proteine im rbdB- Stamm komplementierte den *Knockout*-Phänotyp vollständig (Zenk 2014). Auch wenn die DrnB eigene dsRBD nicht für die miRNA Prozessierung benötigt wird, ist sie im Kontext von RbdB doch funktionell.

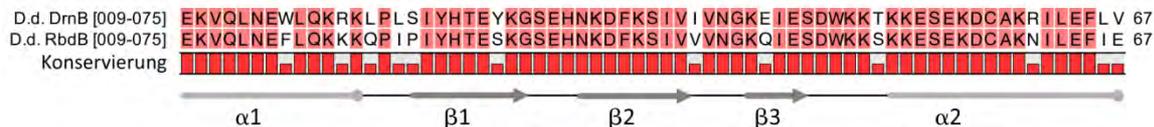


Abb. 33: Sequenz-Alignment der dsRBDs aus DrnB und RbdB.

Die Proteindomänen wurden mit SMART vorhergesagt (Schultz et al. 1998, Letunic et al. 2014). D.d.: *Dictyostelium discoideum*. Unter dem Alignment ist schematisch die Sekundärstruktur der Domänen dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem CLC Sequence Viewer 7 erstellt.

4.2 AgnA und die RNAi vermittelte Stilllegung von DIRS-1

4.2.1 Kurze Übersicht zum aktuellen Forschungsstand

Wie einleitend beschrieben ist das Retrotransposon DIRS-1, das vermutlich die Centromere in *D. discoideum* konstituiert (Glockner et al. 2009, Dubin et al. 2010), mit 16 vollständigen und 200 unvollständigen Kopien das häufigste transposable Element im Genom der Amöbe (Chung et al. 1983, Piednoel et al. 2011). Die Proteine AgnA und RrpC haben eine entscheidende Bedeutung bei der RNAi-vermittelten Stilllegung dieses Transposons, da sie für die Akkumulierung der meisten DIRS-1 siRNAs benötigt werden. Anhand von Northern Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass zwischen 80-90 % dieser siRNAs in den jeweiligen *Knockout*-Stämmen fehlten und die vom Transposon stammenden Transkripte akkumulierten (Boesler et al. 2014, Wiegand et al. 2014).

Im *agnA*- Stamm wurden außerdem extrachromosomal vorliegende DNA-Moleküle identifiziert, die dem DIRS-1 Retrotransposon zugeordnet werden konnten (Boesler et al. 2014). Der *Knockout* des *agnA*-Gens hatte also eine starke Deregulation des Transposons zur Folge. Um weitere Einblicke in die RNAi-vermittelte Regulation von DIRS-1 zu erhalten, sollten die molekularen Mechanismen der siRNA Produktion und die Funktion von AgnA näher untersucht werden. Weitere Studien an der *Knockout*-Mutante sollten außerdem dabei helfen, Einblicke in den Replikationsmechanismus von DIRS-1 zu gewinnen, der bisher nicht detailliert untersucht wurde.

Teile der im Folgenden gezeigten Ergebnisse wurden in zwei Artikeln veröffentlicht (Boesler et al. 2014, Wiegand et al. 2014). Um den Anteil der eigenen Arbeit zu kennzeichnen, werden die Publikationen nicht zitiert, wenn es sich um eigene Beiträge handelt. Ein Verweis bedeutet umgekehrt, dass Bezug auf die Arbeiten der Co-Autoren genommen wird.

4.2.2 Die Expression von AgnA wird entwicklungsabhängig reguliert

Die bisherigen Untersuchungen des *agnA*- Stamms wurden überwiegend an vegetativ wachsenden Zellen durchgeführt und zeigten deutliche molekulare Phänotypen in der Regulation des DIRS-1 Retrotransposons (Boesler et al. 2014). Weitere Studien an der *Knockout*-Mutante mit Zellen aus verschiedenen Entwicklungsstadien wären insbesondere dann interessant, wenn AgnA entwicklungsabhängig verstärkt exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde RNA aus vegetativ wachsenden Zellen des AX2 Wildtyps und aus verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert und die Expression der *agnA* mRNA mittels qRT-PCR untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass die mRNA in vegetativen Zellen am stärksten exprimiert wurde und früh nach dem Eintritt in die Entwicklung abnahm. Bereits nach 4 h im Entwicklungszyklus war die Expression der *agnA*-mRNA um 90 % gesunken und veränderte sich fortan nicht mehr stark

(vgl. Abb. 34). Eine ähnliches entwicklungsabhängiges Expressionsprofil der *agnA*-mRNA ergab die RNA-Hochdurchsatzsequenzierung für den Wildtyp-Stamm AX4 (Rot et al. 2009).



Abb. 34: Expressionsprofil der *agnA*-mRNA

Die Expression der *agnA*-mRNA im Entwicklungszyklus wurde mittels qRT-PCR (grüne Kurve) untersucht. Als Referenzgen für die relative Quantifizierung diente *cinD*. Für die Amplifikation der *agnA*- und der *cinD*-mRNA wurden die Primer-Sets BB180/BB181 und #1923/#1924 verwendet. Das Expressionsniveau der *agnA* mRNA wurde auf das in vegetativen Zellen normiert (Stunde 0 entspricht 1). N = 2 (biologische Replikate);

Fehlerbalken: Standardabweichung. Als Vergleich sind *Deep Sequencing* basierte Expressionsdaten für den AX4 wt (graue Kurve) gezeigt (Rot et al. 2009).

Da unabhängige Analysen die mit Abstand stärkste mRNA Expression von *agnA* in amöboiden Zellen verorteten, wurde von einer phänotypischen Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien des *agnA*- Stammes abgesehen.

4.2.3 *AgnA* lokalisiert im Kern und im Cytoplasma

Argonauten Proteine können vielfältige Funktionen bei der posttranskriptionellen Regulation von Genen im Cytoplasma einer Zelle oder bei ihrer transkriptionellen Stilllegung im Kern wahrnehmen (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009).

Im Fall von *AgnA* wiesen die bisherigen Untersuchungen auf eine posttranskriptionelle Aufgabe hin, da das Protein unter anderem für die Akkumulierung der dort lokalisierten DIRS-1 siRNA notwendig war (Boesler et al. 2014). Insofern wurde eine cytoplasmatische Lokalisation des Proteins erwartet, was im Folgenden überprüft werden sollte.

Da fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen keine zuverlässige Aussage zuließen (Daten nicht gezeigt), wurden Proteine aus dem Cytoplasma und dem Nucleoplasma von *D. discoideum* Stämmen isoliert, die *AgnA* als N- oder C-terminale Fusion mit einem 3xHA-Tag exprimierten (vgl. 2.13 und 2.17.2). Die Proteinfraktionen wurden anschließend auf das Vorkommen der *AgnA* 3xHA Fusionsproteine hin untersucht. Die Western Blot Analysen ergaben, dass *AgnA* in beiden Kompartimenten lokalisierte (vgl. Abb. 35). Da die Position des 3xHA-Tags keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte, werden diese exemplarisch für den Stamm AX2 *AgnA* 3xHA gezeigt.

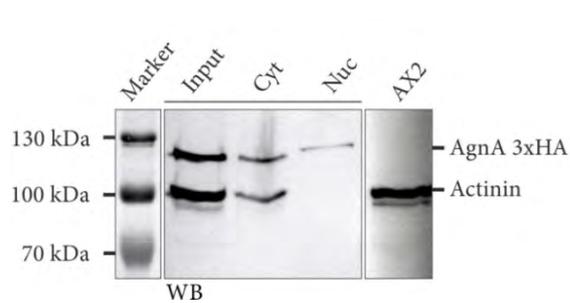


Abb. 35: Subzelluläre Lokalisation von AgnA

Western Blot zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von AgnA. Die verwendeten Proteinlysate wurden entweder aus ganzen Zellen (Input) oder aus dem Cytoplasma (Cyt) bzw. dem Nukleoplasma (Nuc) eines Stammes gewonnen, der AgnA 3xHA ektopisch exprimiert. Als Negativkontrolle wurde Gesamt-Proteinlysate aus dem AX2 wt verwendet. Mit Hilfe

eines α -HA Antikörpers wurden die Fusionsproteine immunologisch nachgewiesen. Die Detektion von α -Actinin-1 diente als cytoplasmatischer Marker. Die enzymatische Nachweisreaktion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der an den Sekundärantikörper gekoppelten AP.

Die Untersuchungen wiesen darauf hin, dass AgnA neben den bekannten Funktionen im Cytoplasma möglicherweise auch regulatorische Aufgaben im Kern wahrnimmt, was nachweislich für die Proteine AGO4 aus *A. thaliana* (Ye et al. 2012) oder Ago2 aus *D. melanogaster* gilt (Okamura et al. 2004, Taliaferro et al. 2013).

4.2.4 DIRS-1 Volllänge-Transkripte akkumulieren in agnA- Stämmen

Durch qRT-PCR und Northern Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass DIRS-1 Transkripte mit heterogener Länge in agnA- Stämmen akkumulierten (Boesler et al. 2014). Letztere sollten mit dem Ziel reproduziert werden, vollständige DIRS-1 Transkripte im AX2 wt und im agnA- Stamm zu quantifizieren (vgl. Abb. 36, A-C).

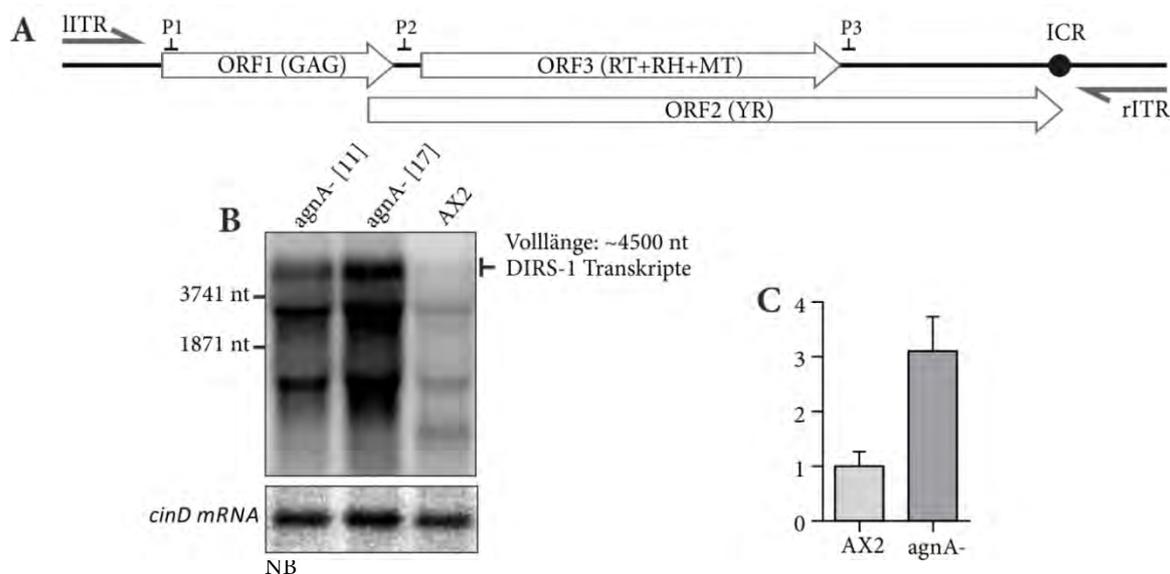


Abb. 36: DIRS-1 Transkripte akkumulieren im agnA- Stamm

A: Schematische Darstellung eines vollständigen DIRS-1 Elementes. P1-P3 geben die Bindepositionen der 32 P markierten Oligonukleotide an, die zum Nachweis von *sense* Transkripten genutzt worden sind. P1 = BB141, P2 = BB145, P3 = BB153 **B:** Northern Blot Analyse von DIRS-1 *sense* Transkripten im agnA- Stamm und im AX2 wt. Gesamt-RNA der angegebenen Stämme wurde in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. DIRS-1 *sense* Transkripte konnten mit Hilfe

der angegebenen Sonden detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde die Membran anschließend mit einer ^{32}P markierten Probe zum Nachweis der *cinD* mRNA hybridisiert. C: Die Quantifizierung der 4,5 kb langen Volllänge DIRS-1 Transkripte erfolgte relativ zur *cinD*-Ladekontrolle. Die Ergebnisse wurden auf den AX2 Wildtyp normalisiert (Volllänge DIRS-1 Transkripte = 1) dargestellt. N = 4 (2 biologische, 2 technische Replikate); Fehlerbalken: Standardabweichung. Signifikanz: gepaarter t-Test. AX2/agnA- $p = 0,0054$ (**).

Die Quantifizierung ergab, dass DIRS-1 Transkripte, die von einem vollständigen Element abstammen und eine ungefähre Größe von 4500 nt haben (Cohen et al. 1984), in agnA- Stämmen um das ca. 3,5fache angereichert waren. Die Transkripte enthalten neben den kodierten Genen alle strukturellen Elemente, die in Modellen zum DIRS-1 Amplifikationsmechanismus als notwendig angesehen werden, um neue vollständige Kopien in das Genom zu integrieren: Es handelt sich um Teile der linken ITR, die fast vollständige rechte ITR sowie um den ICR-Sequenzbereich (Cappello et al. 1985, Poulter et al. 2005). Da sich der Transkriptionsstart am Ende der linken ITR befindet (Cohen et al. 1984), muss ihre Sequenz im Zuge der Amplifikation zum größten Teil rekonstituiert werden. Aufgrund der Anreicherung von DIRS-1 Volllänge-Transkripten im agnA- Stamm sollte untersucht werden, ob auch die vom Transposon kodierten Proteine verstärkt exprimiert werden.

4.2.5 DIRS-1 kodierten Proteine akkumulieren im agnA- Stamm

Da keine Antikörper gegen die von DIRS-1 kodierten Proteine zur Verfügung standen, wurden die einzelnen ORFs als Fusionsprotein mit einem C-terminalen GFP-Tag kloniert und jeweils in den agnA- Stamm und in den AX2 wt transformiert. Dazu wurden extrachromosomale Vektoren (Veltman et al. 2009) verwendet, die in ca. 100 Kopien in der Zelle vorliegen (Firtel et al. 1985). Die Fusionsproteine standen unter der Kontrolle eines *act15* Promotors (Veltman et al. 2009). Vergleicht man die Promotoraktivität zwischen dem verwendeten *act15* Promotor und der linken DIRS-1 ITR im Kontext eines extrachromosomalen Plasmides, so war die der DIRS-1 ITR 2-mal stärker (vgl. 4.2.11). Berücksichtigt man zudem, dass DIRS-1 in 16 vollständigen und ca. 200 unvollständigen Kopien im Genom vorhanden ist (Chung et al. 1983, Piednoel et al. 2011), sollte die Transkriptionsrate der Transgene in erster Näherung nicht wesentlich stärker oder schwächer sein als die der endogenen DIRS-1 Kopien. Es kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Chromatinstruktur der endogenen DIRS-1 Elemente repressiver ist als die der auf den extrachromosomalen Plasmiden kodierten ORFs. Das würde folglich zu einer stärkeren Expression der Transgene führen.

Die Western Blot gestützte Expressionsanalyse der Transgene ergab, dass die von ORF2 kodierte Tyrosin-Rekombinase (YR) und die von ORF3 kodierten Pol-Gene (RT RH MT) lediglich im agnA- Stamm nachweisbar waren. GAG GFP akkumulierte hingegen sowohl im agnA- Stamm als

auch im AX2 wt (vgl. Abb. 37A). Ähnliche Beobachtungen konnten auch auf der mRNA-Ebene gemacht werden (vgl. Abb. 37B).

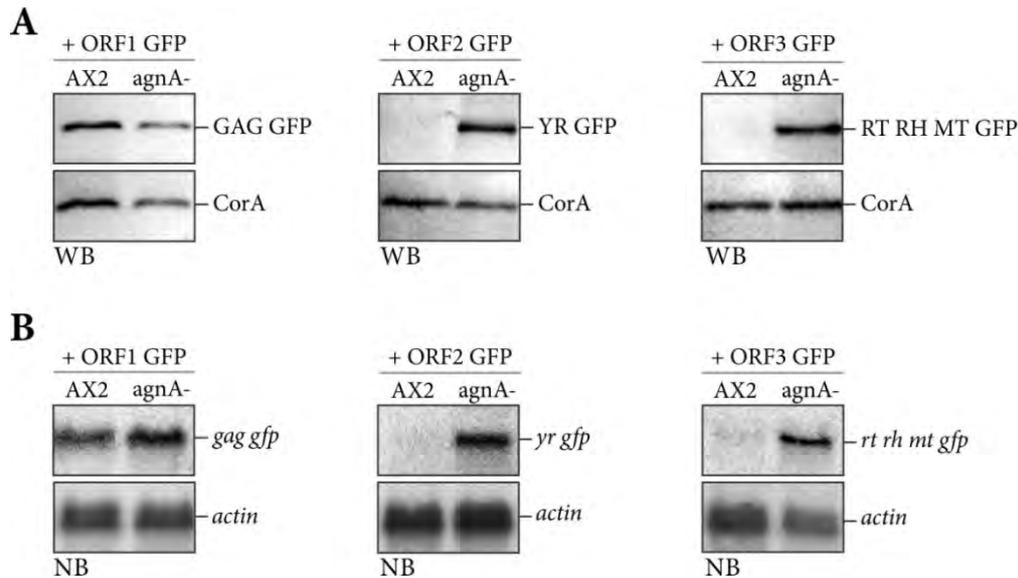


Abb. 37: Ektopische Expression der DIRS-1 kodierten Proteine im AX2 und im agnA- Stamm

A: Western Blot gestützte Expressionsanalysen der DIRS-1 ORF GFP Fusionsproteine im AX2 und im agnA- Stamm. Die Fusionsproteine weisen eine Größe von 65 kDa (GAG GFP), 146 kDa (YR GFP) und 103 kDa (RT RH MT GFP) auf. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Hilfe eines GFP Antikörpers. Die Detektion des endogenen Proteins CorA diente als Ladekontrolle. Die enzymatische Nachweisreaktion der Proteine wurde durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym AP vermittelt. **B:** Northern Blot zum Nachweis der verschiedenen DIRS-1 ORF GFP mRNAs. GFP-Sequenzen wurden durch Hybridisierung mit dem ³²P markierten Oligonukleotid SM058 nachgewiesen. Um gleiche Ladungsmengen anzuzeigen, wurde die *actin* mRNA mit Hilfe des Oligonukleotides #2956 detektiert. Die detektierten RNAs weisen eine ungefähre Größe von 1700 nt (*gag gfp*), 3800 nt (*yr gfp*) und 2600 nt (*rt rh mt gfp*) auf.

Im Wildtyphintergrund werden die von DIRS-1 ORF2 und ORF3 kodierten Gene effizienter stillgelegt als das von ORF1 kodierte, putative GAG-Protein. In Übereinstimmung damit haben spätere Analysen gezeigt, dass der erste Leserahmen einen weiten Sequenzbereich besitzt, dem nur wenige sequenzierte DIRS-1 siRNAs zugeordnet werden konnten (vgl. 4.2.9).

Die Anreicherung von DIRS-1 Transkripten im agnA- Stamm (Boesler et al. 2014) und die deutliche Akkumulierung der von ORF2 und ORF3 kodierten Proteine könnten erklären, warum extrachromosomale DIRS-1 DNA-Intermediate im agnA- Stamm, aber nicht im AX2 wt nachweisbar waren. Möglicherweise handelt es sich dabei um Produkte der kodierten Reversen Transkriptase. Da die cDNA-Synthese ein entscheidender Schritt bei der Amplifikation von LTR-Retrotransposons ist (zusammengefasst in Havecker et al. 2004), sollten die identifizierten DIRS-1 DNA Intermediate im agnA- Stamm näher charakterisiert werden.

4.2.6 Extrachromosomale DIRS-1 DNA akkumuliert im Cytoplasma von agnA- Stämmen

Die cDNA-Synthese findet bei der Amplifikation von LTR-Retrotransposons typischerweise in cytoplasmatischen, Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) statt, die durch Polymerisation der kodierten GAG Proteine gebildet werden (zusammengefasst in (Havecker et al. 2004)). Wenn es sich bei der extrachromosomalen DIRS-1 DNA um cDNA-Intermediate handelt und es Parallelen zum Amplifikationsmechanismus anderer LTR-Retrotransposons gibt, sollten sie überwiegend im Cytoplasma von agnA- Stämmen vorkommen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde DNA aus dem Cytoplasma und dem Nukleoplasma von agnA- Stämmen und dem AX2 wt isoliert. Die gewonnenen Proben wurden unverdaut in einem Agarosegel aufgetrennt, geblottet und auf das Vorkommen von DIRS-1 DNA-Intermediaten hin untersucht. Diese konnten ausschließlich in der cytoplasmatischen Fraktion des agnA- Stammes detektiert werden (vgl. Abb. 38, A-B).

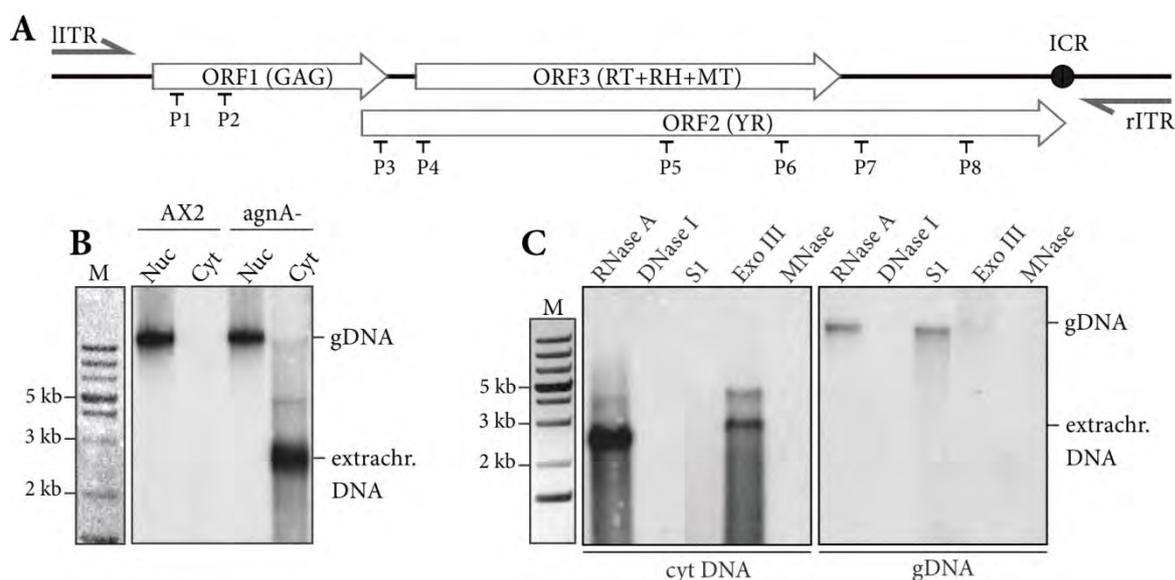


Abb. 38: Einzelsträngige, extrachromosomale DIRS-1 DNA akkumuliert im Cytoplasma von agnA-

A: Schema eines vollständigen DIRS-1 Elementes mit Bindepositionen der ^{32}P markierten Oligonukleotide [P1-P8] zum Nachweis der extrachromosomalen DIRS-1 DNA. P1 = BB142, P2 = BB144, P3 = BB146, P4 = BB146, P5 = BB150, P6 = BB152, P7 = BB154, P8 = BB156. Alle Sonden sind komplementär zum Minusstrang des DIRS-1 Elementes. **B:** Southern Blot mit DNA, die aus dem Cytoplasma und dem Nukleoplasma des Ax2 wt und des agnA- Stammes isoliert wurde. Die in A angegebenen Sonden dienen dem Nachweis DIRS-1 spezifischer Sequenzen. Neben der chromosomalen DNA konnte im Cytoplasma des agnA- Stammes eine dominante Bande an extrachromosomaler DIRS-1 DNA nachgewiesen werden. Die Bande lief auf einer Höhe von 2,8 kb; der verwendete DNA Marker (M) diente der Orientierung und ist nicht zur Größenbestimmung der einzelsträngigen DNA geeignet. Oligonukleotide, die komplementär zum Plusstrang des DIRS-1 Elementes waren, detektierten lediglich die gDNA (Daten nicht gezeigt). **C:** gDNA und cytoplasmatische DNA aus dem agnA- Stamm wurden mit RNaseA alleine oder zusätzlich mit einer der folgenden Nukleasen behandelt: DNaseI, S1 Nuklease (S1), Exonuklease III (ExoIII), Micrococcal Nuklease (MNase). DNaseI und MNase sind Endonukleasen, die einzel- und doppelsträngige DNA schneiden. S1 ist eine Endonuklease, die spezifisch für einzelsträngige DNA ist. ExoIII schneidet lediglich

doppelsträngige DNA. Die Verdauungen wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, geblottet und die DIRS-1 Sequenzen wie in B beschrieben nachgewiesen.

Um weiterhin den einzelsträngigen Charakter der extrachromosomalen DIRS-1 DNA zu bestätigen, wurden Verdauungen mit verschiedenen Nukleasen durchgeführt (vgl. Abb. 38C). S1 ist spezifisch für einzelsträngige DNA und konnte die extrachromosomale DIRS-1 DNA vollständig abbauen, während die ExoIII Nuklease, die doppelsträngige DNA abbaut, ausschließlich die genomische DNA degradierte. DNaseI und MNase verdauten sowohl die gDNA als auch die extrachromosomale DIRS-1 DNA und dienten als Positiv-Kontrolle.

Modelle zur DIRS-1 Amplifikation postulieren, dass vollständige cDNA-Intermediate ligiert werden, um zirkuläre DNA-Moleküle auszubilden. Weiterhin geht man davon aus, dass die Tyrosin-Rekombinase nach der Synthese des DNA-Doppelstranges in der Lage ist, die DNA-Intermediate in das Genom zu integrieren (Cappello et al. 1985, Poulter et al. 2005).

Dass der überwiegende Teil der im agnA- Stamm akkumulierten DIRS-1 cDNA-Moleküle einzelsträngig war, konnte sowohl im Rahmen dieser Arbeit (vgl. Abb. 38) als auch in früheren Untersuchungen bestätigt werden (Boesler et al. 2014). Bekannt war außerdem, dass die Sequenzabschnitte der einzelnen ORFs und wenige Nukleotide der rechten ITR in den DIRS-1 DNA-Intermediaten vorkamen, was durch den sequentiellen Einsatz von ^{32}P markierten Sonden im Rahmen von Southern Blot Analysen gezeigt wurde (Boesler 2012). Allerdings wurde nicht überprüft, inwieweit die ITRs vollständig vorhanden waren und ob die DNA-Intermediate als lineare oder zirkuläre Moleküle in der Zelle vorlagen.

4.2.7 Extrachromosomale DIRS-1 DNA Intermediate enthalten Teile der ITRs

Um die Präsenz von ITR-Sequenzen innerhalb der extrachromosomalen DIRS-1 DNA nachzuweisen, wurden ebenfalls Southern Blot Analysen durchgeführt. Die unverdaute cytoplasmatische DNA aus agnA- Stämmen wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Diese konnte daraufhin mit einer geeigneten Auswahl an ^{32}P markierten, strangspezifischen Sonden hybridisiert werden. Für den Nachweis von Sequenzen der linken und der rechten ITR kamen je zwei ^{32}P markierte Oligonukleotide (P1-P4) zum Einsatz (vgl. Abb. 39A). In Tab. 21 sind die Bindepositionen der verwendeten Sonden angegeben.

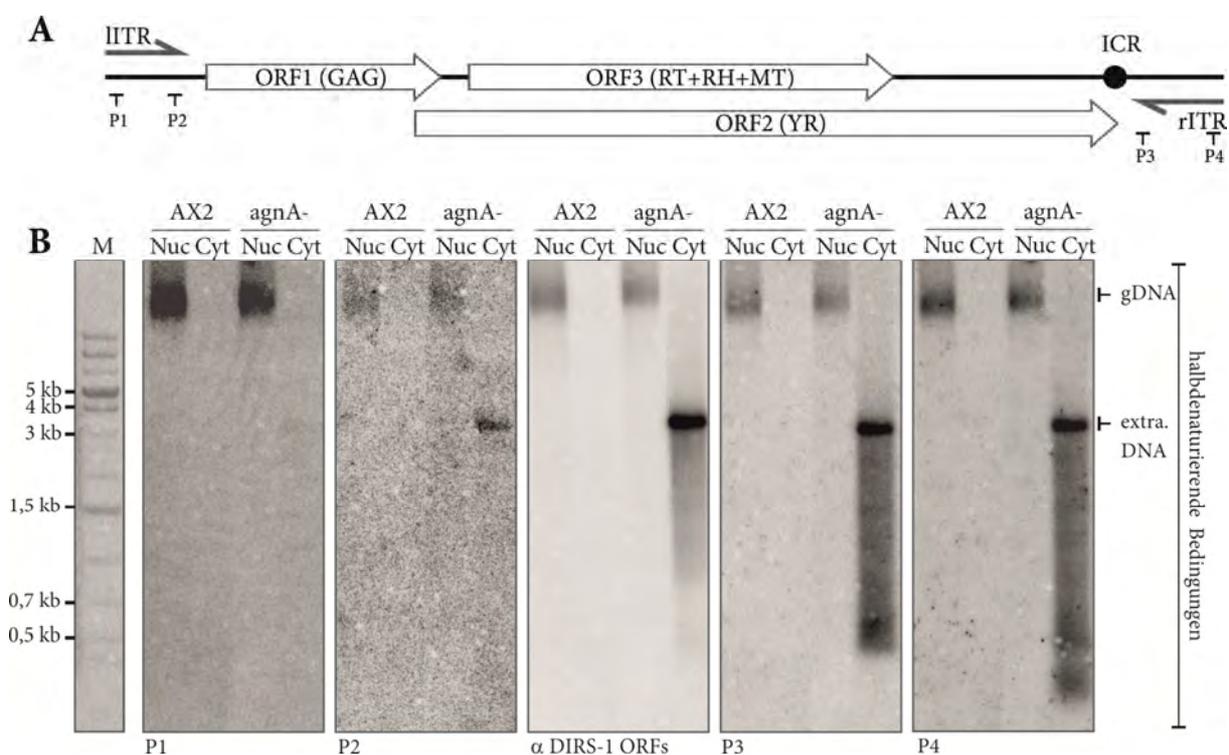
Die Sonden waren geeignet, um Sequenzen vom Beginn oder vom Ende einer jeden ITR nachzuweisen. Was die linke ITR betrifft, so konnte die extrachromosomale DIRS-1 DNA lediglich unter Verwendung der Sonde P2 detektiert werden. Im Gegensatz dazu lieferten beide Sonden zum Nachweis der rechten DIRS-1 ITR ein robustes Signal (vgl. Abb. 39B).

Tab. 21: DIRS-1 ITRs und Bindepotion der verwendeten Sonden

In der Tabelle sind sowohl die Positionen der DIRS-1 ITRs (bezogen auf ein vollständiges Element) als auch die Bindepotionen der verwendeten ^{32}P markierten Oligonukleotide, die als Sonden genutzt wurden, angegeben. Die in Klammern stehenden Zahlen geben die Länge der jeweiligen ITR an.

DIRS-1 ITR	Sonde	Bindepotion der Sonde
linke DIRS-1 ITR [316 bp] Position im DIRS-1 Element: 1-316	P1	50-81
rechte DIRS-1 ITR [350 bp] Position im DIRS-1 Element: 4465-4814	P2	291-316
	P3	4475-4495
	P4	4731-4758

Die Southern Blot Analysen wurden unter nativen (Daten nicht gezeigt) und unter halbdaturierenden Bedingungen durchgeführt. Auffallend war, dass die Sonden P3 und P4 unter denaturierenden Bedingungen neben der großen, extrachromosomalen DIRS-1 DNA auch kürzere DNA-Moleküle unterhalb der 0,7 kb Markerbande detektierten (vgl. Abb. 39B). Dieses Phänomen konnte bereits zuvor für die Sonde P3 beobachtet werden (Boesler et al. 2014).

**Abb. 39: Nachweis von ITR Sequenzen in der extrachromosomalen DIRS-1 DNA**

A: Schematische Darstellung des DIRS-1 Elementes mit Bindepotionen der ^{32}P markierten Oligonukleotide P1-P4, die zum Nachweis von ITR-Sequenzen eingesetzt wurden. P1 = DM155, P2 = DM154, P3 = AG#896, P4 = DM156. **B:** DNA aus dem Cytoplasma und dem Nucleoplasma vom agnA- und dem AX2 Wildtyp-Stamm wurden halbdaturierend in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gebロットet. Die Membran wurde sukzessiv mit den angegebenen Sonden zum Nachweis der ITRs hybridisiert. Als Kontrolle wurde die Membran außerdem mit den in Abb. 38A angegebenen Sonden hybridisiert, die allesamt kodierende Sequenzen binden.

Weiterhin wurden PCR-Analysen mit cytoplasmatischer DNA aus dem *agnA*- Stamm durchgeführt, um die Enden der extrachromosomalen cDNA-Intermediate weiter zu kartieren. Dabei bestätigte sich, dass die linke ITR zum überwiegenden Teil nicht vorhanden war; eine erfolgreiche Amplifikation war nur möglich, wenn die Bindeposition des *forward* Primers direkt hinter dem experimentell nachgewiesenen Transkriptionsstart (Cohen et al. 1984) lag. Wählte man einen *forward* Primer, der lediglich 15 nt weiter stromaufwärts band, konnte kein PCR-Produkt mehr generiert werden. Die rechte ITR war hingegen in den extrachromosomalen DIRS-1 DNA Intermediaten vollständig enthalten (vgl. Abb. 40, A-B).

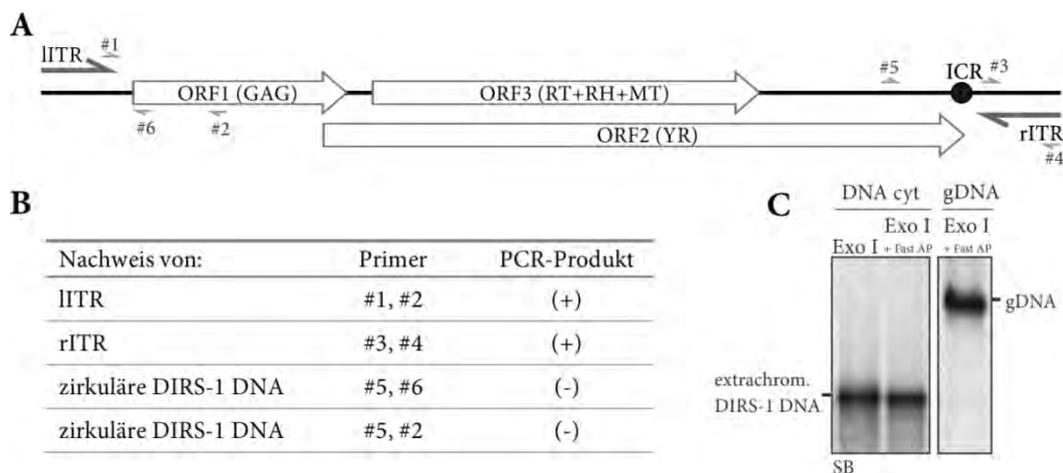


Abb. 40: Molekularbiologische Charakterisierung der extrachromosomalen DIRS-1 DNA

A: Schematische Darstellung eines vollständigen DIRS-1 Elementes mit Bindepositionen der für die PCR-Analysen verwendeten Primer #1 bis #6: #1 = DM173, #2 = BB143, #3 = #869, #4 = DM135, #5 = MD83, #6 = BB141. **B:** Mit Hilfe von PCR-Analysen sollte die Präsenz der ITRs und eine mögliche Zirkularität der extrachromosomalen DIRS-1 DNA untersucht werden. Als Template diente DNA aus dem Cytoplasma von *agnA*- Stämmen. Der Übersichtlichkeit halber sind die verwendeten Primerkombinationen und die Ergebnisse der PCR-Analysen in einer Tabelle dargestellt. Die entsprechenden Gelbilder sind in Anhang A4 gezeigt. (+) ein spezifisches PCR-Produkt war nachweisbar, (-) es konnte kein spezifisches PCR-Produkt generiert werden. Mit Hilfe der Primer #1/#2 konnte ein Teil (~10 Nukleotide) der linken ITR amplifiziert werden. Unter Verwendung der Primer #3/#4 wurde die vollständige rechte ITR amplifiziert. Eine Zirkularität der extrachromosomalen DIRS-1 cDNA konnte weder mit den Primerkombinationen #5/#6 noch mit #5/#2 nachgewiesen werden. **C:** Cytoplasmatische und genomische DNA aus dem *agnA*- Stamm wurden mit dem Enzym Exonuklease I (Exo I), die einzelsträngige DNA in 3'-5'-Richtung abbaut, behandelt. Bei zwei Ansätzen (oben angegeben) wurde die DNA zuvor mit der alkalischen Phosphatase Fast AP versetzt. Die Verdauungen wurden in einem nativen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die DIRS-1 DNA mit den in Abb. 38A angegebenen Sonden detektiert.

Verschiedene PCR-Ansätze zum Nachweis zirkulär vorliegender DIRS-1 DNA Intermediate ergaben kein Produkt (vgl. Abb. 40B und Anhang A4), was dafür sprach, dass die Moleküle linear in der Zelle vorlagen. Insofern sollte die DNA durch das Enzym Exonuklease I (ExoI), das einzelsträngige DNA in 3'-5'-Richtung abbaut, vollständig verdaut werden. Dies war jedoch nicht

der Fall (vgl. Abb. 40C). Möglicherweise ist die extrachromosomale DIRS-1 DNA am 3'-OH-Ende modifiziert, sodass eine Degradation durch das Enzym beeinträchtigt ist (Thermo Fisher Scientific, Herstellerangaben).

Zusammenfassend haben die unterschiedlichen Untersuchungen ergeben, dass die extrachromosomale DIRS-1 DNA zum größten Teil einzelsträngig vorlag, dem *antisense* Strang des Elementes entsprach und alle kodierenden Sequenzen sowie die vollständige rechte ITR beinhaltete. Die linke ITR fehlte hingegen fast komplett; hier waren lediglich ~10 nt nachweisbar. Die Tatsache, dass die extrachromosomale cDNA komplementär zu den DIRS-1 *sense* Transkripten vollständiger Elemente ist, lässt vermuten, dass es sich um Produkte einer Reversen Transkription handelt. In Abb. 41 ist die Komposition der extrachromosomalen DIRS-1 DNA schematisch skizziert.

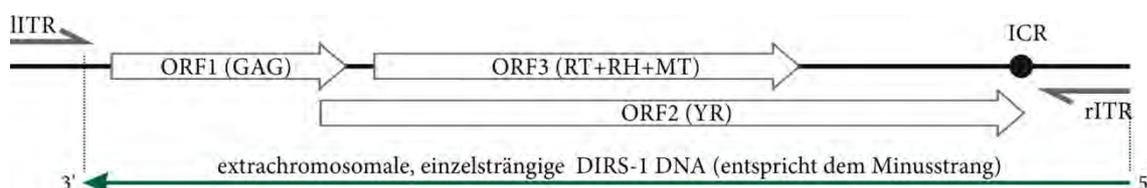


Abb. 41: Übersicht über die Komposition der extrachromosomalen DIRS-1 DNA

Die einzelsträngige, extrachromosomale DNA von DIRS-1, die im agnA- Stamm akkumulierte, umfasste die kodierenden Bereiche und die vollständige rechte ITR. Von der linken ITR waren nur wenige Nukleotide (ca. 10 nt) nachweisbar, die die nach dem Transkriptionsstart gelegenen Sequenzen umfassten. Die cDNA entspricht dem Minusstrang des Elementes.

4.2.8 DIRS-1 GAG assembliert in distinkten cytoplasmatischen Foci

Da die extrachromosomalen DIRS-1 DNA-Intermediate ausschließlich im Cytoplasma von *D. discoideum* nachweisbar waren, sollte überprüft werden, ob das Transposon VLP-ähnliche Strukturen ausbildet, die möglicherweise als Syntheseort für die cDNA in Frage kommen. Allerdings war unklar, ob das von DIRS-1 ORF1 kodierte Protein in der Lage ist, solche Strukturen auszubilden. Was die Position des Leserahmens und seine Größe betrifft, so bestehen Ähnlichkeiten zu den *gag*-ORFs anderer Transposons. Die Sequenz des kodierten Proteins ist allerdings nicht homolog zu GAG-Proteinen von Integrase-Retrotransposons und enthält darüber hinaus nicht die typischen Zinkfinger-Motive (Poulter et al. 2005).

Die Untersuchung der subzellulären DIRS-1 GAG Lokalisation sollte Aufschluss darüber geben, ob das Protein charakteristische Strukturen im Cytoplasma ausbildet. Für diese Analysen wurden AX2 wt und agnA- Stämme genutzt, die GAG als N- oder C-terminale Fusion mit einem GFP-Tag ektopisch exprimierten (vgl. 2.13).

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass GAG-GFP distinkte Foci im Cytoplasma ausbildete und darüber hinaus diffus verteilt war (vgl. Abb. 42). Dabei gab es keine Unterschiede zwischen dem *agnA*- Stamm und dem AX2 wt, in dem GAG Fusionsproteine ebenfalls überexprimiert werden konnten (vgl. 4.2.5). Auffallend waren Anreicherungen des GFP-Signals in der Nähe der Zellkerne (siehe Pfeile in Abb. 42), die weitaus größer als die einzelnen Foci im Cytoplasma waren. Sie erinnerten an die Lokalisation von VLPs des Ty3 Retrotransposons in Hefezellen, die wenige und dafür größere Cluster ausbilden (Beliakova-Bethell et al. 2006).

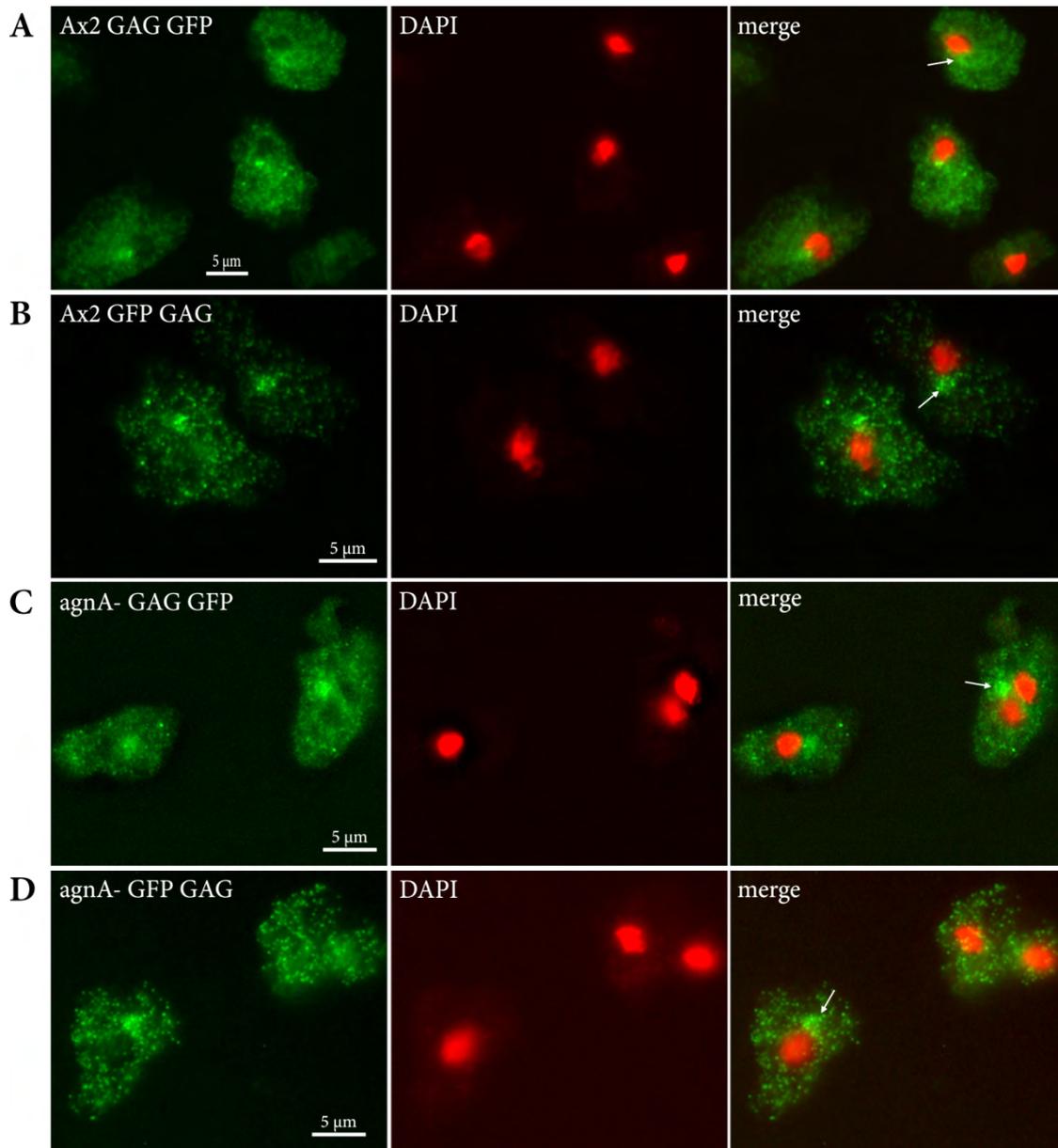


Abb. 42: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären DIRS-1 GAG Lokalisation

Zellen der Stämme AX2 GAG GFP, AX2 GFP GAG, *agnA*- GAG GFP und *agnA*- GFP GAG wurden mit MeOH fixiert und die chromosomale DNA mit DAPI gefärbt. Die Expositionszeiten für die Bildaufnahmen betragen 700-900 ms (GFP) und 30 ms (DAPI). Für jeden Stamm wurde ein repräsentativer Ausschnitt gezeigt.

Um eine Assemblierung von DIRS-1 GAG Fusionsproteinen weiterhin zu bestätigen, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein agnA- Stamm generiert, der DIRS-1 GAG mit unterschiedlichen *Tags* auf dem gleichen Plasmid kodierte (vgl. 2.13). Das GAG GFP Fusionsprotein wurde als Köder-Protein verwendet, während GAG 3xHA als Beuteprotein diente. Als Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit einem agnA- Stamm durchgeführt, der lediglich den GFP-*Tag* und GAG 3xHA exprimierte (vgl. Abb. 43). Die Western Blot Analysen wiesen auf eine Interaktion zwischen GAG GFP und GAG 3xHA hin. Unter Verwendung von GFP als Köderprotein konnte GAG 3xHA nicht präzipitiert werden.

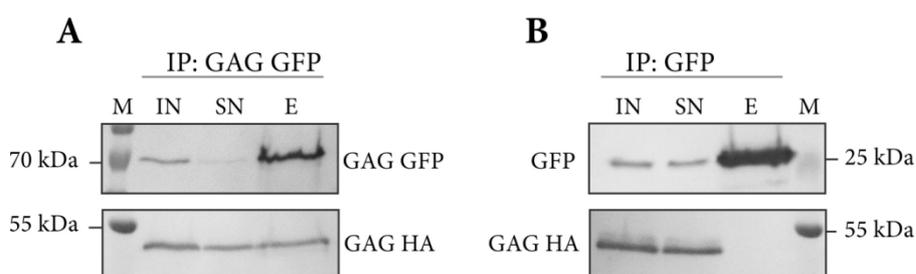


Abb. 43: Co-Immunopräzipitation von GAG-GFP und GAG-3xHA

Für die Co-IP Analysen wurden Zellen der Stämme agnA- DIRS-1 GAG GFP/GAG 3xHA und agnA- GFP/DIRS-1 GAG 3xHA lysiert. Vom löslichen Überstand wurde eine Probe (*Input*, IN) abgenommen, bevor das verbliebene Material mit GFP-Trap® Agarosebeads versetzt wurde. Nach der Inkubation mit den *Beads* wurde eine Probe vom Überstand (*Supernatant*, SN) abgenommen. Die Elution (E) erfolgte durch das Aufkochen der gewaschenen *Beads* in 2 x Lämmli-puffer. Mit den Proben wurden zwei unabhängige Western Blots (mit identischer Probenbeladung) durchgeführt. Dabei wurden jeweils 0,1 % (IN), 0,1 % (SN) und 15 % (E) vom gesamten *Input* verwendet. Die erste Membran diente dem immunologischen Nachweis von GAG GFP. Die zweite Membran wurde zum Nachweis der GAG 3xHA Fusionsproteine verwendet. **A:** Ergebnisse der Co-IP von GAG GFP und GAG 3xHA. Das Beuteprotein GAG 3xHA konnte mit GAG GFP präzipitiert werden. **B:** Als Kontrolle wurde GFP als Köderprotein verwendet. In diesem Fall konnten keine GAG 3xHA Proteine in der Elution nachgewiesen werden. M = Proteinmarker (*protein ladder plus prestained*).

VLPs können aus einem Zelllysate durch Zentrifugation über einen 20-70%igen Saccharosegradienten aufgereinigt und schließlich aus bestimmten Fraktionen isoliert werden. In der Regel wird das Zelllysate bereits vorab durch ein niedrig prozentiges Kissen an Saccharose zentrifugiert (Sakuragi et al. 2002). Dabei werden intakte VLPs in der Pelletfraktion gesammelt und können bereits von weniger dichten Partikeln abgetrennt werden. Vor diesem Hintergrund sollte ein einfaches Experiment durchgeführt werden, um die DIRS-1 GAG Partikel in *D. discoideum* näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden Zellen eines agnA- Stammes, der GAG GFP Fusionsproteine ektopisch exprimierte, in einem Puffer mit 20 % Saccharose lysiert. Der postnukleäre Überstand wurde bei 100.000 rcf zentrifugiert, um daraufhin Proteine aus dem Überstand und der Pelletfraktion zu isolieren. Die Fraktionen wurden anschließend auf das

Vorkommen von GAG GFP Fusionsproteinen hin untersucht, die überwiegend in der Pellet-Fraktion detektiert werden konnten (vgl. Abb. 44). Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass DIRS-1 GAG VLPs konstituiert, die als Orte der DIRS-1 cDNA Synthese genutzt werden.

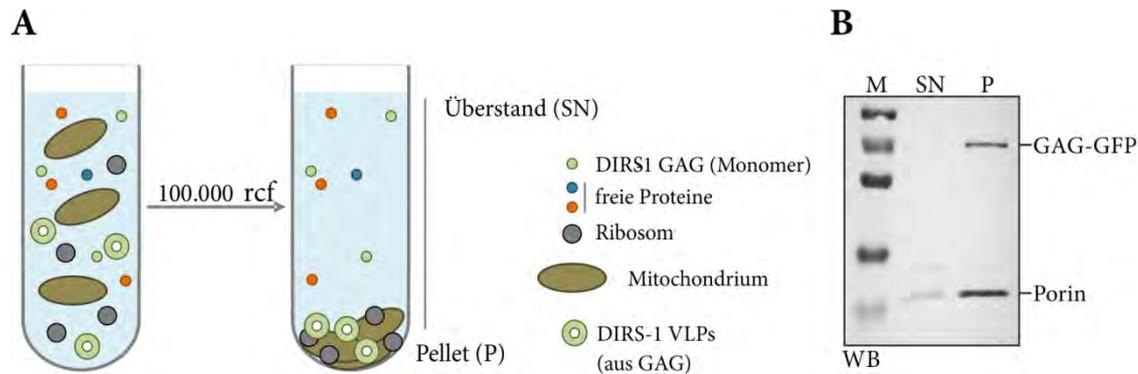


Abb. 44: DIRS-1 GAG GFP Fusionsproteine sind in einem 100.000 rcf Pellet nachweisbar

A: Schematische Abbildung des experimentellen Vorgehens: Zellen eines agnA- Stammes, der GAG-GFP ektopisch exprimierte, wurden in einem Puffer mit 20 % Saccharose lysiert und bei 100.000 rcf zentrifugiert. Anschließend wurden Proteine aus der Pelletfraktion und dem Überstand isoliert. **B:** Western Blot zum Nachweis von GAG-GFP. Der pro Spur enthaltene Anteil an Protein entsprach in etwa dem fraktionierten Material aus 4×10^5 Zellen. Mit Hilfe eines GFP-Antikörpers konnte GAG GFP (65 kDa) immunologisch nachgewiesen werden. Ein Antikörper gegen das mitochondriale Protein Porin (30 kDa) diente als Marker für die Pelletfraktion. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe der an den Sekundärantikörper gekoppelten AP enzymatisch detektiert. M = Proteinmarker (*protein ladder plus prestained*).

Um zu belegen, dass DIRS-1 VLPs in *D. discoideum* existieren, sind weitere Analysen mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) geplant. In Zusammenarbeit mit Katja Richert-Pöggeler (Julius-Kühn Institut, Braunschweig) wurden bereits erste Adsorptionspräparate mit Zellysate des agnA- Stammes hergestellt, die anschließend mit dem TEM untersucht wurden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass VLP-ähnliche Strukturen in den Zellen vorkommen (Daten nicht gezeigt). In Zukunft sollen diese Partikel in fixierten Zellen untersucht werden. Durch Immunogoldmarkierung von GAG-Fusionsproteinen kann abschließend geklärt werden, ob DIRS-1 abhängige VLPs in *D. discoideum* existieren.

4.2.9 Analyse von DIRS-1 siRNAs durch Hochdurchsatzsequenzierung

Die Akkumulation der extrachromosomalen DIRS-1 DNA im agnA- Stamm wies auf eine erhöhte Mobilität des Transposons hin. Dieses Phänomen korrelierte mit der Anreicherung von DIRS-1 Transkripten (Boesler et al. 2014) und der kodierten Proteine (vgl. 4.2.5), die ihrerseits die Amplifikation des Transposons vermitteln. Als eigentliche Ursache für die Deregulation des Retrotransposons in der Mutante wird jedoch die starke Reduktion von DIRS-1 siRNAs diskutiert (Boesler et al. 2014). Deshalb wurden kleine RNAs aus dem AX2 wt und dem agnA- Stamm in hohem Durchsatz sequenziert und einem vollständigen DIRS-1 Element zugeordnet. Ihre

Verteilung sollte weitere Einblicke in den Mechanismus ihrer Entstehung und die Stilllegung des DIRS-1 Retrotransposons geben.

Auf diese Weise konnte die starke Abreicherung von DIRS-1 siRNAs im agnA- Stamm (Boesler 2012) bestätigt werden, die sich auf ca. 70 % belief. Dazu wurde der Anteil der DIRS-1 Sequenzen in beiden Stämmen bestimmt und auf den AX2 wt (= 100 %) normiert (vgl. Tab. 22 und Abb. 45).

Tab. 22: Übersicht über die Gesamtanzahl der Reads und den Anteil der DIRS-1 Sequenzen

Stamm	AX2	agnA-
Gesamtzahl der Reads	5222372	4719427
Anzahl der DIRS-1 Reads	34152	8350
relativer Anteil der DIRS-1 Reads	0,654 %	0,177 %
normierte Reads (AX2 = 100 %)	100 %	27 %

Bei der Analyse der DIRS-1 siRNAs im AX2 wt fiel eine ungleichmäßige Verteilung der DIRS-1 siRNAs entlang des Retrotransposons auf (vgl. Abb. 45). Innerhalb der ITR-Sequenzen und in der ersten Hälfte des gag Gens konnten im Wildtyp nur sehr wenige siRNAs nachgewiesen werden, was übereinstimmend mit Daten von C. Hammann und Mitarbeitern war (Wiegand et al. 2014). Dadurch kann möglicherweise auch erklärt werden, warum GAG das einzige DIRS-1 kodierte Protein ist, das im Wildtyphintergrund akkumulierte.

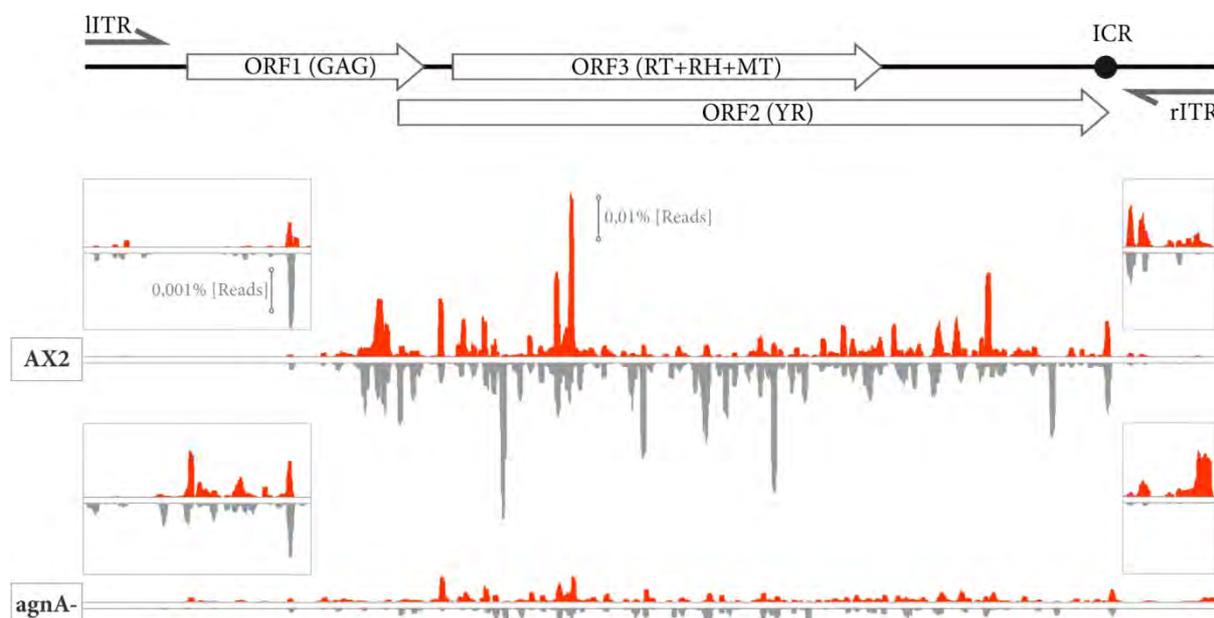


Abb. 45: Verteilung von DIRS-1 siRNAs im AX2 und im agnA- Stamm

Kleine RNAs (<200 nt) wurden aus dem AX2 wt und dem agnA- Stamm isoliert, durch Hochdurchsatzsequenzierung analysiert und gegen ein vollständiges DIRS-1 Element gemappt. Sense siRNAs sind in rot und antisense siRNAs in grau dargestellt. In den Boxen sind die entsprechenden Bereiche (linke ITR bis DIRS-1 ORF1, rechte ITR) vergrößert dargestellt. Die Durchführung und Auswertung der *Deep Sequencing* Analysen erfolgte in Kooperation mit Dr. Cynthia Sharma und Dr. Konrad Förstner (Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg).

Auffällig war zudem die asymmetrische Verteilung von DIRS-1 *sense* und *antisense Reads*, was auf eine Beteiligung von RdRPs bei der Synthese von DIRS-1 siRNAs hindeuten könnte. Entsprechend wurde kürzlich gezeigt, dass RrpC, genau wie AgnA, für die Akkumulierung von DIRS-1 siRNAs erforderlich ist (Wiegand et al. 2014).

Die Verteilung der verbliebenen DIRS-1 siRNAs im agnA- Stamm entsprach weitestgehend der im AX2 wt. Abweichend waren lediglich Bereiche in der rechten ITR und im 5'-Bereich des *gag* Gens: hier akkumulierten DIRS-1 siRNAs im *Knockout*-Stamm (vgl. Abb. 45). Die Größenverteilung der sequenzierten DIRS-1 RNAs war in beiden Stämmen mit einem dominanten Peak bei 21 Nukleotiden, wie es für siRNAs typisch ist, ähnlich (Daten nicht gezeigt).

4.2.10 AgnA ist für die siRNA Transitivität in 5'- und 3'-Richtung notwendig

In einigen Organismen wie *C. elegans* oder *A. thaliana* kann der Pool an siRNAs durch die Aktivität von RdRPs erweitert werden (zusammengefasst in Maida et al. 2011). Eine solche Signalamplifikation ist für eine effiziente Stilllegung von Zielgenen häufig entscheidend sein (Parrish et al. 2001, Pak et al. 2012). Die Mechanismen zur Produktion von sekundären siRNAs sind dabei vielfältig: RdRPs nutzen *Target*-RNAs als *Template*, um entweder längere doppelsträngige RNA-Moleküle zu produzieren, die anschließend durch ein Dicer Homolog prozessiert werden, oder um direkt einzelsträngige siRNAs zu synthetisieren (Xie et al. 2004, Pak et al. 2007, Sijen et al. 2007). Die Aktivität der RdRPs zur Biogenese von sekundären siRNAs wird häufig als Transitivität oder *Spreading* bezeichnet.

Um die Fähigkeit zur Transitivität von DIRS-1 siRNAs und eine mögliche Beteiligung von AgnA zu untersuchen, wurden sechs verschiedene Reporterkonstrukte generiert (vgl. 2.17.2). Jeder der drei offenen DIRS-1 Leserahmen wurde entweder mit einem 5'- oder 3'-gelegenen GFP-Tag versehen (vgl. Abb. 46) und ektopisch im AX2 und im agnA- Stamm exprimiert. Nur wenn die RdRP Amplifikationsmaschinerie zu den DIRS-1 ORF Sequenzen rekrutiert werden kann, entstehen durch *Spreading* siRNAs, die homolog zu GFP sind.

Mit Hilfe dieser Reporterkonstrukte konnte gezeigt werden, dass Transitivität im AX2 wt sowohl in 3'-Richtung als auch in 5'-Richtung erfolgte (vgl. Abb. 46B). Die Stärke variierte in Abhängigkeit von dem untersuchten Konstrukt. Unter Verwendung von ORF3-GFP Fusionen konnten im AX2 wt die meisten und mit ORF1-GFP Fusionen die wenigsten sekundären GFP siRNAs nachgewiesen werden. Die Unterschiede korrelierten dabei nicht mit der Menge an siRNAs, die am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende des jeweiligen ORFs vorgefunden wurden (vgl. Abb. 45). Anders als z.B. in *C. elegans*, wo sekundäre siRNAs überwiegend *antisense* Orientierung aufweisen (Pak et al. 2012), wurden GFP siRNAs beider Orientierungen nachgewiesen.

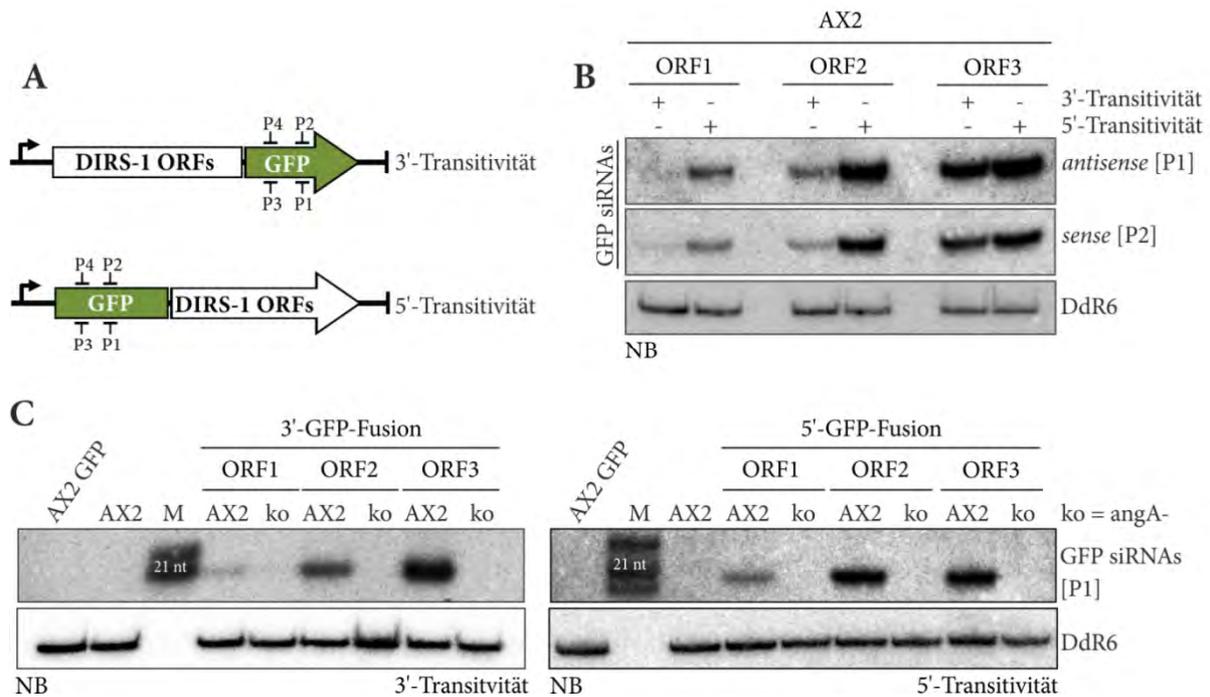


Abb. 46: Transitivität von DIRS-1 siRNAs im AX2 Wildtyp und im agnA- Stamm

A: Schematische Übersicht über die Konstrukte zur Analyse der 3'- und 5'-Transitivität im AX2 und im agnA- Stamm. P1-P4 geben die Bindepositionen der ^{32}P markierten Oligonukleotide an, die zum Nachweis der 21 nt langen GFP siRNAs in B und C eingesetzt wurden. P1 = DM146, P2 = DM147, P3 = DM126, P4 = SM058. **B:** Northern Blot Analyse der 3'- und 5'-Transitivität im AX2. Sekundäre *sense* (P1) und *antisense* (P2) GFP siRNAs wurden mit den angegebenen ^{32}P markierten Oligonukleotiden nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einer Sonde gegen die snoRNA DdR6 (#2654) hybridisiert. **C:** Vergleichende Analyse der 3'- und 5'-Transitivität im AX2 und im agnA-. Sekundäre *antisense* GFP siRNAs wurden mit P1 nachgewiesen. Die snoRNA DdR-6 diente auch hier als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle wurde RNA vom AX2 wt und von einem Stamm, der lediglich GFP exprimiert, verwendet. M = miRNA Marker

Im agnA- Stamm konnten hingegen keine sekundären GFP siRNAs nachgewiesen werden (vgl. Abb. 46C), was gleichermaßen für den rrpC- Stamm galt (Daten nicht gezeigt). Zu klären ist, ob AgnA und RrpC Komponenten eines Proteinkomplexes sind, der für die Generierung von sekundären siRNAs benötigt wird oder ob AgnA die Amplifikationsmaschinerie rekrutiert, was für das Argonautenhomolog Rde-1 aus *C. elegans* zutreffend ist (Pak et al. 2012).

4.2.11 Die Promotoraktivität der DIRS-1 ITRs im AX2 wt und im agnA- Stamm

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass AgnA für die posttranskriptionelle Regulation des DIRS-1 Retrotransposons im Cytoplasma notwendig ist. Das Protein ist essentiell für die Produktion von sekundären siRNAs, ohne die eine Mobilisierung des Elementes nicht mehr effizient inhibiert werden kann. Da ein gewisser Anteil des Proteins im Nukleoplasma nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 35), sollte überprüft werden, ob AgnA möglicherweise auch auf transkriptioneller Ebene an der Kontrolle von DIRS-1 beteiligt ist. Insbesondere in Pflanzen und in Pilzen sind RNAi-Signalwege bekannt, die die Ausbildung repressiver Chromatin-Modifikationen an Zielgenen oder an pericentromerischen Bereichen vermitteln (zusammengefasst in Castel et al. 2013).

DIRS-1 Retrotransposons kommen in *D. discoideum* ausschließlich in centromernahen Bereichen vor (Dubin et al. 2010). Darüber hinaus sind sie sowohl mit dem Heterochromatin-Zeiger H3K9me3 als auch mit dem Euchromatin-Zeiger H3K4me3 assoziiert (Dubin 2010) und werden im AX2 wt nachweislich transkribiert (Cohen et al. 1984). In *S. pombe* ist die Bildung von Heterochromatin in pericentromerischen Bereichen von ihrer Transkription abhängig, da der RITS Komplex an wachsende Pol-II Transkripte bindet und erst daraufhin die Kompaktierung auf Chromatinebene initiiert wird (Verdel et al. 2004, Buhler et al. 2006). In *D. discoideum* konnte eine transkriptionelle Kontrolle von DIRS-1 durch die RNAi-Maschinerie allerdings noch nicht nachgewiesen werden.

Um zunächst einen Eindruck von der Stärke der DIRS-1 ITR Promotoraktivität zu erhalten, wurde diese im AX2 wt analysiert und mit der eines *act15* Promotors im Kontext eines extrachromosomalen Plasmides verglichen. Dazu wurden die relevanten Sequenzen vor ein GFP-Reportergen kloniert und schließlich in *D. discoideum* exprimiert. Dass die rITR-Sequenz als Promotor aktiv ist, wurde bereits in einer früheren Publikation gezeigt (Wiegand et al. 2014).

Eine detaillierte Auswertung mit Western Blot gestützten Analysen hat ergeben, dass beide ITRs starke und vergleichbare Promotoraktivität besitzen: auf Proteinebene wurde relativ zur Verwendung eines *act15* Promotors eine doppelt so starke GFP Expression nachgewiesen (vgl. Abb. 47). Die Unterschiede waren auf mRNA-Level sogar noch deutlicher ausgeprägt (pers. Mitteilung von M. Friedrich, Abteilung Genetik, Universität Kassel).

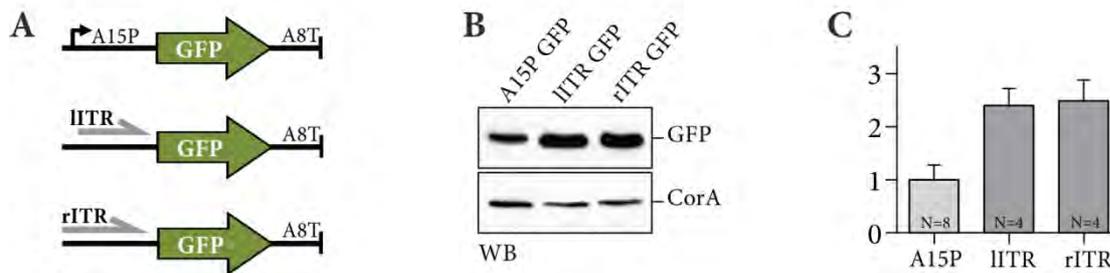


Abb. 47: Promotoraktivität der linken und der rechten ITR im AX2 wt.

A: Schematische Abbildung der verwendeten Expressionskassetten, um die Aktivität des *act15* Promotors und der DIRS-1 ITRs vergleichend zu analysieren. **B:** Western Blot zum Nachweis des Reporterproteins. GFP wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers immunologisch detektiert. Zur Bestätigung von gleichen Lademengen wurde das endogene Protein CorA nachgewiesen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzym HRP. Rechts: Quantifizierung der GFP Proteinmenge. Die Signale für GFP wurden gegen CorA referenziert und relativ zu der mit dem *act15* Promotor (A15P) generierten Proteinmenge (=1) aufgetragen. Fehlerbalken: Standardabweichung. Signifikanz: gepaarter t-Test, A15P/IITR $p < 0,0001$ (***) , A15P/rITR $p < 0,0001$ (***) .

Daraufhin wurde die Promotoraktivität der DIRS-1 ITRs im *agnA*- Stamm untersucht und mit der im AX2 Wildtyp verglichen. Es stellte sich heraus, dass diese sowohl auf Proteinebene (vgl. Abb. 48) als auch auf mRNA-Ebene (pers. Mitteilung von M. Friedrich, Abt. Genetik, Universität Kassel) identisch war. Somit konnte keine Beteiligung von *AgnA* an einer möglichen RNAi vermittelten transkriptionellen Kontrolle von DIRS-1 festgestellt werden.

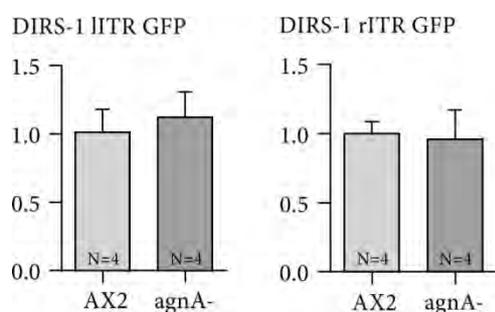


Abb. 48: Die DIRS-1 ITR Promotoraktivität *agnA*- Stamm

Quantifizierung unabhängiger Western Blots zur Analyse der DIRS-1 ITR getriebenen GFP-Expression im AX2 und *agnA*- Stamm. GFP und CorA wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der Nachweis erfolgte mit einem HRP gekoppelten Sekundärantikörper. Die GFP-Signale wurden gegen CorA referenziert und auf den Wildtyp normalisiert. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Die Tatsache, dass die ITRs eine vergleichbar starke Promotoraktivität hatten (vgl. Abb. 47C), legte die Vermutung nahe, dass bidirektionale DIRS-1 Transkripte doppelsträngige RNA-Moleküle ausbilden, die initial von einem Protein der Dicer-Familie prozessiert werden. In Übereinstimmung damit konnten DIRS-1 *antisense* Transkripte, wenn auch nur in geringer Menge, in *D. discoideum* nachgewiesen werden (Wiegand et al. 2014).

4.2.12 Bidirektionale Transkripte initiieren die Prozessierung von siRNAs

Um zu belegen, dass die siRNA Produktion durch die bidirektionale Promotoraktivität der DIRS-1 ITRs initiiert wird, wurde ein Reporterkonstrukt genutzt (vgl. Abb. 49A). Dieses war so aufgebaut, dass das Gen für GFP von den beiden DIRS-1 ITRs flankiert wurde (pDM304 ITR GFP rITR, vgl. 2.17.2). Das Konstrukt wurde in den AX2 wt und gleichzeitig in den *agnA*- Stamm transformiert. Letzterer sollte Aufschluss darüber geben, ob die Produktion von sekundären siRNAs bei einem vergleichsweise kleinen *Trigger* wie GFP überhaupt eine Rolle spielt. Schließlich wurde in jedem Stamm die GFP-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene sowie die GFP-abhängigen siRNAs untersucht.

Durch Northern Blot Analysen konnten GFP siRNAs im Wildtyphintergrund nachgewiesen werden, die in der *agnA* Mutante sehr stark abgereichert waren (vgl. Abb. 49B). Das entsprach ungefähr dem, was in früheren Untersuchungen auch für die endogenen DIRS-1 siRNAs gezeigt werden konnte (Boesler et al. 2014). Sobald entweder die linke oder die rechte DIRS-1 ITR als Promotor eingesetzt und die GFP-Expression von einem *act8*-Terminator beendet wurde, waren im Wildtyphintergrund keine siRNAs nachweisbar (vgl. Abb. 49B). Diese Beobachtung war ein erster Hinweis darauf, dass die bidirektionale Transkription des Reportergens für die Bildung und Akkumulierung der detektierten siRNAs entscheidend ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *gfp*-Transkripte im Wildtyp- und im *Knockout*-Hintergrund untersucht. In beiden Stämmen waren GFP *sense* und *antisense* Transkripte in äquivalenten Mengen nachweisbar, was die bidirektionale Transkription des Reportergens belegte. Allerdings akkumulierten sie deutlich stärker im Hintergrund des *agnA*- Stammes (vgl. Abb. 49C). Diese Northern Blot Analysen wurden in Kooperation mit M. Friedrich (Abt. Genetik Universität Kassel) durchgeführt (Friedrich et al. 2015).

Obwohl *sense* und *antisense* GFP-Transkripte in ähnlichen Mengen akkumulierten und diese als dsRNA ein optimales Dicer-Substrat darstellen, überwogen im Wildtyphintergrund die *agnA*-abhängigen sekundären GFP-siRNAs. Das ging deutlich aus dem Vergleich zur *agnA*-Mutante hervor, in deren Hintergrund nur wenige dieser siRNAs detektierbar waren (vgl. Abb. 49, B-C).

Wie einleitend beschrieben, sind Proteine der RdRP-Familie für die Synthese sekundärer siRNAs verantwortlich (vgl. 1.4.4). Wenn sie kleine einzelsträngige siRNAs anhand einer *Template*-RNA synthetisieren, besitzen diese in der Regel ein Triphosphat am 5'-Ende (Sijen et al. 2007). Generieren RdRPs hingegen eine längere dsRNA, die daraufhin durch ein Enzym der Dicer Familie prozessiert wird, weisen die siRNAs typischerweise ein 5'-Monophosphat auf (Bernstein et al. 2001).

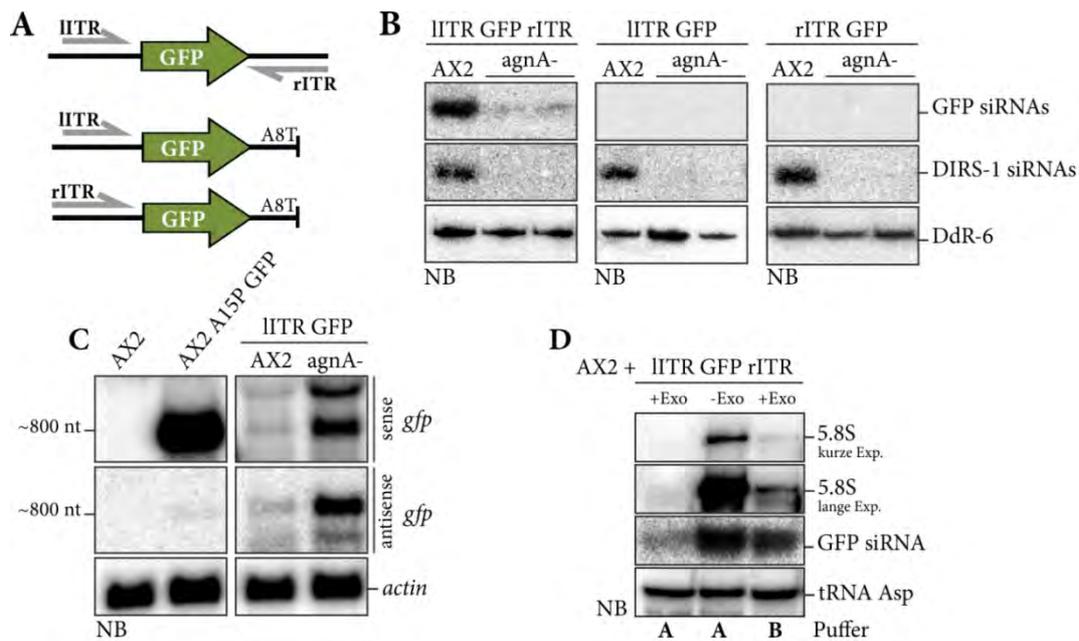


Abb. 49: DIRS-1 ITRs initiieren die Produktion von siRNAs und die Stilllegung eines Reportergens

A: Oben: Schematische Abbildung des Konstruktes, das zur Untersuchung der initialen siRNA Produktion genutzt wurde. Mitte, unten: Reporterkonstrukte, die im Kontext der Northern Blot Analysen in B der Kontrolle dienen. **B:** Northern Blot zum Nachweis von GFP-siRNAs. Die Detektion erfolgte mit Hilfe der ^{32}P markierten Oligonukleotide DM146 und SM058. Nur wenn das Reportergen von beiden DIRS-1 ITRs flankiert wurde, akkumulierten GFP-siRNAs im Wildtyphintergrund. Im Kontext des *agnA*- Stammes waren nur wenige GFP-siRNAs detektierbar. Zum Vergleich wurden endogene DIRS-1 siRNAs und als Ladekontrolle die snoRNA DdR6 mit den ^{32}P markierten Oligonukleotides #2599 und #2654 nachgewiesen. **C:** Northern Blot Analyse zum Nachweis von GFP-Transkripten. Mit den ^{32}P markierten Oligonukleotiden SM058 und DM146 wurden *sense* bzw. *antisense* GFP-Transkripte detektiert. In beiden Stämmen waren bidirektionale Transkripte nachweisbar, die im Hintergrund der *agnA*-Mutante akkumulierten. Ihre heterogene Länge kann womöglich durch unterschiedliche Polyadenylierungssignale in den DIRS-1 ITRs erklärt werden. Als Kontrolle diente die RNA eines Stammes, der ein vom *act15* Promotor (A15P) getriebenes Gen für GFP exprimiert. **D:** Je 10 μg Gesamt-RNA aus dem Stamm AX2 IITR GFP rITR wurden mit der TerminatorTM 5'-Phosphat abhängigen Exonuclease in Puffer A und in Puffer B verdaut. Die Proben wurden gemeinsam mit 10 μg unverdauter RNA in einem PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. GFP-siRNAs wurden wie in B beschrieben detektiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich die 5.8 S RNA und die tRNA-Asp mit den ^{32}P markierten Oligonukleotiden BB010 und SM005 nachgewiesen.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, welcher Amplifikationsmechanismus in *D. discoideum* vorkommt, sollte der Anteil an GFP-siRNAs mit einem Mono- oder Triphosphat am 5'-Ende bestimmt werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus dem Wildtyphintergrund mit einer Exonuclease verdaut, die erstere spezifisch degradiert. Anschließend wurde ein Northern Blot durchgeführt, um jene RNAs zu detektieren, die aufgrund ihres 5'-Endes resistent gegen den Verdau waren. Als Positivkontrolle wurde die 5.8S ribosomale RNA nachgewiesen, die von der Exonuclease vollständig abgebaut werden sollte. Der Nachweis der tRNA-Asp diente hingegen als

Negativkontrolle. Der Verdau wurde in zwei verschiedenen Puffern durchgeführt. Der Standardpuffer A erlaubt die effiziente Degradation von RNAs mit einem 5'-Monophosphat. In geringem Umfang können allerdings auch RNA-Moleküle mit anderen 5'-Enden unspezifisch degradiert werden. In Puffer B hat die Exonuclease zwar eine höhere Spezifität aber auch eine geringerer Effizienz.

Unter Verwendung von Puffer A wurde die 5.8 S rRNA vollständig degradiert. Gleichzeitig war eine geringe Menge an GFP siRNAs detektierbar, die vermutlich aufgrund eines Triphosphats am 5'-Ende nicht abgebaut werden konnte. In Puffer B war ein robustes Signal für die GFP-siRNAs nachweisbar. Allerdings war der Verdau der ribosomalen RNA nicht vollständig. Vergleicht man aber das jeweilige Signal mit dem in der unverdauten Kontrolle, dann war die Reduktion der ribosomalen RNAs weitaus stärker als die der GFP-siRNAs. Auch das deutete darauf hin, dass einige der regulatorischen RNAs aufgrund ihres 5'-Endes resistent gegen den Verdau waren.

Die Unterschiede in der GFP-Expression waren auf Proteinebene noch stärker ausgeprägt. Im Wildtyphintergrund konnte mit Hilfe von Western Blot Analysen annähernd kein GFP-Signal mehr nachgewiesen werden. Hingegen war im *agnA*- Hintergrund ein deutliches Signal detektierbar (vgl. Abb. 50). Das GFP Reporterprotein akkumulierte allerdings bei weitem nicht so stark wie in einem Stamm, bei dem das Gen für GFP von einem *act15* Promotor getrieben und seine Transkription von einem *act8* Terminator beendet wurde; hier konnte eine 9-mal stärkere GFP-Expression gemessen werden (vgl. Abb. 50).

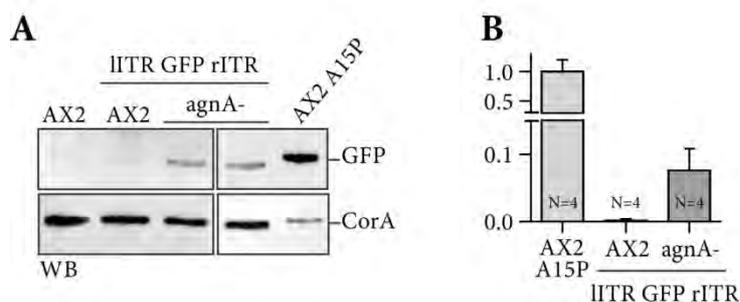


Abb. 50: Expression des GFP-Reporterproteins im AX2 wt und im *agnA*- Hintergrund

A: Western Blot zum Nachweis der GFP-Reporterexpression im AX2 wt und im *agnA*- Hintergrund. Proteinlysate aus dem AX2 wt dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle und zum quantitativen Vergleich wurde Proteinlysate eines Stammes verwendet, dessen GFP-Expression von einem *act15* Promotor getrieben wurde. Um eine Detektion im linearen Bereich zu gewährleisten, wurde von diesem Stamm weniger Material geladen. Der immunologische Nachweis von GFP und CorA (Ladekontrolle) erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Die Proteinbanden wurden in einer enzymatischen Reaktion durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym HRP detektiert. **B:** Die GFP-Expression der angegebenen Stämme wurde anhand zweier unabhängiger Western Blots quantifiziert, indem die Signale für GFP gegen CorA referenziert und auf den Stamm AX2 A15P GFP normalisiert wurden. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Signifikanz: gepaarter t-Test: AX2 A15P GFP/AX2 IITR GFP rITR $p = 0,002$ (**), AX2 A15P GFP/agnA-IITR GFP rITR $p = 0,0033$ (**), AX2 IITR GFP rITR/agnA-IITR GFP rITR $p = 0,0209$ (*).

Zusammenfassend haben die Untersuchungen an dem Reporterkonstrukt gezeigt, dass die von DIRS-1 ITR initiierte bidirektionale Transkription die Produktion von siRNAs induzieren kann. Die AgnA-abhängige Amplifikation dieser siRNAs ist zudem für die Stilllegung des GFP-Reportergens *in cis* entscheidend.

Die Arbeit an diesem Reporterkonstrukt hat ferner die Frage aufgeworfen, ob man in *D. discoideum* eine einfache, auf dem Retroelement basierende *Knockdown*-Strategie etablieren kann. In Kooperation mit M. Friedrich und I. Schuster (Abteilung Genetik, Universität Kassel) wurde das GFP-Reportergen durch *Trigger* ersetzt, die homolog zu endogenen mRNAs waren. Auf diese Weise wurde die Produktion genspezifischer siRNAs initiiert, die *in trans* verlässlich einen *Gen-Knockdown* vermitteln konnten (Friedrich et al. 2015). Diese Strategie wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich angewendet, um die Expression des Serrate Homologes SrtA zu reduzieren (vgl. 4.1.7).

5 Diskussion

5.1 Die miRNA Prozessierung in *D. discoideum*

Die miRNA Prozessierung ist in mehrzelligen Tieren und in Pflanzen in den vergangenen Jahren detailliert untersucht worden. In der Regel werden miRNAs von Proteinen der RNase III-Familie und ihren dsRBP-Interaktionspartnern in zwei Schritten aus längeren Vorläufermolekülen generiert (zusammengefasst in Bologna et al. 2013). Wie einleitend beschrieben, bestehen jedoch signifikante Unterschiede in Bezug auf die genutzten Zellkompartimente und die im Detail beteiligten Proteine. Im Vergleich zu Tieren (Opisthokonta) und Pflanzen (Archaeplastida) ist verhältnismäßig wenig über die miRNA Prozessierung in Organismen bekannt, die zu der eukaryotischen Supergruppe der Amoebozoa gehören, wobei *D. discoideum* ein prominenter Vertreter ist (Adl et al. 2012). Bisher konnten in der Amöbe 17 miRNAs identifiziert werden, für deren Akkumulierung das Dicer-Homolog DrnB notwendig ist (Hinas et al. 2007, Avesson et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte RbdB als weitere notwendige Komponente in der miRNA Prozessierung von *D. discoideum* identifiziert werden. RbdB lokalisiert im Zellkern, weist perinukleoläre Anreicherungen auf und ist an der Prozessierung von pri-miRNAs beteiligt. Im Folgenden sollen die Erkenntnisse zur miRNA-Prozessierung in der Amöbe vor dem Hintergrund der charakteristischen Prozessierungswege in Tieren und Pflanzen diskutiert werden.

Fides Zenk und Jann Buttler haben Teilaspekte meines Dissertationsthemas untersucht (Buttler 2013, Zenk 2014). Den Studierenden standen aktuelle Daten und Materialien meiner Arbeit zur Verfügung. Auf die Ergebnisse, die entsprechend gekennzeichnet sind, wird im Rahmen der Diskussion deshalb häufiger Bezug genommen.

5.1.1 Kompartimente und beteiligte Proteine

Da es sich bei DrnB aus *D. discoideum* um ein kernlokalisiertes Protein handelt, das für die miRNA-Prozessierung essentiell ist (Hinas et al. 2007, Dubin et al. 2010), lag die Vermutung nahe, dass es an der Umsetzung von pri-miRNAs beteiligt ist. In Übereinstimmung damit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass primäre miRNA-Transkripte im Hintergrund des drnB- Stammes angereichert sind (vgl. Abb. 18). DrnA ist das zweite Dicer-Homolog, das im Genom der Amöbe kodiert ist. Allerdings ist unklar, ob das im Cytoplasma lokalisierte Protein eine Funktion in der miRNA-Prozessierung wahrnimmt: entsprechende Untersuchungen stehen auch deshalb aus, weil es sich bei *drnA* vermutlich um ein essentielles Gen handelt, dessen *Knockout* letal ist (Kruse 2014).

Um dsRBPs zu identifizieren, die in *D. discoideum* an der miRNA-Prozessierung beteiligt sind, wurde die Proteindatenbank mit Hilfe des BLAST-Algorithmus nach relevanten Kandidaten durchsucht. Allerdings konnten keine Proteine identifiziert werden, die homolog zu DGCR8 bzw. Pasha aus dem tierischen Mikroprozessorkomplex oder zu HYL1 aus *A. thaliana* waren. Gleiches galt für cytoplasmatische dsRBPs wie Loqs aus *D. melanogaster* oder das humane TRBP, die verschiedene Aufgaben innerhalb des miRNA-Signalweges wahrnehmen (Chendrimada et al. 2005, Forstemann et al. 2005, Haase et al. 2005).

Um weniger konservierte dsRBPs zu finden, die womöglich äquivalente Funktionen erfüllen, wurde die Datenbank InterPro genutzt (Hunter et al. 2012). Auf diese Weise wurden alle in *D. discoideum* kodierten Proteine mit dsRBDs erfasst (vgl. Tab. 15). Der Pool konnte auf wenige relevante Kandidaten eingegrenzt werden und enthielt neben Dhx9 und Helf, die durch mehrere funktionelle Domänen charakterisiert waren, die Proteine RbdA und RbdB. Letztere waren besonders interessant, da sie neben der einzelnen dsRBD keine weiteren Proteindomänen enthielten. Das ist ein typisches Merkmal für dsRBPs, die an der miRNA Prozessierung in Tieren und Pflanzen beteiligt sind, auch wenn diese im Gegensatz zu RbdA und RbdB in der Regel mehrere dsRBDs enthalten (vgl. 1.4.2).

Nachdem *rbdA* und *rbdB* *Knockout*-Stämme generiert wurden, stellte sich heraus, dass RbdB aber nicht RbdA für die Akkumulierung maturer miRNAs in *D. discoideum* notwendig war (vgl. Abb. 17).

5.1.1.1 RbdB: eine nukleäre Proteinkomponente in der miRNA-Prozessierung

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von RbdB GFP zeigten, dass es sich um ein kernlokalisiertes Protein handelt (vgl. Abb. 19 und Abb. 20), das genau wie DrnB an der Prozessierung von pri-miRNAs beteiligt ist. RT-PCR-Analysen demonstrierten, dass die entsprechenden Vorläufermoleküle ebenfalls in *rbdB*- Stämmen akkumulierten (vgl. Abb. 18).

Der *Knockdown* von Drosha oder seines dsRBP-Partners DGCR8 hat in humanen Zelllinien ebenfalls eine Anreicherung von pri-miRNAs sowie eine Abreicherung von pre- und maturen miRNAs zur Folge (Lee et al. 2003, Gregory et al. 2004, Han et al. 2004). Ähnliche Beobachtungen konnten in *A. thaliana* bei der Analyse von *dcl1-9* oder *hyl1-2* Mutanten gemacht werden (Han et al. 2004, Kurihara et al. 2004, Vazquez et al. 2004, Kurihara et al. 2006).

Genau wie DCL1 und HYL1 in Pflanzen (Kurihara et al. 2006, Fang et al. 2007) oder Drosha und sein spezifischer dsRBP-Partner im tierischen Mikroprozessor (Denli et al. 2004, Gregory et al. 2004, Han et al. 2004, Landthaler et al. 2004) interagieren DrnB und RbdB im Kern von

D. discoideum (Zenk 2014). Letzteres wurde von F. Zenk im Rahmen der zitierten Arbeit durch Co-IP und *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) Analysen nachgewiesen.

Die generelle Beobachtung, dass sowohl RNase III Enzyme als auch ihre dsRBP-Bindungspartner für die miRNA Prozessierung notwendig sind, trifft somit nicht nur auf Vertreter der Opisthokonta und Archaeplastida, sondern auch auf *D. discoideum* als Mitglied der Amoebozoa zu. Da RbdB abgesehen von seiner dsRBD jedoch keine ausgeprägte Homologie zu HYL1 aus *A. thaliana* oder zu DGCR8/Pasha aus dem tierischen Mikroprozessor aufweist, sind weitere Analysen notwendig, um seine Funktion im Rahmen der miRNA-Prozessierung aufzuklären.

5.1.1.2 Werden cytoplasmatische Proteine für die miRNA-Prozessierung benötigt?

Die bisherigen Erkenntnisse zur miRNA-Prozessierung in *D. discoideum* weisen auf die Existenz eines kernlokalisierten Proteinkomplexes hin, der RbdB und DrnB beinhaltet. Jedoch konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob dieser Komplex beide Schritte der miRNA-Prozessierung übernimmt oder ob darüber hinaus ein cytoplasmatischer Komplex notwendig ist, der ähnlich wie in Tieren für die pre-miRNA-Prozessierung verantwortlich ist. Erkenntnisse, die für oder gegen die Beteiligung cytoplasmatischer Proteine sprechen, sollen im Folgenden kurz dargelegt werden.

Von den relevanten Kandidaten mit dsRBDs aus *D. discoideum* lokalisieren lediglich RbdA (Daten nicht gezeigt) und partiell auch Helf im Cytoplasma der Zellen (Moog 2011). Im rbdA- und helf-Hintergrund ist die miRNA-Prozessierung jedoch nicht beeinträchtigt (Moog 2011 und Abb. 17). Somit ist kein cytoplasmatisches dsRBP für die Akkumulierung von miRNAs in *D. discoideum* essentiell. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Prozessierung in der Amöbe zumindest von der in *D. melanogaster*, wo Loqs zur effizienten Generierung maturer miRNAs beiträgt (Forstemann et al. 2005). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass DrnA, genau wie der humane Dicer, eine essentielle Funktion in der miRNA-Prozessierung innehat, ohne dass die Interaktion mit einem dsRBP-Bindungspartner dafür essentiell ist (Chendrimada et al. 2005, Haase et al. 2005). Ob RbdA oder womöglich auch Helf eine Funktion bei der Beladung von miRNA-Effektorkomplexen haben, was für TRBP zutreffend ist, ist ebenfalls nicht bekannt (Chendrimada et al. 2005, Haase et al. 2005). Auch ein experimenteller Nachweis, dass DrnA überhaupt mit einem cytoplasmatischen dsRBP assoziiert ist, konnte bisher nicht erbracht werden, obwohl intensive Untersuchungen zur Identifikation von DrnA-Interaktionspartnern durchgeführt wurden (Kruse 2014). Letztendlich muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass andere Proteine mit dsRNA-Affinität die Funktion eines cytoplasmatischen dsRBPs kompensieren und DrnA – sofern das RNase III Enzym an der miRNA-Prozessierung beteiligt ist – assistieren.

Die Frage, ob DrnB und RbdB für beide Schritte der miRNA-Biogenese notwendig sind, oder ob sie lediglich die Prozessierung von pri-miRNAs vermitteln, könnte in Zukunft mit Hilfe rekombinant aufgereinigter Proteine *in vitro* untersucht werden. In Pflanzen und Tieren haben solche Analysen maßgeblich zur Aufklärung der miRNA-Prozessierung beigetragen.

Drosha und DGCR8 sind ausreichend, um die Prozessierung von pri- zu pre-miRNAs zu vermitteln, wobei DGCR8 für die Genauigkeit und Effizienz der Reaktion entscheidend ist (Gregory et al. 2004, Han et al. 2006, Yeom et al. 2006, Nguyen et al. 2015). Mature miRNAs können im Anschluss durch die weitere Zugabe von Dicer generiert werden (Gregory et al. 2004). Das an der miRNA Prozessierung beteiligte Dicer-Homolog DCL1 aus *A. thaliana* kann 21 nt lange RNAs aus längeren dsRNA-Molekülen oder aus pri-miRNA Vorläufern prozessieren (Dong et al. 2008). Dong et al. stellten jedoch fest, dass DCL1 die pri-miRNAs überwiegend falsch prozessiert: Erst durch die Anwesenheit von HYL1 und/oder Serrate (SE) konnte die präzise Biogenese maturer miRNAs erreicht werden.

Solche Prozessierungsassays sind mit Proteinen aus *D. discoideum* bisher nur eingeschränkt möglich. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die dsRBD von RbdB, aber nicht das vollständige Protein rekombinant herzustellen (vgl. Kapitel 3.3.10). Ähnliches gilt für DrnB: Hier stehen die RNase III Domänen für *in vitro* basierte Untersuchungen zur Verfügung (Kruse 2014).

Die DrnB eigenen RNase III Domänen waren nicht in der Lage, perfekte dsRNA Substrate zu schneiden; allerdings prozessierten sie den *Precursor* von ddi-miR-1176 in eine dominante ~50 nt lange RNA, aber nicht in mature miRNAs der richtigen Sequenz (Kruse 2014). Dieses Prozessierungsmuster änderte sich nicht, wenn zusätzlich die dsRBD von RbdB im Ansatz enthalten war (pers. Mitteilung von J. Kruse, Abt. Ribogenetics, Jacobs-Universität Bremen).

Diese Ergebnisse können als ein Hinweis darauf interpretiert werden, dass ein anderer Proteinkomplex an der Prozessierung von pre-miRNAs beteiligt ist. Gleichmaßen könnte man argumentieren, dass die pre-miRNA Prozessierung deshalb fehlschlägt, weil die Funktion der trunkierten Proteine beeinträchtigt ist. Möglicherweise gelingt es in Zukunft, RbdB und DrnB erfolgreich in Insekten- oder Säugerzellen zu exprimieren und in ausreichender Menge aufzureinigen, was im Fall des humanen Drosha beispielsweise gut funktioniert (Nguyen et al. 2015). Dann könnten die Prozessierungsassays mit den vollständigen Proteinen wiederholt werden. Sollte auch dann eine pre-miRNA-Prozessierung fehlschlagen, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der kernlokalisierte Komplex in *D. discoideum* weitere entscheidende Proteinkomponenten enthält.

Es sind also weitere Analysen notwendig, um zu klären, ob die miRNA-Prozessierung in der Amöbe von einem einzigen kernlokalisierten Komplex abhängig ist, oder ob darüber hinaus ein cytoplasmatischer Prozessierungsschritt und dort ansässige Proteine notwendig sind.

5.1.2 Der kernlokalisierte miRNA-Prozessierungskomplex in *D. discoideum*

Da RbdB für die nukleäre Prozessierung von miRNAs in *D. discoideum* essentiell ist, lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf der funktionellen Charakterisierung des Proteins. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die charakteristische Verteilung von RbdB im Kern für die Prozessierung von miRNAs relevant ist.

5.1.2.1 Subnukleäre Lokalisation von RbdB –

Implikationen für die miRNA-Prozessierung

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von RbdB GFP haben gezeigt, dass das Protein diffus im Nukleoplasma verteilt war und darüber hinaus perinukleoläre Anreicherungen bildete (vgl. Abb. 19). Diese subnukleären Strukturen erinnerten an die aus *A. thaliana* bekannten *D-Bodies*, in denen Proteine wie DCL1 oder HYL1, die für die miRNA-Prozessierung in Pflanzen relevant sind, co-lokalisieren und interagieren (Fang et al. 2007, Song et al. 2007). HYL1 und DCL1 zeigen eine vollständige Überlagerung in diesen Strukturen, was ebenfalls für RbdB und DrnB zutreffend ist (Fang et al. 2007, Kruse 2014, Zenk 2014). Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass pflanzliche *D-Bodies* außerdem typische *Cajal-Body* Marker wie Atcoilin enthalten, von denen man weiß, dass sie für die Integrität dieser Strukturen verantwortlich sind (Collier et al. 2006, Pontes et al. 2013). Weil darüber hinaus auch SE und pri-miRNAs in *D-Bodies* vorkommen, geht man davon aus, dass es sich um Orte der pflanzlichen miRNA-Prozessierung handelt (Fang et al. 2007). Die Lokalisation des tierischen Mikroprozessors wird allgemein als kernlokalisiert beschrieben (zusammengefasst in Lee et al. 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der humane Drosha und sein DGCR8 Bindungspartner zumindest partiell in Nukleoli co-lokalisieren (Shiohama et al. 2007). Da RbdB und DrnB jedoch eine perfekte Überlagerung aufweisen (Kruse 2014, Zenk 2014) und die Foci genau wie in *A. thaliana* eher in der Peripherie der Nucleoli zu finden sind, bestehen insgesamt größere Parallelen zu den pflanzlichen *D-Bodies* (Fang et al. 2007). Dennoch muss man konstatieren, dass *D. discoideum* kein typisches Coilin-Homolog kodiert und *Cajal-Body* ähnliche Strukturen bisher nicht beschrieben wurden.

Die distinkte Lokalisation von RbdB und DrnB legte ebenfalls die Vermutung nahe, dass primäre miRNAs in den perinukleolären Foci prozessiert werden. Funktionelle Untersuchungen an DrnB bekräftigen diese Hypothese: Eine DrnB-Variante, bei der das NLS deletiert wurde, war zwar im

Kern nachweisbar, zeigte aber keine Nukleoli assoziierte Akkumulierung (Kruse 2014). Gleichzeitig war das Protein nicht mehr in der Lage, die miRNA-Prozessierung im drnB- Stamm zu kompensieren (Kruse 2014). Vor diesem Hintergrund sollte überprüft werden, ob spezifische Signalsequenzen im Kontext von RbdB ebenfalls für seine subnukleäre Lokalisation relevant sind. Am C-terminus des Proteins konnten zwei sich überlappende Kernlokalisierungssignale und eine NoLS-Sequenz identifiziert werden. Das längere NLS (NLS2) war ausreichend, um ein GFP-Reportergen in den Kern zu transportieren. Die Sequenz alleine vermittelte allerdings keine spezifische Anreicherung in perinukleolären Foci. Auch in Kombination mit der NoLS-Sequenz konnte lediglich eine diffuse Verteilung des Reporterproteins im Nucleoplasma beobachtet werden (vgl. Abb. 22). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Signalsequenzen im Kontext von RbdB trotzdem zu seiner spezifischen Verteilung im Kern beitragen.

Im Zuge der funktionellen Analyse von RbdB wurden konservierte Aminosäuren innerhalb seiner dsRBD mutiert. Obwohl die verschiedenen Mutanten allesamt funktionell waren, konnte doch eine veränderte nukleäre Lokalisation festgestellt werden: Die Proteine zeigten nur selten eine deutliche Anreicherung in Nukleoli-assoziierten Strukturen. Vielmehr waren sie diffus im Nucleoplasma und in den Nukleoli verteilt (vgl. Abb. 29). Die Beobachtung, dass dsRBDs die spezifische Verteilung eines Proteins beeinflussen, konnte auch im Kontext anderer Proteine gemacht werden: So ist bekannt, dass die zweite dsRBD aus DCL1 für die spezifische Lokalisation in pflanzlichen *D-Bodies* ausreichend ist, was gleichermaßen für die erste dsRBD von HYL1 gilt (Fang et al. 2007, Liu et al. 2013). Eine trunkeerte Variante von DGCR8, bei der die C-terminalen dsRBDs deletiert wurden, ist nicht mehr in den Nukleoli nachweisbar (Shiohama et al. 2007). Die Autoren spekulieren, dass die dsRBDs die Interaktion mit Proteinen oder RNA-Molekülen vermitteln und so zur lokalen Anreicherung von DGCR8, HYL1 oder DCL1 beitragen (Fang et al. 2007, Shiohama et al. 2007, Liu et al. 2013).

Da einzelne Punktmutationen in der RbdB-eigenen dsRBD von *D. discoideum* keinen negativen Einfluss auf die miRNA-Prozessierung haben, ist davon auszugehen, dass dadurch weder die Interaktion mit DrnB noch eine mögliche Bindung von pri-miRNAs beeinträchtigt ist. Die Ergebnisse stellen somit in Frage, ob die pri-miRNA Prozessierung tatsächlich in den perinukleolären Foci stattfindet. Denkbar ist, dass RbdB und DrnB dort lediglich gelagert werden und pri-miRNAs im Nucleoplasma prozessiert werden. Gleichzeitig kann nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen der mutierten RbdB Varianten nach wie vor in den Nukleoli assoziierten Strukturen vorkommen und dort zur miRNA-Prozessierung beitragen.

5.1.2.2 Funktionelle Charakterisierung von RbdB –

Implikationen für die miRNA-Prozessierung

Die ektopische Expression von RbdB GFP im rbdB- Stamm konnte den Phänotyp in der miRNA-Prozessierung vollständig kompensieren. Die Northern Blot basierte Quantifizierung maturer miRNAs ergab, dass die Expression in den *Rescue*-Stämmen und im AX2 wt identisch war (vgl. Abb. 27). Darauf aufbauend konnten im Rahmen dieser Arbeit und in den Untersuchungen von Buttlar 2013 und Zenk 2014 funktionelle Analysen mit trunkierten oder mutierten Varianten des RbdB Proteins durchgeführt werden.

Es stellte sich heraus, dass eine Region im C-terminalen Bereich des Proteins, die reich an der Aminosäure Prolin ist (*P-rich site*), für die Funktionalität des Proteins *in vivo* entbehrlich ist (Buttlar 2013). Drosha Homologe sind ebenfalls durch eine solche *P-rich site* gekennzeichnet (Doyle et al. 2012). Auch dieses Sequenzmotiv ist im Kontext des tierischen Mikroprozessors verzichtbar (Han et al. 2004). Eine RbdB-Proteinchimäre, in der die dsRBD durch die von DrnB ersetzt wurde, war außerdem in der Lage, die miRNA-Prozessierung im rbdB- Stamm zu kompensieren (Zenk 2014). Die beiden Proteindomänen unterscheiden sich in 10 Aminosäuren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daraufhin einzelne Aminosäuren der RbdB-eigenen dsRBD mutiert, die ebenfalls in der von DrnB vorkamen und die in kanonischen Domänen dieser Art konserviert sind. Es handelte sich um die Aminosäuren Y27, H36 und K59/K60, die jeweils gegen ein Alanin ersetzt wurden. Es ist bekannt, dass die entsprechenden Aminosäuren entweder direkt oder indirekt zur Bindung von dsRNA beitragen: Das aromatische Tyrosin positioniert beispielsweise mehrere positiv geladene Aminosäuren, die wiederum direkte Interaktionen zum dsRNA Substrat eingehen. Von dem entsprechenden Histidin weiß man, dass es die kleine Furche einer dsRNA bindet. Die beiden nebeneinander liegenden Lysine sind Teil eines konservierten Sequenzmotives, das zur Bindung des Zucker-Phosphat-Rückgrats innerhalb der großen Furche beiträgt (Masliah et al. 2013). Verschiedene *in vitro* basierte Studien haben zudem belegt, dass die Mutation der genannten Aminosäuren die Affinität kanonischer dsRBDs zu dsRNA Substraten zumindest in gewissem Umfang verringert (Ramos et al. 2000, Sohn et al. 2007, Yang et al. 2010).

Was die funktionellen Analysen der entsprechenden RbdB-Mutanten betrifft, so hatte der Austausch der einzelnen Aminosäuren keinen gravierenden Effekt auf die Funktion des Proteins *in vivo*. Im Vergleich zum Wildtyp wurden keine Unterschiede in der Menge maturer miRNAs gefunden (vgl. Abb. 30). Es ist bekannt, dass mehrere Aminosäuren innerhalb einer dsRBD Kontakte zum Substrat eingehen und die Mutation einzelner Reste zum Teil nur marginale Effekte auf die dsRNA-Bindung *in vitro* hat (Sohn et al. 2007, Yang et al. 2010). Möglicherweise sind die

einzelnen RbdB-Mutanten deshalb in der Lage, den Phänotyp in der miRNA-Prozessierung zu retten. Dennoch waren diese Ergebnisse überraschend.

So besitzt RbdB im Gegensatz zu HYL1 aus *A. thaliana* oder zu DGCR8 aus dem humanen Mikroprozessorkomplex lediglich eine dsRBD. Erste Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass RbdB nicht als Dimer vorkommt (Zenk 2014). Was DGCR8 betrifft, so tragen zwei dsRBDs zur pri-miRNA Bindung bei (Sohn et al. 2007). HYL1 verfügt seinerseits über eine kanonische und eine nicht kanonische dsRBD: während die eine die Substratbindung vermittelt, ist die andere vermutlich für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich (Yang et al. 2010). In beiden Fällen wird durch die Präsenz zweier dsRBDs die Affinität zum Substrat vermutlich erhöht. Aus Tieren und Pflanzen ist zudem bekannt, dass die in Drosha und DCL1 vorkommenden dsRBDs für die miRNA-Prozessierung essentiell sind (Han et al. 2004, Kurihara et al. 2006). Die Feststellung, dass die DrnB-eigene dsRBD für die Produktion von miRNAs in *D. discoideum* entbehrlich ist, war deshalb überraschend (Kruse 2014). Das bedeutet gleichermaßen, dass gemäß dem aktuellen Erkenntnisstand keine andere dsRBD eine (wenn auch marginale) Beeinträchtigung der RbdB-eigenen dsRBD kompensiert.

Aus Tieren und Pflanzen ist bekannt, dass dsRBPs für eine effektive und akkurate Prozessierung von miRNAs im Kern notwendig sind (Dong et al. 2008, Nguyen Ba et al. 2009). Im Fall von RbdB kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Mutanten die Genauigkeit der miRNA-Prozessierung beeinträchtigen. Die Northern Blot Analysen zeigen jedoch, dass die miRNAs nach wie vor eine charakteristische Länge von ~21 nt haben. Um zu überprüfen, ob der Startpunkt variiert, müssten die Produkte allerdings sequenziert werden.

Möglicherweise sind weitere Proteinkomponenten im Kern, die eine Affinität zu pri-miRNAs haben, an der miRNA-Prozessierung in *D. discoideum* beteiligt. Die Immunopräzipitation von RbdB und die massenspektrometrische Analyse der assoziierten Proteine wäre eine geeignete Strategie, um diese Frage zu klären. Jedoch stellte es sich bereits als problematisch heraus, RbdB in ausreichender Menge an eine Affinitätsmatrix zu koppeln (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Beobachtungen können für DrnB gemacht werden (Kruse 2014).

Aus *A. thaliana* ist bekannt, dass neben HYL1 das Zinkfingerprotein SE für eine effiziente und akkurate miRNA-Prozessierung im Kern notwendig ist (Lobbes et al. 2006, Yang et al. 2006, Dong et al. 2008). Außerdem sind Proteine des CAP-Bindekomplexes genau wie RNA bindende Proteine beteiligt, die pri-miRNAs stabilisieren und vermutlich zu den Orten ihrer Prozessierung rekrutieren (Laubinger et al. 2008, Yu et al. 2008, Ren et al. 2012, Wu et al. 2013).

Da in *D. discoideum* ein SE-Homolog (SrtA) identifiziert werden konnte, sollte eine mögliche Beteiligung an der miRNA-Prozessierung untersucht werden. In *A. thaliana* lokalisiert SE partiell

in *D-Bodies* und interagiert dort mit HYL1 oder DCL1 (Fang et al. 2007). Im Gegensatz dazu war SrtA diffus im Nukleoplasma verteilt und von den Nukleoli ausgespart. Es stellte sich außerdem heraus, dass ddi-miR-1176 und ddi-miR-7097 in srtA [RNAi] Stämmen akkumulierten (vgl. Kapitel 4.1.7). Da Zinkfingerproteine mitunter in der Lage sind, dsRNA zu binden (Hall 2005), fungiert SrtA möglicherweise als Negativregulator und verhindert durch die Interaktion mit pri-miRNAs deren Prozessierung. Es ist aber auch denkbar, dass es sich bei der Akkumulation der maturen miRNAs um einen indirekten Effekt handelt. Wenn SrtA-Interaktionspartner, die eine förderliche Funktion in der miRNA-Prozessierung haben, im *Knockdown*-Stamm vermehrt für diese Aufgabe zur Verfügung stehen, könnte auch das den beobachteten Phänotyp erklären.

5.1.3 Modell zur miRNA-Prozessierung in *D. discoideum*

Genau wie bei Vertretern der Archaeplastida und der Opisthokonta ist in *D. discoideum* ein kernlokalisierter Proteinkomplex an der miRNA-Prozessierung beteiligt. Der minimale Komplex besteht aus dem RNase III Enzym DrnB (Hinas et al. 2007, Avesson et al. 2012) und seinem dsRBP-Interaktionspartner, der im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnte. Rbdb lokalisiert diffus im Kern und bildet distinkte perinukleoläre Foci aus, die an pflanzliche *D-Bodies* erinnern. Da Rbdb und DrnB in diesen Strukturen co-lokalisieren (Kruse 2014, Zenk 2014) und pri-miRNAs im Hintergrund der entsprechenden Knockout-Stämme akkumulieren, handelt es sich womöglich um spezialisierte Orte der miRNA-Biogenese. Allerdings weiß man nicht, ob DrnB und Rbdb ausreichend sind, um mature miRNAs zu generieren, was eher dem pflanzlichen Mechanismus entsprechen würde, oder ob darüber hinaus, wie in Metazoen, ein cytoplasmatischer Prozessierungskomplex notwendig ist (vgl. Abb. 51).

Insgesamt hat der Komplex aus DrnB und Rbdb stärkere Ähnlichkeiten zum tierischen Mikroprozessor. Obwohl DrnB aufgrund seiner Aminosäuresequenz als Dicer-Homolog definiert wird, besitzt das Protein lediglich eine dsRBD und zwei RNase III Domänen. In dieser Hinsicht ähnelt es also eher den Drosha-Homologen, die ausschließlich in Tieren vorkommen und die die gleichen Domänen enthalten (Cerutti et al. 2006).

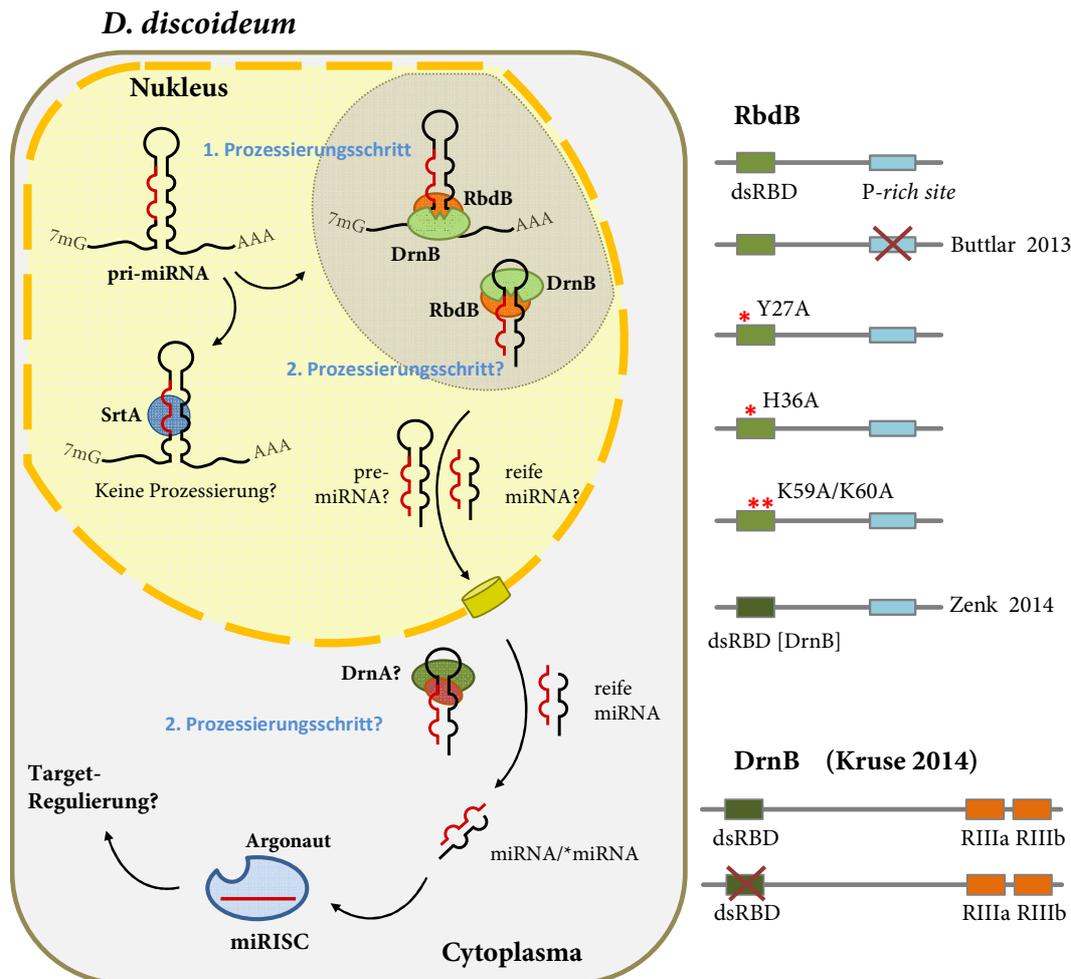


Abb. 51: Die miRNA-Prozessierung in *D. discoideum*

Links: Schematische Abbildung des miRNA-Signalweges in *D. discoideum*. Der Komplex aus DrnB und RbdB ist für die Prozessierung von pri-miRNAs im Nucleus zuständig. Vermutlich sind perinukleoläre Foci (angedeutet durch die dunkle Schattierung) die Orte der Prozessierung oder sie dienen der Lagerung von RbdB und DrnB. Unklar ist, ob der nukleäre Komplex für die Generierung maturer miRNAs ausreichend ist, oder ob DrnA im Cytoplasma den letzten Prozessierungsschritt vermittelt. SrtA fungiert im Nucleus womöglich als Negativregulator der miRNA-Prozessierung. Es ist davon auszugehen, dass mature miRNAs im Cytoplasma stabil in einen Effektor-Komplex (miRISC) eingebaut werden. Unklar ist, welches Argonauten Protein mit miRNAs assoziiert ist und wie die Regulierung der Zielgene abläuft. Rechts: Schematische Darstellung jener RbdB- und DrnB-Varianten, die im Rahmen der miRNA-Prozessierung funktionell sind.

D. discoideum weist aber auch individuelle Besonderheiten in der miRNA-Prozessierung auf. So besitzt RbdB lediglich eine dsRBD und die in DrnB enthaltene Domäne ist für die Prozessierung von miRNAs entbehrlich (Kruse 2014). Mutationen in der RbdB-eigenen dsRBD und die Deletion der P-rich site hatten keinen Effekt auf die Effizienz der miRNA-Prozessierung *in vivo* (Buttlar 2013 und eigene Arbeiten). Es ist deshalb fraglich, ob die Prozessierung von miRNAs mit Hilfe der in RbdB enthaltenen dsRBD realisiert werden kann. Denkbar ist, dass weitere Proteine *in vivo* zur

Prozessierung von primären miRNAs im Kern beitragen. Anders als in Pflanzen ist SrtA, ein SE-Homolog, jedoch nicht an der Akkumulierung dieser regulatorischen RNAs beteiligt.

5.1.4 Identifikation von miRNAs in *D. discoideum*

Das Expressionslevel maturer miRNAs variiert im Hintergrund verschiedener *D. discoideum* Mutanten zum Teil sehr stark: Da DrnB und RbdB für die Prozessierung dieser regulatorischen RNAs relevant sind, werden sie im Hintergrund der entsprechenden *Knockout*-Stämme nicht mehr gebildet (Hinas et al. 2007, Avesson et al. 2012 und Ergebnisse dieser Arbeit). Im Gegensatz dazu akkumulieren bekannte miRNAs wie ddi-miR-1176 und ddi-miR-1177 deutlich in agnA- oder rrpC- Stämmen (Hinas et al. 2007, Avesson et al. 2012, Boesler 2012). Innerhalb dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob das differentielle Expressionsmuster von miRNAs genutzt werden kann, um weitere Kandidaten dieser Klasse in der Amöbe zu identifizieren. Dazu wurde RNA (< 200 nt) aus dem AX2 wt, dem rbdB- Stamm und dem agnA- Stamm isoliert und in hohem Durchsatz sequenziert.

Standardkriterien, die angewendet werden, um miRNAs auf der Grundlage von *Deep Sequencing* basierten Daten zu identifizieren, sind unter anderem folgende: Putative miRNAs sind etwa 22 nt lang und werden durch mehrere *Reads* repräsentiert. Die flankierenden Sequenzen falten in eine Haarnadelstruktur und die Daten weisen auf die Existenz der entsprechenden miRNA* hin (Kozomara et al. 2011). Diese Aspekte wurden bei der Identifikation neuer miRNAs in *D. discoideum* berücksichtigt. Darüber hinaus sollten die putativen miRNAs im agnA- Stamm mindestens um das Dreifache angereichert und im rbdB- Stamm um das Dreifache abgereichert sein. Eine ähnliche Strategie ist zum Beispiel erfolgreich in *A. thaliana* angewendet worden: Da miRNAs in *rdr2* Mutanten angereichert vorliegen, konnten 13 neue RNAs identifiziert werden, die im Wildtyphintergrund eher gering exprimiert werden (Lu et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Pool an bekannten miRNAs in *D. discoideum* um drei kanonische erweitert werden (vgl. Kapitel 4.1.8). Die Expression einer bereits veröffentlichten miRNA, nämlich ddi-miR-7097 (Avesson et al. 2012), konnte durch Northern Blot Analysen bestätigt werden. Anders als bei Avesson et al. belegten die Daten der Hochdurchsatzsequenzierung zudem die Existenz der vorhergesagten miRNA*. Es besteht nunmehr größere Evidenz, dass es sich bei ddi-miR-7097 tatsächlich um eine miRNA handelt.

Darüber hinaus wurde eine nicht-kanonische miRNA identifiziert, die in keiner typischen Haarnadelstruktur eingebettet war. Northern Blot Analysen zeigten, dass sie dennoch das Expressionsprofil einer typischen miRNA hatte: sie war im rbdB- und im drnB- Stamm nicht nachweisbar und akkumulierte im agnA- Stamm (vgl. Abb. 25). Durch die Überexpression von

RbdB GFP im rbdB- Stamm konnte ihre Expression wiederhergestellt werden. Vieles spricht also dafür, dass der kernlokalisierte Komplex aus DrnB und RbdB an der spezifischen Prozessierung dieser RNA beteiligt ist. Möglicherweise schneidet DrnB innerhalb bzw. am Übergang zu den Loop-Strukturen, die die putative miRNA flankieren. Für eine alternative Prozessierung spricht womöglich auch die Tatsache, dass keine miRNA* detektiert werden konnte.

Insgesamt hat sich die angewendete Strategie zur Identifikation neuer miRNA-Kandidaten bewährt, auch wenn aufgrund der geringen Anzahl an *Reads* und basierend auf der ersten bioinformatischen Auswertung lediglich vier weitere Kandidaten identifiziert werden konnten. In Zukunft muss geklärt werden, ob sie in *D. discoideum* tatsächlich regulatorische Funktionen wahrnehmen. Dafür ist die Assoziation mit einem Argonauten-Protein entscheidend (Hutvagner et al. 2001, Meister et al. 2004). Bisher ist allerdings nicht bekannt, welche Argonauten Proteine aus *D. discoideum* mit miRNAs beladen werden. Um dies zu klären, sind systematische Untersuchungen notwendig. Regulatorische RNAs, die mit AgnA-AgnE präzipitiert werden können, müssten dazu in hohem Durchsatz sequenziert werden. Erste Analysen dieser Art weisen darauf hin, dass AgnB vermutlich nicht mit miRNAs assoziiert ist (M. Friedrich, unveröffentlicht). Außerdem müssen in Zukunft putative miRNA-*Targets* identifiziert werden. Transkriptomanalysen könnten dabei als möglicher Ansatzpunkt dienen. Auch hier könnte Material aus dem AX2 und aus Mutanten verwendet werden, die miRNAs und somit auch die putativen Zielgene differentiell exprimieren.

5.2 RNAi vermittelte Regulation und Amplifikation des DIRS-1 Retrotransposons

Argonauten Proteine gelten als Schlüsselproteine der RNA-vermittelten Genregulation und sind in Eukaryoten hoch konserviert (Cerutti et al. 2006). Als zentrale Komponente des Effektor-Komplexes (RISC) binden sie siRNAs und sind so in der Lage, komplementäre RNA-Targets im Cytoplasma zu identifizieren und diese endonukleolytisch zu spalten (zusammengefasst in Ghildiyal et al. 2009). Im RITS-Komplex vermitteln sie die Ausbildung repressiver Chromatinstrukturen im Kern, was insbesondere in *S. pombe* und in *A. thaliana* gut untersucht ist (zusammengefasst in Castel et al. 2013).

Die RNAi vermittelte Stilllegung von Transposons ist eine bewährte Strategie in Eukaryoten: Der *Knockout* oder *Knockdown* von Komponenten der RNAi-Maschinerie geht deshalb häufig mit einer erhöhten Aktivität transposabler Elemente einher (Tabara et al. 1999, Xie et al. 2004, Watanabe et al. 2008). Entsprechende Mutanten können deshalb auch dazu genutzt werden, um den Amplifikationsmechanismus einiger sonst inaktiver Transposons zu untersuchen.

In *D. discoideum* werden fünf Argonauten Proteine kodiert (AgnA-AgnE). Während der *Knockout* von AgnC, AgnD und AgnE keinen offensichtlichen Effekt auf die Aktivität des DIRS-1 Retrotransposons hat (pers. Mitteilung von T. Winckler und F. Söderbom), spielt AgnA eine maßgebliche Rolle bei seiner Stilllegung: Transposon spezifische Transkripte akkumulierten im Hintergrund der *Knockout*-Mutante, während endogene DIRS-1 siRNAs stark abgereichert waren. Gleichzeitig konnten einzelsträngige, extrachromosomal vorliegende DNA-Moleküle detektiert werden, die komplementär zu den proteinkodierenden DIRS-1 Transkripten waren (Boesler et al. 2014). In *D. discoideum* kann der Pool an siRNAs, ähnlich wie in *A. thaliana*, *S. pombe* oder *C. elegans*, durch die Aktivität von RdRPs vergrößert werden: RrpC ist dabei jenes Homolog, das an der Produktion von DIRS-1 siRNAs beteiligt ist (Wiegand et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Erkenntnisse zur Funktion und Bedeutung der RNA vermittelten Regulation des Transposons und seiner Amplifikation gewonnen werden.

5.2.1 AgnA wird in vegetativ wachsenden Zellen am stärksten exprimiert

Das Expressionsprofil der *agnA*-mRNA im Entwicklungszyklus des Wildtyps war von Interesse, weil eine Reihe von vergleichenden Experimenten mit dem AX2 wt und dem *agnA*- Stamm durchgeführt wurden. Entsprechende qRT-PCR Analysen ergaben, dass die mRNA in vegetativ wachsenden Zellen am stärksten exprimiert wurde. Bereits vier Stunden nach dem Eintritt in die Entwicklung war die Expression um das 10-fache gesunken und veränderte sich in den späteren Entwicklungsstadien praktisch nicht mehr (vgl. Abb. 34). Für den Wildtypstamm AX4 stehen

mRNA-Expressionsdaten zur Verfügung, die durch Illumina RNA-Illumina®-Sequenzierung generiert worden sind und ein sehr ähnliches *agnA*-spezifisches Expressionsprofil zeigen (Rot et al. 2009, Parikh et al. 2010). Das sprach für die Reliabilität der erzielten Ergebnisse.

Wenn man davon ausgeht, dass das mRNA-Expressionsprofil mit der Expressionsstärke des kodierten Proteins korreliert, dann sind vegetativ wachsende Zellen besonders geeignet, um vergleichende Analysen zwischen dem AX2 wt und dem *agnA*- Stamm durchzuführen. Deshalb wurden amöboid wachsende Zellen für die Untersuchungen verwendet. Allerdings muss in diesem Zusammenhang angemerkt werden, dass eine solche Korrelation in biologischen Systemen nicht immer gegeben ist (zusammengefasst in Maier et al. 2009). Da jedoch kein AgnA-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, konnte die entwicklungsabhängige Expression des Proteins nicht untersucht werden.

5.2.2 *AgnA* ist für die Akkumulierung sekundärer DIRS-1 siRNAs relevant

Mit Hilfe von Northern Blot Analysen konnte eine Reduktion endogener DIRS-1 siRNAs im *agnA*- Stamm festgestellt werden (Boesler 2012). Eine Aussage zur globalen Verteilung der endogenen siRNAs im AX2 oder im *agnA*- Stamm war so allerdings nicht möglich. Aus diesem Grund wurden kleine RNAs (< 200 nt) aus beiden Stämmen isoliert, in hohem Durchsatz sequenziert und ihre Verteilung entlang eines vollständigen DIRS-1 Elementes untersucht.

Die zuvor beobachtete deutliche Reduktion von DIRS-1 siRNAs im *agnA*- Stamm konnte auf diese Weise bestätigt werden. Sie betrug insgesamt 70 %. Vergleichbare Untersuchungen am *rrpC*-Stamm zeigten eine starke Abreicherung (Wiegand et al. 2014). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass AgnA gemeinsam mit RrpC an der Generierung sekundärer DIRS-1 siRNAs beteiligt ist.

Wie einleitend beschrieben, hat das Argonauten Protein RDE-1 in *C. elegans* eine solche Funktion inne. Es ist mit primären siRNAs im Cytoplasma assoziiert und rekrutiert RdRPs, die daraufhin sekundäre siRNAs generieren (Yigit et al. 2006, Sijen et al. 2007, Pak et al. 2012).

Um zu überprüfen, ob AgnA an der Produktion sekundärer siRNAs in *D. discoideum* beteiligt sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Reporterkonstrukte generiert: Die einzelnen DIRS-1 ORFs wurden als Fusion mit einem N-terminalen oder C-terminalen GFP-Reporter gen im AX2 wt und im *agnA*- Stamm exprimiert. Wenn die siRNA Amplifikationsmaschinerie funktionell ist und zu den DIRS-1 Sequenzen rekrutiert werden kann, sollten GFP-spezifische siRNAs gebildet werden. Das war im Wildtyphintergrund mit jedem Konstrukt der Fall. Jedoch konnten im Hintergrund des *agnA*- Stammes keine transitive GFP siRNAs detektiert werden (vgl. Abb. 46). Gleiches traf auf den *rrpC*- Stamm zu (Daten nicht gezeigt). Dies war ein indirekter

Beweis dafür, dass AgnA neben RrpC für die Akkumulierung sekundärer DIRS-1 siRNAs essentiell ist.

Man könnte ebenfalls argumentieren, dass der Verlust endogener siRNAs im agnA- Stamm die Signalamplifikation verhindert. Allerdings hat die Hochdurchsatzsequenzierung kleiner RNAs ergeben, dass die verbliebenen DIRS-1 siRNAs im agnA- Stamm immerhin noch ~30% ausmachen. Wenn sie ausschlaggebend für die Generierung transitiver siRNAs sind, sollte zumindest ein schwaches Signal im *Knockout*-Hintergrund detektierbar sein. Außerdem konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass RrpC und AgnA miteinander interagieren (M. Malicki, unveröffentlicht), was ebenfalls dafür spricht, dass das Argonauten Protein direkt an der Signalamplifikation beteiligt ist. Möglicherweise übernimmt AgnA eine ähnliche Aufgabe wie RDE-1 in *C. elegans*, indem es RrpC anhand gebundener siRNAs zu DIRS-1 Sequenzen rekrutiert und so die Produktion sekundärer siRNAs initiiert. Um diese Fragen zu klären, sind allerdings weitere Untersuchungen nötig. So muss überprüft werden, ob AgnA tatsächlich mit DIRS-1 siRNAs assoziiert ist. Eine weitere interessante Frage ist, ob AgnA katalytische Aktivität besitzt und in der Lage ist, DIRS-1 Transkripte endonukleolytisch zu spalten. Jedenfalls verfügt das Protein, wie einleitend beschrieben, über die katalytische Triade. Möglicherweise ist auch das die Voraussetzung für eine RrpC vermittelte Signalamplifikation.

Auch in Pflanzen gibt es Beispiele dafür, dass Argonauten Proteine den Level endogener siRNAs beeinflussen: AGO4 und AGO6 sind beispielsweise an der Akkumulierung von *cas*iRNAs beteiligt, wobei man hier eher von einem indirekten Effekt ausgeht, dessen Basis noch nicht vollständig verstanden ist (Zilberman et al. 2003, Zheng et al. 2007).

Die Hochdurchsatzsequenzierung kleiner RNAs aus dem agnA- Stamm und dem AX2 offenbarte weiterhin eine ungleichmäßige Verteilung von endogenen DIRS-1 siRNAs entlang des Retrotransposons (vgl. Abb. 45). Diese Beobachtungen haben viele Fragen, was die Akkumulierung endogener DIRS-1 siRNAs betrifft, aufgeworfen. Durch den Einsatz verschiedener Reporter-konstrukte konnten einige Aspekte der zugrunde liegenden Mechanismen aufgeklärt werden. Diese werden der Übersichtlichkeit halber in einem eigenen Kapitel diskutiert (vgl. Kapitel 5.2.8).

Endogene DIRS-1 siRNAs sind hauptsächlich im Cytoplasma von *D. discoideum* nachweisbar (Boesler et al. 2014). Aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen geht zudem hervor, dass RrpC im Cytoplasma lokalisiert und vom Nukleus ausgespart ist (M. Malicki, unveröffentlicht). Die Fraktionierung von Proteinen aus dem Cytoplasma und Nukleoplasma hat ergeben, dass AgnA als Fusion mit einem C-terminalen HA-Tag in beiden Kompartimenten vorkommt (vgl. Abb. 35). Die eindeutige Lokalisation der DIRS-1 siRNAs und der an ihrer Akkumulierung beteiligten RdRP sowie die Interaktion von RrpC und AgnA (M. Malicki, unveröffentlicht) weisen

letztendlich darauf hin, dass die Produktion sekundärer siRNAs auf das Cytoplasma der Zelle beschränkt ist. Das legt gleichzeitig eine (überwiegend) posttranskriptionelle Regulation von DIRS-1 durch die RNAi-Maschinerie nahe.

5.2.3 Die Deregulation von DIRS-1 im agnA- Stamm – Transkriptionsebene

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass DIRS-1 Transkripte heterogener Länge im agnA- Stamm angereichert vorliegen (Boesler et al. 2014). Es ist unklar, ob es sich bei den kürzeren Varianten, die ebenfalls im AX2 wt detektierbar sind, um Degradations- oder Prozessierungsprodukte handelt, oder ob sie von unvollständigen DIRS-1 Elementen abstammen, die in großer Zahl im Genom von *D. discoideum* vorkommen (Chung et al. 1983, Piednoel et al. 2011). Die Quantifizierung der 4500 nt langen Transkripte, die vermutlich den 16 intakten DIRS-1 Elementen zugeordnet werden können (Chung et al. 1983, Cohen et al. 1984, Piednoel et al. 2011), ergab eine 4-fache Anreicherung in agnA- Stämmen (vgl. Abb. 36). Anhand ihrer Vorlage können zum einen alle DIRS-1 kodierten Proteine synthetisiert werden. Zum anderen sind alle strukturellen Elemente wie z.B. die rITR und die ICR-Sequenz enthalten, die für die Synthese einer vollständigen cDNA als notwendig angesehen werden (Cappello et al. 1985, Poulter et al. 2005). Nur auf diese Weise – so die Modellvorstellung – können im Zuge der Amplifikation neue intakte DIRS-1 Elemente in das Genom von *D. discoideum* integriert werden.

Die Akkumulierung DIRS-1 spezifischer *sense* Transkripte war nicht nur im agnA-, sondern auch in rrpC- Stämmen detektierbar (Wiegand et al. 2014). Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die AgnA und RrpC abhängige Amplifikation von DIRS-1 siRNAs entscheidend ist, um die Akkumulierung von DIRS-1 Transkripten zu begrenzen.

Der *Knockout* oder *Knockdown* von Komponenten der RNAi-Maschinerie geht auch in Tieren und Pflanzen mit einer stärkeren Aktivität von Transposons einher: Beispielsweise hat die reduzierte Expression von Dicer oder Ago2 in Maus Oozyten eine Akkumulierung von Transkripten des Retrotransposons LTR10 zur Folge (Watanabe et al. 2008). In *A. thaliana* Mutanten, in denen die Funktion von RDR2 oder DCL3 beeinträchtigt ist, geht der Verlust endogener siRNAs ebenfalls mit einer Anreicherung Transposon-spezifischer Transkripte einher, was beispielsweise für das SINE Retroelement (*AtSN1*) zutreffend ist (Xie et al. 2005).

5.2.4 Die Deregulation von DIRS-1 im agnA- Stamm – Proteinebene

Da im agnA- Stamm Transkripte vollständiger DIRS-1 Elemente angereichert vorlagen, wurde untersucht, ob auch die kodierten Proteine in der Mutante akkumulieren. Da keine spezifischen Antikörper zur Verfügung standen, wurden die einzelnen ORFs als Fusion mit GFP im Hintergrund des AX2 wt und des agnA- Stammes exprimiert.

Es stellte sich heraus, dass das von ORF1 kodierte putative GAG Protein sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante akkumulierte. Im Gegensatz dazu waren die von ORF2 und ORF3 kodierten Proteine lediglich im agnA- Stamm detektierbar (vgl. Abb. 37). ORF2 kodiert die Tyrosin Rekombinase (YR) und ORF3 die so genannten Pol-Gene, die eine Reverse Transkriptase (RT)- eine RNase H (RH)- und eine Methyltransferase (MT)-Domäne beinhalten. Was die Pol-Gene betrifft, so wird die RT fortan stellvertretend für alle von diesem ORF kodierten Proteine genannt.

Eine mögliche Erklärung für dieses Expressionsmuster könnte die ungleichmäßige Verteilung der DIRS-1 siRNAs entlang des Retrotransposons sein: im Wildtyphintergrund waren nur sehr wenige DIRS-1 siRNAs, die der ersten Hälfte des GAG-Gens oder den ITR-Sequenzen entsprachen. Was ORF2 und ORF3 betrifft, so waren robuste Mengen endogener siRNAs über ihre gesamte Länge hinweg nachweisbar (vgl. Abb. 45). Insofern liegt die Vermutung nahe, dass die im AX2 vorhandenen siRNAs ausreichend sind, um die von ORF2 und ORF3 kodierten Proteine stillzulegen, aber nicht, um eine Akkumulierung des GAG-Proteins zu verhindern. Da endogene DIRS-1 siRNAs im agnA- Stamm um über 70 % abgereichert waren, können in diesem Stamm alle von DIRS-1 kodierten Proteine synthetisiert werden. Dass die siRNAs einen entscheidenden Einfluss auf das beobachtete Expressionsmuster der Proteine haben, bestätigen auch die Northern Blot Analysen zum Nachweis der transgenen mRNAs: Entsprechend waren ORF1 GFP Transkripte im AX2 wt und im agnA- Stamm nachweisbar, während ORF2 GFP und ORF3 GFP Transkripte wesentlich stärker in der *Knockout*-Mutante akkumulierten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die AgnA-abhängigen siRNAs *in trans* die effiziente Degradation von DIRS-1 ORF2 und ORF3 Transkripten vermitteln können. Es ist deshalb anzunehmen, dass alle von diesen Leserahmen abgeleiteten Transkripte, auch die von unvollständigen DIRS-1 Kopien, mehr oder weniger degradiert werden.

Die Beobachtung, dass die von DIRS-1 kodierten Proteine im AX2 Wildtyphintergrund in unterschiedlichem Maße akkumulieren, ist auch im Hinblick auf den Amplifikationsmechanismus von LTR-Retrotransposons interessant: Sie benötigen für ihre erfolgreiche Vermehrung einen Überschuss des kodierten GAG-Proteins, das als strukturelle Komponente für die Bildung von VLPs notwendig ist (zusammengefasst in Havecker et al. 2004). Eine verbreitete Strategie für die vermehrte Bildung dieses Proteins ist z.B. die Verschiebung des Leserahmens (um +1 oder -1) zwischen dem GAG ORF und dem Pol ORF: die Pol-Gene werden nur translatiert, wenn ein Leserastersprung des Ribosoms provoziert wird, was als PRF (*programmed ribosomal frameshifting*) bekannt ist (Farabaugh 1996). Die sich überlappenden ORFs von DIRS-1 weisen ebenfalls eine Leserasterverschiebung auf (Cappello et al. 1985), wodurch das molare Verhältnis der Proteine während der Translation womöglich zugunsten von GAG verschoben wird.

Obwohl deshalb davon auszugehen ist, dass im AX2 wt die von ORF2 und ORF3 kodierten Proteine weniger effizient translatiert werden, vermitteln die endogenen DIRS-1 siRNAs vor allem die Degradation dieser DIRS-1 Sequenzen (vgl. Abb. 37). Infolgedessen ist das Hüllprotein GAG womöglich in ausreichenden Mengen vorhanden, aber die von ORF2 und ORF3 kodierten Proteine akkumulieren – wenn überhaupt – nur in geringem Umfang. Das könnte eine geeignete Strategie sein, um die Amplifikation des Transposons erfolgreich zu unterbinden.

Im agnA- Stamm konnte eine relativ starke Akkumulierung von YR GFP und RT GFP auf Proteinebene beobachtet werden (vgl. Abb. 37). Möglicherweise wird die tatsächliche Menge dieser Proteine jedoch überschätzt. Wie bereits erwähnt, wurden die drei DIRS-1 ORFs jeweils einzeln als Fusion mit einem C-terminalen GFP-Tag im AX2 bzw. im agnA- Stamm exprimiert. Sie wurden dabei von einem *act15*-Promotor getrieben und verfügten allesamt über ein Startcodon. Somit war kein Leserastersprung des Ribosoms notwendig und die Translation von YR GFP und RT GFP wahrscheinlich effizienter als die der endogenen Proteine. Nichtsdestotrotz weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die von DIRS-1 ORF2 und ORF3 kodierten Proteine vermehrt im agnA- Stamm gebildet werden können.

5.2.5 Extrachromosomale DIRS-1 DNA – Produkte einer reversen Transkription?

Die Tatsache, dass extrachromosomale DIRS-1 DNA im agnA- Stamm, aber nicht im Wildtyphintergrund akkumulierte (Boesler et al. 2014), war ein weiterer wichtiger Hinweis auf die höhere Aktivität des Retrotransposons in der *Knockout*-Mutante. Da sie einzelsträngig und komplementär zu DIRS-1 *sense* Transkripten war (Boesler et al. 2014 und 4.2.6 - 4.2.7), lag die Vermutung nahe, dass es sich um cDNA-Moleküle handelt. Die im vorangehenden Kapitel diskutierten Beobachtungen stützten diese Hypothese: Schließlich war die von DIRS-1 ORF3 kodierte Reverse Transkriptase als Fusion mit GFP lediglich im agnA- Stamm nachweisbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die extrachromosomale DIRS-1 DNA detaillierter charakterisiert. Southern Blot Analysen mit fraktioniertem Material aus dem agnA- Stamm zeigten, dass sie im Cytoplasma des Stammes akkumulierte (vgl. Abb. 38). Insbesondere von Studien der Ty1 und Ty3 Retrotransposons aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die cDNA-Synthese von LTR-Retrotransposons im Cytoplasma stattfindet (Voytas et al. 2002).

Durch PCR- und weitere Southern Blot Analysen konnte festgestellt werden, dass der überwiegende Teil der extrachromosomalen DIRS-1 DNA die vollständige rechte ITR, die kodierenden Sequenzen und die ICR, aber nur einen geringen Teil der linken ITR enthielt (vgl. 4.2.7). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Transkripte vollständiger DIRS-1 Kopien bevorzugt als *Template* für die cDNA Synthese genutzt werden: Es besteht

experimentelle Evidenz, dass die Transkription intakter DIRS-1 Elemente im 3'-Bereich der linken ITR beginnt und deshalb nur wenige Nukleotide dieser ITR in den synthetisierten RNA-Molekülen enthalten sind (Cohen et al. 1984). Cohen et al. gehen weiterhin davon aus, dass die rechte ITR zum überwiegenden Teil transkribiert wird, weil Polyadenylierungssignale erst am Ende dieser *Repeat*-Sequenz vorkommen. Die dominanten DIRS-1 DNA Intermediate sind daher komplementär zu den Transkripten vollständiger DIRS-1 Elemente.

Neben den hochmolekularen DIRS-1 DNA Intermediaten waren im Cytoplasma des *agnA*-Stammes auch kleinere Varianten detektierbar, die im Southern Blot einen Schmier bildeten. Diese waren insbesondere dann zu sehen, wenn die Membran mit strangspezifischen Sonden aus dem Bereich der rechten ITR hybridisiert wurde (Boesler 2012 und Abb. 39). Dabei könnte es sich um unvollständige cDNA-Produkte handeln. Modelle zur Beschreibung des DIRS-1 Amplifikationsmechanismus postulieren jedenfalls, dass die cDNA-Synthese am 3'-Ende der Template-RNA initiiert wird: durch eine Rückfaltung der mRNA könnte ihr 3'-Ende selbst als Startpunkt für die reverse Transkription dienen. Denkbar ist allerdings auch, dass ein exogener Primer diese Funktion übernimmt (Cappello et al. 1985, Poulter et al. 2005). In beiden Fällen würde die cDNA-Synthese mit der rechten ITR beginnen. In Übereinstimmung damit nahm der detektierbare Schmier ab und es waren tendenziell größere Moleküle nachweisbar, je weiter entfernt die eingesetzten Sonden von der rechten ITR waren.

Weiterhin wurde spekuliert, dass DIRS-1 cDNA Intermediate mit vollständig rekonstituierten ITR-Sequenzen an den Enden ligiert werden, sodass zirkuläre DNA-Moleküle entstehen. Für eine YR vermittelte Rekombination ins Genom müsste im Anschluss nur noch der fehlende komplementäre DNA-Strang synthetisiert werden (Cappello et al. 1985, Poulter et al. 2005).

Mit PCR-Analysen sollte überprüft werden, ob zumindest einige der detektierbaren extrachromosomalen DIRS-1 DNA Moleküle zirkulär in der Zelle vorliegen. Allerdings konnten keine entsprechenden PCR-Produkte generiert werden (vgl. Abb. 40). Um zu bestätigen, dass es sich überwiegend um lineare Moleküle handelt, wurden sie mit dem Enzym Exonuklease I behandelt, das einzelsträngige DNA in 3'-5'-Richtung abbaut. Allerdings konnte die extrachromosomale DIRS-1 spezifische DNA auf diese Weise nicht degradiert werden. Diese Ergebnisse haben daher keine eindeutige Schlussfolgerung zugelassen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die extrachromosomale DIRS-1 DNA zwar linear im Cytoplasma des *agnA*- Stammes vorliegt, aber am 3'-Ende modifiziert ist, sodass eine Degradation durch die Exonuklease I verhindert wird.

5.2.6 Ist das putative DIRS-1 GAG Protein in der Lage, VLPs zu bilden?

Da es sich bei der detektierten extrachromosomalen und einzelsträngigen DIRS-1 DNA vermutlich um Produkte einer reversen Transkription handelt, stellte sich die Frage, ob das von DIRS-1 kodierte putative GAG Protein VLPs bilden kann. LTR-Retrotransposons nutzen diese spezialisierten Strukturen typischerweise als Orte der cDNA-Synthese (zusammengefasst in Havecker et al. 2004). Da das Protein vom ersten ORF kodiert wird und eine ähnliche Größe zu GAG-Proteinen anderer LTR-Retrotransposons aufweist, ist es möglicherweise geeignet, um als strukturelle Komponente von VLPs zu fungieren. Allerdings besitzt DIRS-1 GAG keine Zinkfinger motive, die sonst häufig in GAG Proteinen anderer LTR-Retrotransposons zu finden sind (Poulter et al. 2005).

Um die Funktion von DIRS-1 GAG zu untersuchen, wurde das Protein als Fusion mit GFP ektopisch im agnA- Stamm und im AX2 wt exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Protein bildete distinkte Foci im Cytoplasma beider Stämme aus und zeigte darüber hinaus in vielen Zellen eine starke Akkumulierung in der Nähe des Kerns (vgl. Abb. 37). GFP alleine bildete bei der Überexpression unter Verwendung eines extrachromosomalen Plasmides (pDM317) keine vergleichbaren Strukturen im Cytoplasma aus (vgl. Abb. 22).

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass P-Body assoziierte Proteine für die Assemblierung funktioneller Ty1 oder Ty3 VLPs benötigt werden (Beliakova-Bethell et al. 2006, Checkley et al. 2010). Ty3 mRNAs und die vom Transposon kodierten Proteine co-lokalisieren z.B. mit Dcp2 oder Xrn1, wobei es sich um typische P-Body Marker handelt (Beliakova-Bethell et al. 2006). Der *Knockout* von P-Body assoziierten Proteinen hat zudem eine verringerte Transpositionsrate von Ty1 und Ty3 zur Folge (Irwin et al. 2005, Checkley et al. 2010). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Assemblierung von VLPs für die Amplifikation dieser LTR-Retrotransposons wichtig ist.

Man könnte spekulieren, dass es sich bei den im Cytoplasma verteilten Foci von DIRS-1 GAG GFP um P-Bodies oder um damit assoziierte Strukturen handelt. Allerdings konnte die Existenz dieser Kompartimente in der Amöbe bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es ist jedoch bekannt, dass das Xrn1 Homolog aus *D. discoideum* in ähnlichen cytoplasmatischen Spots vorkommt (Moog 2011). Neben Xrn1 gelten die *Decapping* Enzyme Dcp1 und Dcp2 in Hefen und Säugetieren als zentrale P-Body Komponenten; sie sind genau wie die 5'-3'-Exonuklease am Abbau von mRNAs beteiligt (zusammengefasst in Parker et al. 2004). Co-Lokalisationsstudien mit DIRS-1 GAG GFP und Xrn1 und/oder den Dcp1/2 Homologen in *D. discoideum* können in Zukunft Aufschluss darüber geben, ob DIRS-1 GAG ebenfalls mit typischen P-Body Proteinen assoziiert ist oder ob es sich um individuelle Strukturen handelt. Wenn es sich bei den DIRS-1 GAG spezifischen Foci um Orte handelt, an denen die Assemblierung von VLPs initiiert wird,

sollten zudem DIRS-1 *sense* Transkripte nachweisbar sein. FISH-Analysen ihrer subzellulären Verteilung zeigten zumindest lokale Anreicherungen im Cytoplasma der Zellen (Wiegand et al. 2014).

Ferner ist zu klären, ob es sich bei den deutlichen Anreicherungen von GAG GFP in der Nähe des Kerns um Cluster maturer VLPs handelt. Um diese Strukturen näher zu analysieren, sollte das DIRS-1 GAG-Protein immunologisch mit Hilfe eines Gold-konjugierten Antikörpers markiert und im Kontext der Zelle elektronenmikroskopisch untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten lediglich erste Vorarbeiten durchgeführt werden. Die eigentlichen Untersuchungen stehen noch aus und sollen zeitnah in Kooperation mit Dr. Katja Richert-Pöggeler (Julius Kühn Institut, Braunschweig) durchgeführt werden.

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die cDNA Moleküle von LTR-Retrotransposons in Assoziation mit der Integrase in den Kern transportiert und dort schließlich in das Genom integriert werden (zusammengefasst in Voytas et al. 2002). Die von Ty1 kodierte Integrase besitzt zu diesem Zweck beispielsweise ein Kernlokalisationsignal (Kenna et al. 1998, Moore et al. 1998).

Wenn DIRS-1 tatsächlich VLPs in *D. discoideum* bildet, die als Orte der cDNA-Synthese fungieren, ist eine Akkumulierung in der Nähe des Kerns vorteilhaft: Schließlich sollen neue cDNA Kopien des Transposons in das Genom integriert werden. Im Fall von DIRS-1 gelangen vollständige cDNA-Moleküle womöglich gemeinsam mit der YR in den Kern, die daraufhin ihre Integration ins Genom vermittelt. Die Rekombinase ist zumindest das einzige von DIRS-1 kodierte Protein, bei dem mit Hilfe des cNLS Mappers ein Kernlokalisationsignal vorhergesagt werden konnte (Kosugi et al. 2009). Um diese Hypothese zu überprüfen, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. So könnte die Funktionalität der Lokalisationssequenz überprüft und die subzelluläre Lokalisation der YR untersucht werden.

Wie oben dargelegt, ist die subzelluläre Verteilung von DIRS-1 GAG GFP im agnA- und im AX2 Wildtyphintergrund sehr ähnlich. Diese Beobachtung war insofern überraschend, da extrachromosomale DIRS-1 DNA-Moleküle lediglich im agnA- Stamm nachweisbar waren (Boesler et al. 2014) und VLP-ähnliche Strukturen deshalb eher in der Mutante erwartet wurden. Möglicherweise ist die Überexpression von DIRS-1 GAG bereits ausreichend, um die Bildung solcher Partikel zu induzieren. Vieles spricht dafür, dass sie im Wildtyphintergrund nicht funktionell sind, weil keine ausreichenden Mengen der kodierten RT und auch keine cDNA-Intermediate nachweisbar sind.

Insgesamt weist die subzelluläre Verteilung von DIRS-1 GAG darauf hin, dass das Protein in der Lage ist, VLP-ähnliche Strukturen auszubilden. Dies wird ferner durch die Beobachtung gestützt, dass DIRS-1 GAG Proteine miteinander interagieren (vgl. Abb. 43). Die Tatsache, dass

entsprechende Fusionsproteine nach der Zentrifugation bei 100.000 g hauptsächlich in der Pellet-Fraktion vorkommen, spricht ebenfalls dafür, dass das Protein in dichteren RNP-Komplexen vorkommt und es sich nicht um bloße Proteinaggregate handelt (vgl. Abb. 44).

Obwohl viele Beobachtungen auf die Existenz von DIRS-1 VLPs hinweisen, sind weitere Untersuchungen notwendig, um dies abschließend zu belegen. Neben den bereits genannten Co-Lokalisationsstudien muss überprüft werden, ob DIRS-1 Transkripte oder extrachromosomale DIRS-1 DNA-Moleküle mit GAG GFP präzipitiert werden können. Ein weiterer Ansatz ist die Aufreinigung der identifizierten DIRS-1 GAG Partikel über einen Saccharosegradienten. Bestimmte Komponenten wie die von DIRS-1 kodierten Proteine, Transposon-spezifische Transkripte und cDNA-Moleküle sollten in den gleichen Fraktionen nachweisbar sein. Das konnte z.B. in ähnlicher Weise für VLPs des BARE-1 Retrotransposons aus *Hordeum vulgare* gezeigt werden (Jaaskelainen et al. 1999).

5.2.7 Verhindert AgnA die Amplifikation von DIRS-1?

Wie in Kapitel 4.2.7 dargelegt, handelt es sich bei den detektierbaren extrachromosomalen DIRS-1 DNA Molekülen um einzelstränge cDNA-Intermediate, die linear in der Zelle vorliegen und die kein vollständiges DIRS-1 Element repräsentieren. Tyrosin Rekombinasen benötigen jedoch eine doppelsträngige und zirkuläre DNA für die erfolgreiche Integration in ein lineares Chromosom (zusammengefasst in Grindley et al. 2006). Gleiches gilt vermutlich für DIRS-1: darauf weisen Analysen seiner Integrationsorte im Genom von *D. discoideum* hin. Außerdem scheint eine Erkennungssequenz von drei Nukleotiden für die spezifische Rekombination ausreichend zu sein (Poulter et al. 2015). Insofern war es fraglich, ob es im Hintergrund des agnA- Stammes tatsächlich zu Neuintegrationen von DIRS-1 ins Genom kommt.

Christian Hammann und Mitarbeiter konnten mit Hilfe eines modifizierten DIRS-1 Elementes zeigen, dass letzteres der Fall ist: DIRS-1 Transpositionereignisse konnten im Hintergrund der agnA- und rrpC- Stämme, aber nicht im AX2 wt nachgewiesen werden (M. Malicki, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse zeigen indirekt, dass die cDNA Synthese im agnA- Stamm zumindest in einigen wenigen Fällen vollständig abgeschlossen werden kann und die YR die Integration neuer Elemente ins Genom vermittelt. Über die limitierenden Faktoren, die dafür sorgen, dass im agnA- Stamm gerade die einzelsträngigen DIRS-1 DNA-Intermediate akkumulieren, kann derzeit allerdings nur spekuliert werden.

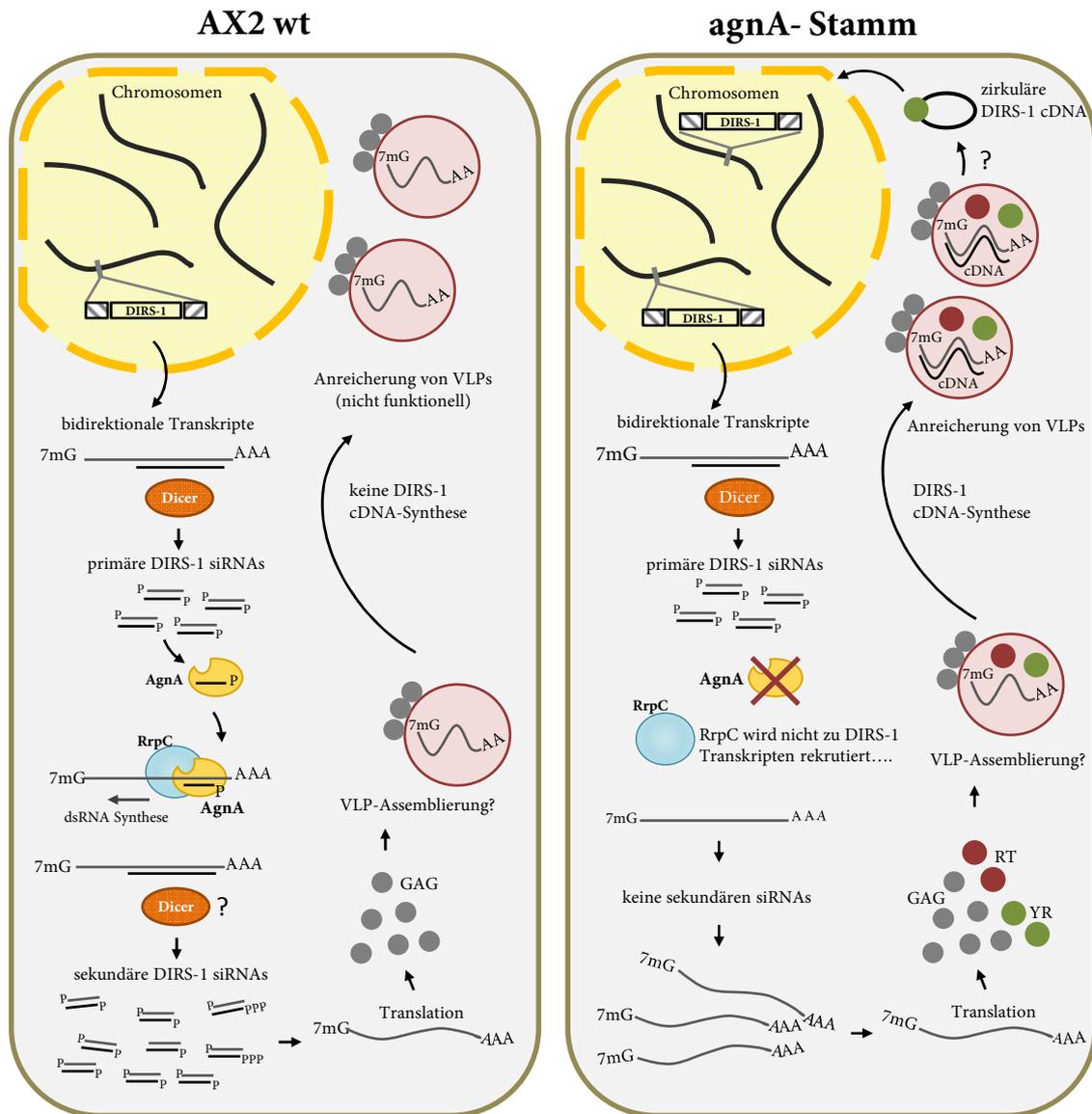


Abb. 52: Modell zur RNAi vermittelten DIRS-1 Regulation und seiner Amplifikation

Im AX2 wt (links) und im *agnA*- Stamm (rechts) werden DIRS-1 Elemente vermutlich bidirektional transkribiert (Wiegand et al. 2014 und 4.2.12). So entstehen dsRNA Moleküle, die durch ein Dicer Homolog in primäre siRNAs prozessiert werden können. Im AX2 wt vermitteln AgnA und RrpC die Produktion sekundärer siRNAs, die den überwiegenden Teil an endogenen DIRS-1 siRNAs ausmachen. Vermutlich ist auch hier ein Dicer Homolog beteiligt, dass die generierten dsRNAs prozessiert. Da im *agnA*- Stamm keine transitiven DIRS-1 siRNAs gebildet werden können, akkumulieren hier DIRS-1 Transkripte und alle von DIRS-1 kodierte Proteine werden translatiert. Im AX2 wt ist der Pool an siRNAs ausreichend, um die Anreicherung der YR und der RT zu verhindern. Hier kann lediglich das von ORF1 kodierte GAG Protein nachgewiesen werden. Vermutlich kommt es in beiden Stämmen zur Assemblierung von DIRS-1 VLPs. Da lediglich im *agnA*- Stamm ausreichende Mengen der RT enthalten sind, können *sense* Transkripte des Transposons als Template genutzt werden, um cDNA-Moleküle zu synthetisieren. Unveröffentlichte Daten von M. Malicki (Abt. Ribogenetics, Jacobs-Universität Bremen) zeigen, dass neue DIRS-1 Kopien in das Genom integriert werden. Letzteres vermittelt wahrscheinlich die im Element kodierte YR.

In Abb. 52 ist ein vereinfachtes Modell zur RNAi-vermittelten Regulation des DIRS-1 Retrotransposons und seiner Amplifikation dargestellt. Die Vorgänge im AX2 und im agnA-Stamm wurden dabei gegenübergestellt. Relevante Ergebnisse dieser Arbeit und Erkenntnisse von Wiegand et al. 2014 und von M. Malicki (unveröffentlicht) wurden der Vollständigkeit halber ebenfalls berücksichtigt.

5.2.8 DIRS-1 siRNAs: Biogenese und Amplifikation im Detail

In der Gesamtheit weisen die hier diskutierten Ergebnisse darauf hin, dass endogene DIRS-1 siRNAs notwendig sind, um die Akkumulierung von DIRS-1 Transkripten zu reduzieren und die Transposition zu verhindern (M. Malicki, unveröffentlicht). Deshalb wurde der zugrunde liegende Mechanismus ihrer Prozessierung und ihrer Amplifikation mit Hilfe verschiedener Reporter-konstrukte im Detail untersucht.

Aus humanen Zelllinien ist z.B. bekannt, dass die bidirektionale Transkription des LINE-1 Retrotransposons und die daraus resultierenden dsRNA-Moleküle die Produktion Dicer-abhängiger siRNAs initiieren (Yang et al. 2006). Um zu überprüfen, ob primäre DIRS-1 siRNAs in ähnlicher Weise gebildet werden, wurde ein Reporterkonstrukt kloniert, bei dem das Gen für GFP von beiden DIRS-1 ITRs flankiert wurde. Tatsächlich waren *sense* und *antisense* GFP Transkripte in ähnlichen Mengen detektierbar und es konnten GFP-spezifische siRNAs im Wildtyphintergrund nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.2.12). In Übereinstimmung damit weisen beide DIRS-1 ITRs im Kontext eines extrachromosomalen Vektors eine vergleichbar starke Promotoraktivität auf (vgl. Abb. 47). Kürzlich konnten zudem endogene DIRS-1 *antisense* Transkripte in *D. discoideum* detektiert werden (Wiegand et al. 2014). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass bidirektionale DIRS-1 Transkripte die Produktion primärer siRNAs initiieren. Möglicherweise ist DrnA, jenes Dicer Homolog, das in cytoplasmatischen Foci in *D. discoideum* vorkommt (Kruse 2014), an der Prozessierung von DIRS-1 siRNAs beteiligt. Auch weil der *Knockout* des Gens, wie oben erwähnt, letal ist (Kruse 2014), fehlen Untersuchungen, die diese Hypothese bestätigen könnten. DrnB hat zumindest keinen maßgeblichen Einfluss auf die Akkumulierung endogener DIRS-1 siRNAs, was in unabhängigen Analysen gezeigt werden konnte (Hinas et al. 2007, Wiegand et al. 2011).

Da die RdRP vermittelte Produktion sekundärer siRNAs in Eukaryoten mitunter sehr unterschiedlich ist (Maida et al. 2011), sollte der in *D. discoideum* angewendete Mechanismus näher untersucht werden.

In *C. elegans* sind sekundäre siRNAs fast ausschließlich komplementär zur Ziel-mRNA und weisen typischerweise ein Triphosphat am 5'-Ende auf; somit sind RdRPs für die *de novo* Synthese

22 nt langer siRNAs mit *antisense* Polarität verantwortlich, ohne dass ein Dicer-Homolog involviert ist (Pak et al. 2007, Sijen et al. 2007, Pak et al. 2012).

Der in *D. discoideum* angewendete Amplifikationsmechanismus unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von dem in *C. elegans*, was durch den Einsatz verschiedener Reporter-konstrukte gezeigt werden konnte. Wie bereits erwähnt, wurden dazu die einzelnen DIRS-1 ORFs als Fusion mit einem N-terminalen oder C-terminalen GFP-Reportergen kloniert und im AX2 und im *agnA*- Stamm exprimiert. Unter der Prämisse, dass die Amplifikationsmaschinerie zu DIRS-1 Transkripten rekrutiert werden kann, entstehen GFP-spezifische, transitive siRNAs. Diese konnten im Wildtyphintergrund mit jedem Konstrukt detektiert werden. Wie bereits erwähnt, waren im *agnA*- und im *rrpC*- Hintergrund keine GFP-siRNAs nachweisbar. Die Reporter-konstrukte waren somit geeignet, um den DIRS-1 spezifischen Modus der siRNA Signalamplifikation im AX2 wt zu untersuchen.

Transitive GFP siRNAs waren immer nachweisbar, egal ob die DIRS-1 ORF Sequenzen mit einem N-terminalen GFP oder einem C-terminalen GFP versehen waren. Die Amplifikation erfolgt deshalb sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung (vgl. Abb. 46). Ersteres kann nur dadurch erklärt werden, dass RrpC in der Lage ist, die Primer-unabhängige Synthese einer dsRNA zu initiieren. Andernfalls müssten von vornherein GFP-spezifische siRNAs zur Verfügung stehen. Kontrollexperimente zeigten jedoch, dass die bloße Expression des GFP-Reportergens nicht ausreichend ist, um die Produktion solcher siRNAs zu initiieren. Die Transitivität in 5'-Richtung kann theoretisch Primer-abhängig oder Primer-unabhängig erfolgen. In diesem Fall könnte eine endogene DIRS-1 siRNA als Startpunkt für die dsRNA-Synthese genutzt werden (vgl. Abb. 53).

Die Tatsache, dass nicht nur *antisense*, sondern auch *sense* GFP siRNAs nachweisbar waren spricht dafür, dass RrpC in der Lage ist, längere dsRNA-Moleküle zu synthetisieren, die daraufhin von einem Dicer-Homolog prozessiert werden. Übereinstimmend damit konnten Söderbom und Mitarbeiter zeigen, dass der überwiegende Teil endogener DIRS-1 siRNAs ein 5'-Monophosphat aufweist, was charakteristisch für eine Dicer-abhängige Prozessierung ist (Hinas et al. 2007). Gleiches gilt für GFP-spezifische siRNAs, die gebildet werden, wenn das entsprechende Reportergen von den beiden DIRS-1 ITRs flankiert wird (vgl. Abb. 49).

Die Produktion sekundärer DIRS-1 siRNAs in *D. discoideum* weist folglich größere Parallelen zu *A. thaliana* als zu *C. elegans* auf. Vieles spricht dafür, dass RdRPs auch in Pflanzen die Synthese längerer dsRNAs initiieren, die daraufhin durch Homologe der Dicer prozessiert werden (Vaistij et al. 2002, Xie et al. 2004, Petersen et al. 2005, Luo et al. 2007, Moissiard et al. 2007). Auch hier erfolgt die Amplifikation in 5'- und in 3'-Richtung und ist zumindest in einigen Fällen Primer-unabhängig (Vaistij et al. 2002, Petersen et al. 2005, Luo et al. 2007).

Die Reportergergen gestützte Analyse transiver siRNAs hat weiterhin ergeben, dass die Amplifikation über eine relativ weite Distanz erfolgen kann. GFP siRNAs waren über 400 nt von den DIRS-1 Sequenzen entfernt detektierbar. Das war sowohl für die Amplifikation in 5'- als auch in 3'-Richtung zutreffend. In Pflanzen ist die Produktion sekundärer siRNAs ähnlich effizient. Hier wurden transitive siRNAs sogar in einer Entfernung zwischen 600 bis 1000 nt vom ursprünglichen *Trigger* detektiert (Petersen et al. 2005, Moissiard et al. 2007).

Auffällig war weiterhin, dass die Menge an generierten GFP-siRNAs in Abhängigkeit von den Reporterkonstrukten variierte. Ausgehend von der DIRS-1 ORF1 Sequenz konnten die wenigsten transitiven GFP-siRNAs nachgewiesen werden. Wenn DIRS-1 ORF2 oder ORF3 Sequenzen als Fusion mit GFP exprimiert wurden, war die Produktion GFP-spezifischer siRNAs wesentlich effizienter (vgl. Abb. 46). Anscheinend wird die Amplifikationsmaschinerie eher zu ORF2 und ORF3 rekrutiert als zu ORF1. Diese Beobachtung spiegelt sich zum Teil in der Verteilung von endogenen DIRS-1 siRNAs wieder. Die Hochdurchsatzsequenzierung hat ergeben, dass zumindest in der ersten Hälfte von ORF1 nur wenige DIRS-1 siRNAs vorkommen. Die anderen Leserahmen weisen über ihre gesamte Länge hinweg *sense* und *antisense* DIRS-1 siRNAs auf (Abb. 46). Möglicherweise beeinflusst AgnA, wie in Kapitel 5.2.2 dargelegt, die spezifische Rekrutierung der Amplifikationsmaschinerie. In diesem Fall könnten assoziierte siRNAs als Spezifikationsfaktor dienen. Um diese Frage zu klären, muss überprüft werden, ob AgnA mit einem bestimmten Set an endogenen DIRS-1 siRNAs assoziiert ist. Denkbar ist, dass chemische Modifikationen an den siRNAs Einfluss darauf haben, welche von AgnA gebunden werden und welche womöglich in andere Effektor Komplexe geladen werden.

Basierend auf der Hochdurchsatzsequenzierung kleiner RNAs konnten lokale Spots identifiziert werden, in denen endogenen DIRS-1 siRNAs im agnA- Stamm akkumulierten. Diese waren insbesondere im 5'-Bereich von ORF1 und innerhalb der ITRs zu finden. Ähnliche Beobachtungen konnten für den rrpC- Stamm im Rahmen einer anderen Studie gemacht werden (Wiegand et al. 2014). Bisher können diese Unterschiede nicht zufriedenstellend erklärt werden. Man könnte spekulieren, dass andere RdRPs den Verlust von AgnA oder RrpC kompensieren. Es könnten aber auch primäre Dicer-Produkte sein, die sich in den Mutanten anreichern. Das erklärt allerdings nicht, warum es sich um Sequenzbereiche handelt, in denen im Wildtyp nur wenige siRNAs detektiert werden konnten.

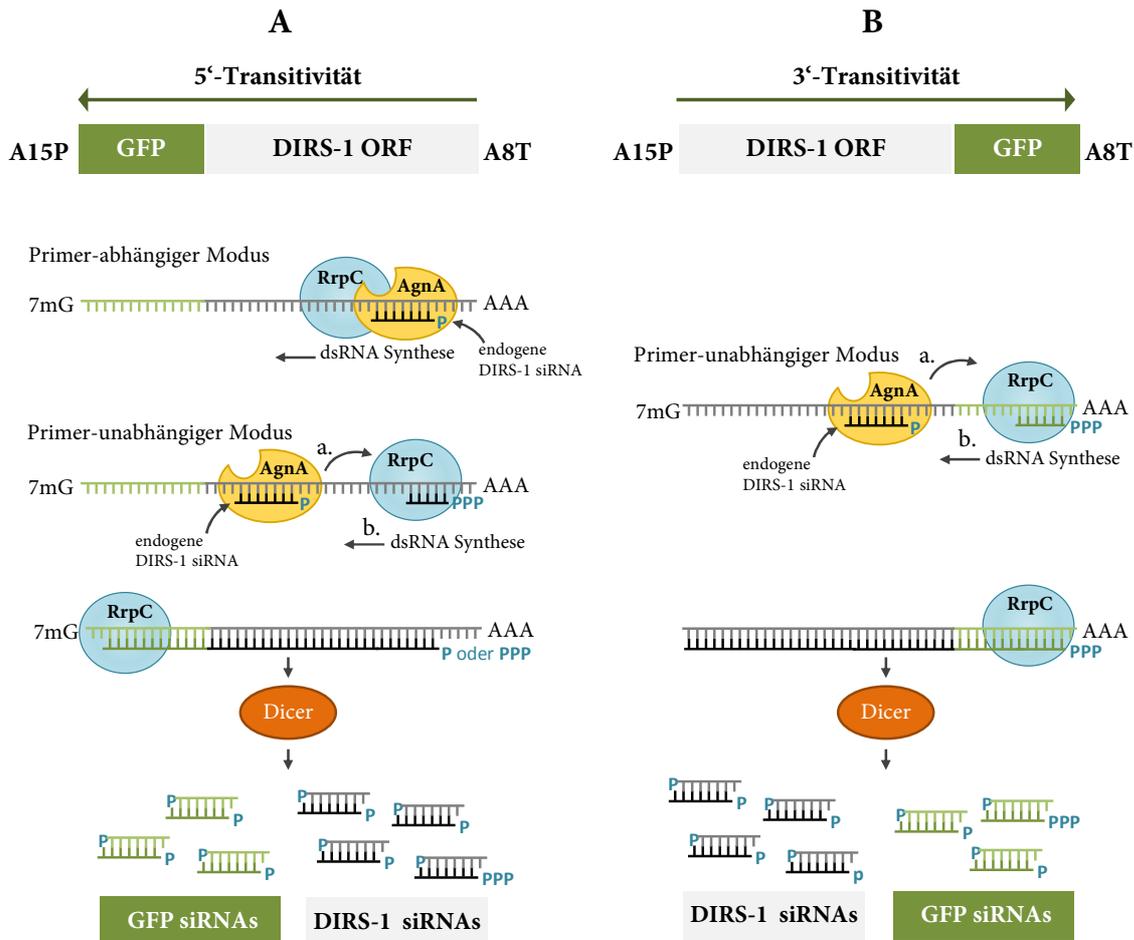


Abb. 53: Übersicht über die Mechanismen zur Produktion sekundärer DIRS-1 siRNAs

Modell Transitivität von DIRS-1 siRNAs . Oben sind jeweils schematisch die Konstrukte zur Untersuchung der 5'-Transitivität (A) und 3'-Transitivität (B) dargestellt. AgnA und die RdRP RrpC werden in der Amöbe für die Generierung sekundärer siRNAs benötigt. Möglicherweise rekrutiert AgnA in Assoziation mit einer gebundenen endogenen DIRS-1 siRNA die Amplifikationsmaschinerie zu DIRS-1 Sequenzen. RrpC ist als zentraler Proteinfaktor in der Lage, längere dsRNAs zu synthetisieren, die wahrscheinlich durch ein Dicer Homolog in sekundäre siRNAs prozessiert werden. Diese sind durch ein Monophosphat am 5'-Ende gekennzeichnet. **A:** Im Fall der 5'-Transitivität kann eine endogene DIRS-1 siRNA als Primer und somit als Startpunkt für die dsRNA Synthese genutzt werden. Eine *de novo* Synthese des komplementären RNA-Stranges ist aber ebenfalls denkbar. Angrenzende GFP-Sequenzen werden so in dsRNA konvertiert. Wenn sie von Dicer in siRNAs prozessiert werden, entstehen neben DIRS-1 siRNAs auch GFP-spezifische siRNAs. **B:** Die 3'-Transitivität muss Primer-unabhängig erfolgen, da keine primären GFP siRNAs zur Verfügung stehen. Möglicherweise wandert RrpC entlang der Transkripte, nachdem es zu DIRS-1 Sequenzen rekrutiert wurde und initiiert die *de-novo* dsRNA Synthese innerhalb der GFP-Sequenz. Es entstehen dsRNA Moleküle, die wiederum zu GFP siRNAs prozessiert werden können. Diese weisen nur in wenigen Fällen ein 5'-Triphosphat auf.

Basierend auf der Hochdurchsatzsequenzierung kleiner RNAs konnten lokale Spots identifiziert werden, in denen endogene DIRS-1 siRNAs im agnA- Stamm akkumulierten. Diese waren insbesondere im 5'-Bereich von ORF1 und innerhalb der ITRs zu finden. Ähnliche Beobachtungen konnten für den rrpC- Stamm im Rahmen einer anderen Studie gemacht werden

(Wiegand et al. 2014). Bisher können diese Unterschiede nicht zufriedenstellend erklärt werden. Man könnte spekulieren, dass andere RdRPs den Verlust von AgnA oder RrpC kompensieren. Es könnten aber auch primäre Dicer-Produkte sein, die sich in den Mutanten anreichern. Das erklärt allerdings nicht, warum es sich um Sequenzbereiche handelt, in denen im Wildtyp nur wenige siRNAs detektiert werden konnten.

5.2.9 Transkriptionelle Kontrolle von DIRS-1

Aufgrund der Beobachtung, dass AgnA Fusionsproteine auch im Nukleus von *D. discoideum* nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 35), stellte sich die Frage, ob das Protein womöglich auch an einer RNAi vermittelten transkriptionellen Kontrolle des Transposons beteiligt ist.

In *A. thaliana* sorgen die 24 nt langen casiRNAs für die transkriptionelle Stilllegung einiger Transposons (Xie et al. 2004). AGO4 und AGO6 vermitteln in Assoziation mit diesen siRNAs die DNA-Methylierung oder die Methylierung von Histon H3 an Lysin9, sodass repressive Chromatinstrukturen entstehen (Zilberman et al. 2003, Xie et al. 2005, Zheng et al. 2007). In *S. pombe* ist die RNAi Maschinerie für die Ausbildung von Heterochromatin in pericentromerischen Bereichen verantwortlich (zusammengefasst in Martienssen et al. 2005). Letzteres ist insofern interessant, da DIRS-1 vermutlich die Centromere in *D. discoideum* konstituiert (Glockner et al. 2009, Dubin et al. 2010), was eine Kontrolle auf Chromatinebene nahe legt. Ferner konnte gezeigt werden, dass DnmA - die einzige Methyltransferase der Amöbe - innerhalb der rechten DIRS-1 ITR aktiv ist. Dennoch hat der *Knockout* des Gens keine Anreicherung DIRS-1 spezifischer Transkripte zur Folge (Kuhlmann et al. 2005).

Gegen eine RNAi-vermittelte transkriptionelle Kontrolle von DIRS-1 spricht, dass endogene DIRS-1 siRNAs überwiegend im Cytoplasma der Zellen vorkommen (Boesler et al. 2014). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest einige davon, möglicherweise in Assoziation mit AgnA, in den Kern gelangen. Das Argonauten Protein NRDE-3 aus *C. elegans* akkumuliert beispielsweise nur dann im Zellkern, wenn es im Cytoplasma mit sekundären siRNAs beladen wurde (Guang et al. 2008). Auch in Pflanzen konnte eine überraschende Entdeckung gemacht werden: Obwohl casiRNAs nachweislich im Kern prozessiert werden (Pontes et al. 2006), akkumulieren sie dennoch im Cytoplasma von Pflanzenzellen (Ye et al. 2012). Dort wird AGO4 mit den siRNAs beladen und kann daraufhin in den Kern transportiert werden (Ye et al. 2012). Möglicherweise ist eine Assoziation von AgnA und siRNAs ebenfalls notwendig, damit das Protein in den Zellkern von *D. discoideum* transportiert wird. Allerdings muss in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass AgnA im Gegensatz zu AGO4 aus *A. thaliana* und NRDE-3 aus *C. elegans* kein typisches Kernlokalisierungssignal besitzt. Denkbar ist jedoch, dass weitere Proteine im Effektor-Komplex enthalten sind, die den Transport in den Kern vermitteln.

Um zu klären, ob AgnA einen Effekt auf die transkriptionelle Kontrolle von DIRS-1 hat, wurde die Promotoraktivität beider ITRs im Hintergrund des agnA- Stammes und des Wildtyps mit Hilfe von Reporterkonstrukten untersucht. Da keine Unterschiede festgestellt werden konnten (vgl. Abb. 47), ist eine ausschließlich posttranskriptionelle Regulation von DIRS-1 durch die RNAi-Maschinerie wahrscheinlich. Um diese Frage jedoch endgültig zu klären, muss die Chromatinstruktur endogener DIRS-1 Elemente im AX2 und in verschiedenen RNAi-Mutanten durch vergleichende DNA-Bisulfit-Sequenzierung oder durch Chromatin-IPs untersucht werden.

Für die Reporter-gen gestützte Analyse der DIRS-1 ITR Promotoraktivität wurden extrachromosomale Plasmide verwendet. Diese zeichnen sich durch eine hohe Transformations-effizienz aus (Veltman et al. 2009). Aufgrund der kontrollierten Kopienzahl kann zudem die homogene Expression eines Transgens in unterschiedlichen Zelllinien erreicht werden, was vergleichende Analysen erleichtert (Hughes et al. 1989). Allerdings ist wenig über die Chromatinstruktur dieser Plasmide bekannt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sich die transgenen DIRS-1 ITRs von den endogenen DIRS-1 ITRs unterscheiden.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dennoch darauf hin, dass DIRS-1 ausschließlich auf posttranskriptioneller Ebene durch die RNAi-Maschinerie reguliert wird. Es ist daher wahrscheinlich, dass AgnA im Kern alternative Aufgaben jenseits der DIRS-1 vermittelten Stilllegung wahrnimmt. Argonauten Proteine haben im Nukleus von Eukaryoten vielfältige Funktionen: aus *D. melanogaster* ist beispielsweise bekannt, dass Ago2 am alternativen Splicen von mRNAs beteiligt ist (Taliaferro et al. 2013). Im Fall von AgnA müssen zukünftige Untersuchungen klären, welche Funktion das Protein im Kern von *D. discoideum* ausübt.

6 Zusammenfassung

Die RNA vermittelte Genregulation ist in Eukaryoten hoch konserviert und wurde insbesondere in Tieren und Pflanzen intensiv erforscht. Längere dsRNA Moleküle gelten als Auslöser dieser Regulationsmechanismen: Sie werden von RNase III Enzymen wie Dicer oder Drosha und ihren dsRNA bindenden Proteinpartnern in *microRNAs* (miRNAs) oder in *small interfering RNAs* (siRNAs) prozessiert. Der Pool an siRNAs wird in einigen Organismen durch die Aktivität von RNA abhängigen RNA-Polymerasen (RdRPs) erweitert. Argonauten Proteine binden kleine RNAs, werden so zu komplementären Ziel-RNAs rekrutiert und vermitteln daraufhin die transkriptionelle oder posttranskriptionelle Stilllegung von Genen. *Dictyostelium discoideum* kodiert zwei Dicer-Homologe (DrnA und DrnB), fünf Argonauten Proteine (AgnA-AgnE) und drei RdRPs (RrpA-RrpC). Darüber hinaus konnten sowohl miRNAs als auch siRNAs identifiziert werden, wobei letztere zum überwiegenden Teil vom Retrotransposon DIRS-1 abstammen.

Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der miRNA-Biogenese in *D. discoideum*. Es stellte sich heraus, dass das dsRNA bindende Protein RbdB für die Prozessierung dieser regulatorischen RNAs essentiell ist. In den generierten rbdB- Stämmen waren keine muren miRNAs detektierbar, was ebenfalls für *drnB* Mutanten zutreffend ist. Gleichzeitig akkumulierten miRNA-Vorläufermoleküle (pri-miRNAs) in rbdB- und in drnB- Stämmen. Beide Proteine tragen somit zur Prozessierung dieser Vorläufermoleküle bei. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei RbdB um ein kernlokalisiertes Protein handelt, das diffus im Nukleoplasma verteilt ist und in distinkten perinukleolären Foci akkumuliert. Diese weisen Ähnlichkeiten zu den aus *A. thaliana* bekannten *Dicing*-Bodies auf, die ebenfalls für die miRNA-Prozessierung essentielle Proteinkomponenten enthalten.

Die Ergebnisse weisen in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass dsRBPs als Partner von RNase III Enzymen nicht nur in höheren Eukaryoten, sondern auch in der Gruppe der Amoebozoa für die miRNA-Prozessierung notwendig sind. Anders als in Pflanzen ist das Zinkfingerprotein Serrate (SE), dessen Homolog in *D. discoideum* als SrtA bezeichnet wird, nicht für eine effiziente miRNA-Prozessierung relevant, was durch Untersuchungen eines entsprechenden *Knockdown*-Stamms gezeigt werden konnte.

Die Beobachtung, dass bekannte miRNAs in verschiedenen *Knockout*-Stämmen differentiell exprimiert werden, sollte genutzt werden, um weitere RNAs dieser Klasse durch Illumina®-Sequenzierung zu identifizieren. Die Anreicherung von miRNAs im agnA- Stamm und die

Abreicherung im rbdB- Stamm waren Kriterien, die erfolgreich zur Suche und Validierung neuer miRNA-Kandidaten genutzt werden konnten.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der posttranskriptionellen Stilllegung des DIRS-1 Retrotransposons und seiner Amplifikation. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass DIRS-1 Transkripte und extrachromosomale DIRS-1 DNA Moleküle im Hintergrund des agnA- Stammes akkumulierten. Dieser Phänotyp korrelierte mit dem Verlust endogener DIRS-1 siRNAs. Die Hochdurchsatzsequenzierung kleiner RNAs aus dem AX2 Wildtyp und dem agnA- Stamm bestätigte die deutliche Abreicherung von DIRS-1 siRNAs in der Mutante, die ca. 70 % ausmachte. Es stellte sich zudem heraus, dass die regulatorischen RNAs ungleichmäßig entlang des DIRS-1 Retrotransposons verteilt waren: Innerhalb der *inverted terminal repeats* (ITRs) und in der ersten Hälfte des *gag* Gens konnten im Wildtyp nur sehr wenige nachgewiesen werden. Zudem waren *sense* und *antisense* siRNAs nicht symmetrisch verteilt.

Mit Hilfe verschiedener Reporterkonstrukte konnte indirekt nachgewiesen werden, dass AgnA für die RrpC vermittelte Produktion sekundärer DIRS-1 siRNAs notwendig ist. Es stellte sich außerdem heraus, dass eine siRNA-Amplifikation in 5'- und in 3'-Richtung möglich ist.

Weiterführende Analysen zeigten, dass nicht nur DIRS-1 *sense* Transkripte, sondern auch die von ORF2 und ORF3 kodierten Proteine im agnA- Stamm angereichert sind. Die Amplifikation endogener DIRS-1 siRNAs ist offenbar notwendig, um die Akkumulation der Tyrosin-Rekombinase (ORF2) und der Reversen Transkriptase (ORF3) auf Proteinebene zu verhindern. Das von ORF1 kodierte Hüllprotein GAG Protein war sowohl im Wildtyp- als auch im agnA-Hintergrund nachweisbar, was möglicherweise die ungleichmäßige Verteilung endogener DIRS-1 siRNAs entlang des Retrotransposons reflektiert.

Southern Blot und PCR-Analysen demonstrierten, dass die extrachromosomale DIRS-1 DNA im Cytoplasma des agnA- Stammes lokalisiert und komplementär zu *sense* Transkripten intakter DIRS-1 Elemente ist. Vieles weist darauf hin, dass es sich um unvollständige cDNA-Intermediate handelt, die im *Knockout*-Hintergrund durch die Aktivität der Reversen Transkriptase entstehen. Möglicherweise dienen Virus-ähnliche Partikel (VLPs) als Orte der cDNA-Synthese. Das von DIRS-1 kodierte putative GAG Protein bildet zumindest Homomere und lokalisiert in distinkten cytoplasmatischen Foci. Zudem waren deutliche Anreicherungen in der Nähe des Zellkerns erkennbar.

7 Summary

RNA mediated gene silencing pathways are highly conserved among eukaryotes and they have been well investigated in animals and in plants. Longer dsRNA molecules trigger the silencing pathways: RNase III proteins and their dsRNA binding protein (dsRBP) partners recognize those molecules as a substrate and process 21 nucleotide long microRNAs (miRNAs) or small interfering RNAs (siRNAs). Some organisms encode RNA dependent RNA polymerases (RdRPs), which are able to expand the pool of existing siRNAs. Argonaute proteins are able to bind small regulatory RNAs and are subsequently recruited to target mRNAs by base complementarity. This leads in turn to transcriptional or posttranscriptional silencing of respective genes. The *Dictyostelium discoideum* genome encodes two Dicer homologues (DrnA and DrnB), five Argonaute proteins (AgnA to AgnE) and three RdRPs (RrpA to RrpC). In addition, the amoeba is known to express miRNAs and siRNAs, while the latter derive mainly from the DIRS-1 retrotransposon.

One part of this work focused on the miRNA biogenesis pathway of *D. discoideum*. It was shown that the dsRNA binding protein RbdB is a necessary component for miRNA processing in the amoeba. There were no mature miRNAs detectable by Northern blot analysis in *rbdB*- strains, which is also true for *drnB* mutants. Moreover, primary miRNA-transcripts (pri-miRNAs) accumulated in *rbdB*- and *drnB*- strains. Fluorescence microscopy studies showed a nuclear localization of RbdB. RbdB accumulated in distinct perinucleolar foci. These were reminiscent of plant dicing bodies that contain essential protein components for miRNA processing. It is well known that RNase III enzymes and dsRBPs work together during miRNA processing in higher eukaryotes. This work demonstrated that the same is true for members of the amoebzoa supergroup. In *Arabidopsis* the nuclear zinc finger protein Serrate (SE) is also necessary for miRNA processing. The *D. discoideum* homologue SrtA, however, is not relevant which has been shown by the analysis of the respective knockdown strain.

MiRNAs are known to be differentially expressed in several RNAi *knockout* strains. The accumulation of miRNAs in *agnA*- strains and a strong decrease in *rbdB*- strains were criteria that could thus be successfully used (among others) to identify and validate new miRNAs candidates by Illumina®-RNA sequencing.

In another part of this study, the silencing and amplification of the DIRS-1 retrotransposons was analyzed in more detail. It was already known that DIRS-1 transcripts and extrachromosomal DIRS-1 DNA molecules accumulated in *agnA*- strains. This phenotype was correlated with the loss of endogenous DIRS-1 siRNAs in the knockout strain. By deep sequencing analysis of small

RNAs from the AX2 wild type and the *agnA*- strain, the strong decrease of endogenous DIRS-1 siRNAs in the mutant strain (accounting for 70 %) could be confirmed. Further analysis of the data revealed an unequal distribution of DIRS-1 derived siRNAs along the retroelement in the wild type strain, since only very few of them matched the inverted terminal repeats (ITRs) and the 5'- half of the first open reading frame (ORF). Besides, sense and antisense siRNAs were asymmetrically distributed, as well.

By using different reporter constructs it was shown indirectly that *AgnA* is necessary for the RrpC mediated production of secondary DIRS-1 siRNAs. These analyses also demonstrated an amplification of siRNAs in 5'- and in 3'-direction.

Further analysis of the *agnA*- strain revealed that not only DIRS-1 sense transcripts but also ORF2 and ORF3 encoded proteins were enriched. In contrast, the ORF1 encoded protein GAG was equally expressed in the mutant and the wild type. This might reflect the unequal distribution of endogenous DIRS-1 siRNAs along the retrotransposon.

Southern Blot and PCR-analyses showed that extrachromosomal DIRS-1 DNA molecules are present in the cytoplasm of *agnA*- strains and that they are complementary to sense transcripts of intact DIRS-1 elements. Thus, the extrachromosomal DIRS-1 intermediates are likely incomplete cDNA molecules generated by the DIRS-1 encoded reverse transcriptase. One could hypothesize that virus like particles (VLPs) are the places of DIRS-1 cDNA synthesis. At least, DIRS-1 GAG proteins interact and fluorescence microscopy studies showed that they localize in distinct cytoplasmic foci which accumulate in close proximity to the nuclei.

8 Literaturverzeichnis

- Adl, S. M., A. G. Simpson, C. E. Lane, et al. (2012). "The revised classification of eukaryotes." *J Eukaryot Microbiol* **59**(5): 429-493.
- Allen, E., Z. Xie, A. M. Gustafson, et al. (2004). "Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*." *Nat Genet* **36**(12): 1282-1290.
- Aravin, A. A., N. M. Naumova, A. V. Tulin, et al. (2001). "Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline." *Curr Biol* **11**(13): 1017-1027.
- Auyeung, V. C., I. Ulitsky, S. E. McGeary and D. P. Bartel (2013). "Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing." *Cell* **152**(4): 844-858.
- Avesson, L., J. Reimegard, E. G. Wagner and F. Soderbom (2012). "MicroRNAs in Amoebozoa: deep sequencing of the small RNA population in the social amoeba *Dictyostelium discoideum* reveals developmentally regulated microRNAs." *RNA* **18**(10): 1771-1782.
- Baumberger, N. and D. C. Baulcombe (2005). "Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11928-11933.
- Beclin, C., S. Boutet, P. Waterhouse and H. Vaucheret (2002). "A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants." *Curr Biol* **12**(8): 684-688.
- Beliakova-Bethell, N., C. Beckham, T. H. Giddings, Jr., et al. (2006). "Virus-like particles of the Ty3 retrotransposon assemble in association with P-body components." *RNA* **12**(1): 94-101.
- Berezikov, E., W. J. Chung, J. Willis, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." *Mol Cell* **28**(2): 328-336.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**(6818): 363-366.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **62**(3): 293-300.
- Boesler, B. (2012). Molekularbiologische Charakterisierung der Argonauten Proteine AgnA und AgnB innerhalb der RNA vermittelten Genregulation in *D. discoideum*. Ph.D., Universität Kassel.
- Boesler, B., D. Meier, K. U. Forstner, et al. (2014). "Argonaute proteins affect siRNA levels and accumulation of a novel extrachromosomal DNA from the *Dictyostelium* retrotransposon DIRS-1." *J Biol Chem* **289**(51): 35124-35138.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski and D. Gorlich (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." *RNA* **10**(2): 185-191.
- Bologna, N. G., A. L. Schapire and J. F. Palatnik (2013). "Processing of plant microRNA precursors." *Brief Funct Genomics* **12**(1): 37-45.
- Brennecke, J., A. A. Aravin, A. Stark, et al. (2007). "Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*." *Cell* **128**(6): 1089-1103.
- Brodersen, P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, et al. (2008). "Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs." *Science* **320**(5880): 1185-1190.
- Buhler, M., A. Verdel and D. Moazed (2006). "Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing." *Cell* **125**(5): 873-886.
- Buttlar, J. (2013). RNA vermittelte Genregulation in *Dictyostelium discoideum*: das Protein dsRBD-B. B.Sc., Universität Kassel.

- Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." *RNA* **10**(12): 1957-1966.
- Cappello, J., S. M. Cohen and H. F. Lodish (1984). "Dictyostelium transposable element DIRS-1 preferentially inserts into DIRS-1 sequences." *Mol Cell Biol* **4**(10): 2207-2213.
- Cappello, J., K. Handelsman and 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): 105-115.
- Carmell, M. A., Z. Xuan, M. Q. Zhang and G. J. Hannon (2002). "The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis." *Genes Dev* **16**(21): 2733-2742.
- Castel, S. E. and R. A. Martienssen (2013). "RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond." *Nat Rev Genet* **14**(2): 100-112.
- Cerutti, H. and J. A. Casas-Mollano (2006). "On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man." *Curr Genet* **50**(2): 81-99.
- Checkley, M. A., K. Nagashima, S. J. Lockett, et al. (2010). "P-body components are required for Ty1 retrotransposition during assembly of retrotransposition-competent virus-like particles." *Mol Cell Biol* **30**(2): 382-398.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* **436**(7051): 740-744.
- Chisholm, R. L. and R. A. Firtel (2004). "Insights into morphogenesis from a simple developmental system." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(7): 531-541.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Chung, S., C. Zuker and H. F. Lodish (1983). "A repetitive and apparently transposable DNA sequence in Dictyostelium discoideum associated with developmentally regulated RNAs." *Nucleic Acids Res* **11**(14): 4835-4852.
- Church, G. M. and W. Gilbert (1984). "Genomic sequencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 1991-1995.
- Cohen, S. M., J. Cappello and H. F. Lodish (1984). "Transcription of Dictyostelium discoideum transposable element DIRS-1." *Mol Cell Biol* **4**(11): 2332-2340.
- Cohen, S. N., A. C. Chang and L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2110-2114.
- Collier, S., A. Pendle, K. Boudonck, et al. (2006). "A distant coilin homologue is required for the formation of cajal bodies in Arabidopsis." *Mol Biol Cell* **17**(7): 2942-2951.
- Colmenares, S. U., S. M. Buker, M. Buhler, et al. (2007). "Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi." *Mol Cell* **27**(3): 449-461.
- Czech, B., C. D. Malone, R. Zhou, et al. (2008). "An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila." *Nature* **453**(7196): 798-802.
- Dalmay, T., A. Hamilton, S. Rudd, et al. (2000). "An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus." *Cell* **101**(5): 543-553.
- Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-235.
- Dlatic, M. (2006). "DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold." *Bioinformatics* **22**(22): 2711-2714.

- Dong, Z., M. H. Han and N. Fedoroff (2008). "The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 9970-9975.
- Doyle, M., L. Jaskiewicz and W. Filipowicz (2012). Dicer Proteins and Their Role in Gene Silencing Pathways. *Eukaryotic RNases and their Partners in RNA Degradation and Biogenesis, Part B*. F. Guo and F. Tamanoi. Burlington, Academic Press. **32**: 35.
- Du, L. and A. Pertselidis (2011). "Cancer and neurodegenerative disorders: pathogenic convergence through microRNA regulation." *J Mol Cell Biol* **3**(3): 176-180.
- Dubin, M. (2010). *Nuclear organisation and epigenetic regulation of gene expression in Dictyostelium discoideum* Doktorarbeit, Universität Kassel.
- Dubin, M., J. Fuchs, R. Graf, et al. (2010). "Dynamics of a novel centromeric histone variant CenH3 reveals the evolutionary ancestral timing of centromere biogenesis." *Nucleic Acids Res* **38**(21): 7526-7537.
- Dubin, M. and 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 and 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): 352-362.
- Dugar, G., A. Herbig, K. U. Forstner, et al. (2013). "High-resolution transcriptome maps reveal strain-specific regulatory features of multiple Campylobacter jejuni isolates." *PLoS Genet* **9**(5): e1003495.
- Eichinger, L., J. A. Pachebat, G. Glockner, et al. (2005). "The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum." *Nature* **435**(7038): 43-57.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* **411**(6836): 494-498.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* **15**(2): 188-200.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant and E. Izaurralde (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 9-22.
- Faix, J., L. Kreppel, G. Shaulsky, et al. (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.
- Faix, J., M. Steinmetz, H. Boves, et al. (1996). "Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail." *Cell* **86**(4): 631-642.
- Fang, Y. and D. L. Spector (2007). "Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants." *Curr Biol* **17**(9): 818-823.
- Farabaugh, P. J. (1996). "Programmed translational frameshifting." *Annu Rev Genet* **30**: 507-528.
- Fey, P., A. S. Kowal, P. Gaudet, et al. (2007). "Protocols for growth and development of Dictyostelium discoideum." *Nat Protoc* **2**(6): 1307-1316.
- Fierro-Monti, I. and M. B. Mathews (2000). "Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions." *Trends Biochem Sci* **25**(5): 241-246.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Firtel, R. A., C. Silan, T. E. Ward, et al. (1985). "Extrachromosomal replication of shuttle vectors in Dictyostelium discoideum." *Mol Cell Biol* **5**(11): 3241-3250.

- Forstemann, K., Y. Tomari, T. Du, et al. (2005). "Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein." *PLoS Biol* **3**(7): e236.
- Friedrich, M., D. Meier, I. Schuster and W. Nellen (2015). "A Simple Retroelement Based Knock-Down System in Dictyostelium: Further Insights into RNA Interference Mechanisms." *PLoS One* **10**(6): e0131271.
- Gaudet, P., K. E. Pilcher, P. Fey and R. L. Chisholm (2007). "Transformation of Dictyostelium discoideum with plasmid DNA." *Nat Protoc* **2**(6): 1317-1324.
- Gazzani, S., T. Lawrenson, C. Woodward, et al. (2004). "A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis." *Science* **306**(5698): 1046-1048.
- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." *Nat Rev Genet* **10**(2): 94-108.
- Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon and M. A. Carmell (2006). "A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins." *Nature* **442**(7099): 199-202.
- Glockner, G. and A. J. Heidel (2009). "Centromere sequence and dynamics in Dictyostelium discoideum." *Nucleic Acids Res* **37**(6): 1809-1816.
- Glockner, G., K. Szafranski, T. Winckler, et al. (2001). "The complex repeats of Dictyostelium discoideum." *Genome Res* **11**(4): 585-594.
- Goodwin, T. J. and R. T. Poulter (2001). "The DIRS1 group of retrotransposons." *Mol Biol Evol* **18**(11): 2067-2082.
- Goodwin, T. J. and R. T. Poulter (2004). "A new group of tyrosine recombinase-encoding retrotransposons." *Mol Biol Evol* **21**(4): 746-759.
- Gorlich, D., S. Kostka, R. Kraft, et al. (1995). "Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope." *Curr Biol* **5**(4): 383-392.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* **432**(7014): 235-240.
- Grigg, S. P., C. Canales, A. Hay and M. Tsiantis (2005). "SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in Arabidopsis." *Nature* **437**(7061): 1022-1026.
- Grindley, N. D., K. L. Whiteson and P. A. Rice (2006). "Mechanisms of site-specific recombination." *Annu Rev Biochem* **75**: 567-605.
- Grishok, A., A. E. Pasquinelli, D. Conte, et al. (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing." *Cell* **106**(1): 23-34.
- Guang, S., A. F. Bochner, D. M. Pavelec, et al. (2008). "An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus." *Science* **321**(5888): 537-541.
- Gunawardane, L. S., K. Saito, K. M. Nishida, et al. (2007). "A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*." *Science* **315**(5818): 1587-1590.
- Haase, A. D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, et al. (2005). "TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing." *EMBO Rep* **6**(10): 961-967.
- Hall, T. M. (2005). "Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins." *Curr Opin Struct Biol* **15**(3): 367-373.
- Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." *Genes Dev* **18**(24): 3016-3027.
- Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." *Cell* **125**(5): 887-901.

- Han, M. H., S. Goud, L. Song and N. Fedoroff (2004). "The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 1093-1098.
- Hand, E. S. and W. P. Jencks (1962). "Mechanism of the reaction of imidoesters with amines." J. Am. Chem. Soc **84**: 3505-3514.
- Havecker, E. R., X. Gao and D. F. Voytas (2004). "The diversity of LTR retrotransposons." Genome Biol **5**(6): 225.
- Hinas, A., J. Reimegard, E. G. Wagner, et al. (2007). "The small RNA repertoire of Dictyostelium discoideum and its regulation by components of the RNAi pathway." Nucleic Acids Res **35**(20): 6714-6726.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-59.
- Hock, J. and G. Meister (2008). "The Argonaute protein family." Genome Biol **9**(2): 210.
- Horton, P., K. J. Park, T. Obayashi, et al. (2007). "WoLF PSORT: protein localization predictor." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W585-587.
- Horwich, M. D., C. Li, C. Matranga, et al. (2007). "The Drosophila RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC." Curr Biol **17**(14): 1265-1272.
- Hughes, J. E. and D. L. Welker (1989). "Copy number control and compatibility of nuclear plasmids in Dictyostelium discoideum." Plasmid **22**(3): 215-223.
- Hunter, S., P. Jones, A. Mitchell, et al. (2012). "InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D306-312.
- Huntzinger, E. and 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, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.
- Irwin, B., M. Aye, P. Baldi, et al. (2005). "Retroviruses and yeast retrotransposons use overlapping sets of host genes." Genome Res **15**(5): 641-654.
- Iwasaki, S., M. Kobayashi, M. Yoda, et al. (2010). "Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes." Mol Cell **39**(2): 292-299.
- Iyer, L. M., E. V. Koonin and L. Aravind (2003). "Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases." BMC Struct Biol **3**: 1.
- Jaaskelainen, M., A. H. Mykkanen, T. Arna, et al. (1999). "Retrotransposon BARE-1: expression of encoded proteins and formation of virus-like particles in barley cells." Plant J **20**(4): 413-422.
- Jiang, F., X. Ye, X. Liu, et al. (2005). "Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in Drosophila." Genes Dev **19**(14): 1674-1679.
- Johnston, M., M. C. Geoffroy, A. Sobala, et al. (2010). "HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells." Mol Biol Cell **21**(9): 1462-1469.
- Jones-Rhoades, M. W. and D. P. Bartel (2004). "Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA." Mol Cell **14**(6): 787-799.
- Kang, D., Y. S. Gho, M. Suh and C. Kang (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." Bull. Korean Chem. Soc. **Vol. 23, No. 11** 1511.
- Kawashima, K., M. Sameshima and M. Izawa (1979). "Isolation of Nucleoli from the Cellular Slime Mold, Dictyostelium discoideum, Strain A-3." Cell Structure and Function. **Vol. 4, No. 3** 183-191.

- Kenna, M. A., C. B. Brachmann, S. E. Devine and J. D. Boeke (1998). "Invading the yeast nucleus: a nuclear localization signal at the C terminus of Ty1 integrase is required for transposition in vivo." *Mol Cell Biol* **18**(2): 1115-1124.
- Kessin, R. H., Ed. (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, et al. (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." *Genes Dev* **15**(20): 2654-2659.
- Kosugi, S., M. Hasebe, T. Entani, et al. (2008). "Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling." *Chem Biol* **15**(9): 940-949.
- Kosugi, S., M. Hasebe, M. Tomita and H. Yanagawa (2009). "Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(25): 10171-10176.
- Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D152-157.
- Kruse, J. (2014). Dicer-like proteins in Dictyostelium discoideum. In vivo and in vitro approaches to reveal function and contribution in small regulatory RNA processing. Ph.D., Jacobs University.
- Kuhlmann, M., B. E. Borisova, M. Kaller, et al. (2005). "Silencing of retrotransposons in Dictyostelium by DNA methylation and RNAi." *Nucleic Acids Res* **33**(19): 6405-6417.
- Kurihara, Y., Y. Takashi and Y. Watanabe (2006). "The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis." *RNA* **12**(2): 206-212.
- Kurihara, Y. and Y. Watanabe (2004). "Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12753-12758.
- Kwak, P. B. and Y. Tomari (2012). "The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly." *Nat Struct Mol Biol* **19**(2): 145-151.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Landthaler, M., A. Yalcin and 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): 2162-2167.
- Lange, A., R. E. Mills, C. J. Lange, et al. (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha." *J Biol Chem* **282**(8): 5101-5105.
- Laubinger, S., T. Sachsenberg, G. Zeller, et al. (2008). "Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(25): 8795-8800.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., J. Han, K. H. Yeom, et al. (2006). "Drosha in primary microRNA processing." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 51-57.
- Lee, Y., I. Hur, S. Y. Park, et al. (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." *EMBO J* **25**(3): 522-532.

- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *EMBO J* **21**(17): 4663-4670.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J* **23**(20): 4051-4060.
- Letunic, I., T. Doerks and P. Bork (2014). "SMART: recent updates, new developments and status in 2015." *Nucleic Acids Res.*
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* **115**(7): 787-798.
- Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde and M. Sattler (2004). "Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain." *Nat Struct Mol Biol* **11**(6): 576-577.
- Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* **305**(5689): 1437-1441.
- Liu, J., F. V. Rivas, J. Wohlschlegel, et al. (2005). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." *Nat Cell Biol* **7**(12): 1261-1266.
- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon and R. Parker (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-723.
- Liu, Q., T. A. Rand, S. Kalidas, et al. (2003). "R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway." *Science* **301**(5641): 1921-1925.
- Liu, Q., Q. Yan, Y. Liu, et al. (2013). "Complementation of HYPONASTIC LEAVES1 by double-strand RNA-binding domains of DICER-LIKE1 in nuclear dicing bodies." *Plant Physiol* **163**(1): 108-117.
- Liu, X., J. K. Park, F. Jiang, et al. (2007). "Dicer-1, but not Loquacious, is critical for assembly of miRNA-induced silencing complexes." *RNA* **13**(12): 2324-2329.
- Liu, Y., X. Ye, F. Jiang, et al. (2009). "C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation." *Science* **325**(5941): 750-753.
- Lobbes, D., G. Rallapalli, D. D. Schmidt, et al. (2006). "SERRATE: a new player on the plant microRNA scene." *EMBO Rep* **7**(10): 1052-1058.
- Loomis, W. F., Ed. (1975). *Dictyostelium discoideum - A developmental system* New-York, Academic Press.
- Lu, C. and N. Fedoroff (2000). "A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin." *Plant Cell* **12**(12): 2351-2366.
- Lu, C., K. Kulkarni, F. F. Souret, et al. (2006). "MicroRNAs and other small RNAs enriched in the Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant." *Genome Res* **16**(10): 1276-1288.
- Luo, Z. and Z. Chen (2007). "Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis." *Plant Cell* **19**(3): 943-958.
- Ma, E., K. Zhou, M. A. Kidwell and J. A. Doudna (2012). "Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing." *J Mol Biol* **422**(4): 466-476.
- Ma, H., Y. Wu, J. G. Choi and H. Wu (2013). "Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(51): 20687-20692.
- Ma, J. B., K. Ye and D. J. Patel (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." *Nature* **429**(6989): 318-322.
- Ma, J. B., Y. R. Yuan, G. Meister, et al. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein." *Nature* **434**(7033): 666-670.
- Maclean, N., K. Garside, M. C. Bradley and C. Wood (1984). "The Nucleus of Axenically Grown Dictyostelium-Discoideum - Studies on Its Division Cycle, Isolation and Conformation." *Experientia* **40**(11): 1207-1214.

- Maida, Y. and K. Masutomi (2011). "RNA-dependent RNA polymerases in RNA silencing." Biol Chem **392**(4): 299-304.
- Maier, T., M. Guell and L. Serrano (2009). "Correlation of mRNA and protein in complex biological samples." FEBS Lett **583**(24): 3966-3973.
- Maniak, M., R. Rauchenberger, R. Albrecht, et al. (1995). "Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag." Cell **83**(6): 915-924.
- Manis, J. P. (2007). "Knock out, knock in, knock down--genetically manipulated mice and the Nobel Prize." N Engl J Med **357**(24): 2426-2429.
- Martens, H., J. Novotny, J. Oberstrass, et al. (2002). "RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase." Mol Biol Cell **13**(2): 445-453.
- Martienssen, R. A., M. Zaratiegui and D. B. Goto (2005). "RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Trends Genet **21**(8): 450-456.
- Maslah, G., P. Barraud and F. H. Allain (2013). "RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence." Cell Mol Life Sci **70**(11): 1875-1895.
- Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, et al. (2005). "Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes." Cell **123**(4): 607-620.
- Mattson, G., E. Conklin, S. Desai, et al. (1993). "A practical approach to crosslinking." Mol Biol Rep **17**(3): 167-183.
- Meister, G. (2013). "Argonaute proteins: functional insights and emerging roles." Nat Rev Genet **14**(7): 447-459.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Mol Cell **15**(2): 185-197.
- Meister, G., M. Landthaler, L. Peters, et al. (2005). "Identification of novel argonaute-associated proteins." Curr Biol **15**(23): 2149-2155.
- Mitchell, A., H. Y. Chang, L. Daugherty, et al. (2015). "The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years." Nucleic Acids Res **43**(Database issue): D213-221.
- Moerman, A. M. and C. Klein (1998). "Dictyostelium discoideum Hsp32 is a resident nucleolar heat-shock protein." Chromosoma **107**(3): 145-154.
- Moissiard, G., E. A. Parizotto, C. Himber and 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): 1268-1278.
- Moog, K. (2011). HelF und sein Interaktionspartner Xrn1: zwei Regulatoren der RNA-Interferenz in D. discoideum. Ph.D., Universität Kassel.
- Moore, S. P., L. A. Rinckel and D. J. Garfinkel (1998). "A Ty1 integrase nuclear localization signal required for retrotransposition." Mol Cell Biol **18**(2): 1105-1114.
- Motamedi, M. R., A. Verdel, S. U. Colmenares, et al. (2004). "Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs." Cell **119**(6): 789-802.
- Mourrain, P., C. Beclin, T. Elmayer, et al. (2000). "Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance." Cell **101**(5): 533-542.
- Müller, S. (2011). Biologische Funktionsanalyse und identifizierung neuer Substrate der Methyltransferase Dnmt2 Ph.D., Universität Kassel.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Nellen, W. and R. A. Firtel (1985). "High-copy-number transformants and co-transformation in Dictyostelium." Gene **39**(2-3): 155-163.

- Nguyen Ba, A. N., A. Pogoutse, N. Provard and A. M. Moses (2009). "NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction." *BMC Bioinformatics* **10**: 202.
- Nguyen, T. A., M. H. Jo, Y. G. Choi, et al. (2015). "Functional Anatomy of the Human Microprocessor." *Cell* **161**(6): 1374-1387.
- Nicol, J. W., G. A. Helt, S. G. Blanchard, Jr., et al. (2009). "The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets." *Bioinformatics* **25**(20): 2730-2731.
- Oishi, M. and S. D. Cosloy (1972). "The genetic and biochemical basis of the transformability of *Escherichia coli* K12." *Biochem Biophys Res Commun* **49**(6): 1568-1572.
- Okamura, K., J. W. Hagen, H. Duan, et al. (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*." *Cell* **130**(1): 89-100.
- Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M. C. Siomi (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." *Genes Dev* **18**(14): 1655-1666.
- Onodera, Y., J. R. Haag, T. Ream, et al. (2005). "Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation." *Cell* **120**(5): 613-622.
- Ostlund, G., T. Schmitt, K. Forslund, et al. (2010). "InParanoid 7: new algorithms and tools for eukaryotic orthology analysis." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D196-203.
- Pak, J. and A. Fire (2007). "Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*." *Science* **315**(5809): 241-244.
- Pak, J., J. M. Maniar, C. C. Mello and A. Fire (2012). "Protection from feed-forward amplification in an amplified RNAi mechanism." *Cell* **151**(4): 885-899.
- Pall, G. S., C. Codony-Servat, J. Byrne, et al. (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.
- Parikh, A., E. R. Miranda, M. Katoh-Kurasawa, et al. (2010). "Conserved developmental transcriptomes in evolutionarily divergent species." *Genome Biol* **11**(3): R35.
- Park, J. E., I. Heo, Y. Tian, et al. (2011). "Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing." *Nature* **475**(7355): 201-205.
- Park, M. Y., G. Wu, A. Gonzalez-Sulser, et al. (2005). "Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3691-3696.
- Parker, G. S., D. M. Eckert and B. L. Bass (2006). "RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA." *RNA* **12**(5): 807-818.
- Parker, J. S., S. M. Roe and D. Barford (2005). "Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex." *Nature* **434**(7033): 663-666.
- Parker, R. and H. Song (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover." *Nat Struct Mol Biol* **11**(2): 121-127.
- Parrish, S. and A. Fire (2001). "Distinct roles for RDE-1 and RDE-4 during RNA interference in *Caenorhabditis elegans*." *RNA* **7**(10): 1397-1402.
- Petersen, B. O. and M. Albrechtsen (2005). "Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants." *Plant Mol Biol* **58**(4): 575-583.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Piednoel, M., I. R. Goncalves, D. Higuete and E. Bonnivard (2011). "Eukaryote DIRS1-like retrotransposons: an overview." *BMC Genomics* **12**: 621.
- Pontes, O., C. F. Li, P. Costa Nunes, et al. (2006). "The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center." *Cell* **126**(1): 79-92.

- Pontes, O., A. Vitins, T. S. Ream, et al. (2013). "Intersection of small RNA pathways in *Arabidopsis thaliana* sub-nuclear domains." PLoS One **8**(6): e65652.
- Popova, B., M. Kuhlmann, A. Hinas, et al. (2006). "Helf, a putative RNA helicase acts as a nuclear suppressor of RNAi but not antisense mediated gene silencing." Nucleic Acids Res **34**(3): 773-784.
- Poulter, R. T. and M. I. Butler (2015). "Tyrosine Recombinase Retrotransposons and Transposons." Microbiol Spectr **3**(2): MDNA3-0036-2014.
- Poulter, R. T. and T. J. Goodwin (2005). "DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons." Cytogenet Genome Res **110**(1-4): 575-588.
- Punta, M., P. C. Coghill, R. Y. Eberhardt, et al. (2012). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D290-301.
- Qin, H., F. Chen, X. Huan, et al. (2010). "Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction." RNA **16**(3): 474-481.
- Ramos, A., S. Grunert, J. Adams, et al. (2000). "RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain." EMBO J **19**(5): 997-1009.
- Rand, T. A., K. Ginalski, N. V. Grishin and X. Wang (2004). "Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14385-14389.
- Rand, T. A., S. Petersen, F. Du and X. Wang (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." Cell **123**(4): 621-629.
- Rehwinkel, J., I. Behm-Ansmant, D. Gatfield and E. Izaurralde (2005). "A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing." RNA **11**(11): 1640-1647.
- Rehwinkel, J., P. Natalin, A. Stark, et al. (2006). "Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Droscha and Argonaute proteins in *Drosophila melanogaster*." Mol Cell Biol **26**(8): 2965-2975.
- Reinhart, B. J. and D. P. Bartel (2002). "Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats." Science **297**(5588): 1831.
- Reinhart, B. J., E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, et al. (2002). "MicroRNAs in plants." Genes Dev **16**(13): 1616-1626.
- Ren, G., M. Xie, Y. Dou, et al. (2012). "Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(31): 12817-12821.
- Renart, J., J. Reiser and G. R. Stark (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(7): 3116-3120.
- Rhoades, M. W., B. J. Reinhart, L. P. Lim, et al. (2002). "Prediction of plant microRNA targets." Cell **110**(4): 513-520.
- Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey and C. Dingwall (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." Cell **64**(3): 615-623.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst and A. Bradley (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res **14**(10A): 1902-1910.
- Rot, G., A. Parikh, T. Curk, et al. (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, et al. (2008). "A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins." Mol Cell Proteomics **7**(2): 282-289.

- Ruby, J. G., C. Jan, C. Player, et al. (2006). "Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*." Cell **127**(6): 1193-1207.
- Ryter, J. M. and S. C. Schultz (1998). "Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA." EMBO J **17**(24): 7505-7513.
- Sakuragi, S., T. Goto, K. Sano and Y. Morikawa (2002). "HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7956-7961.
- Schauer, S. E., S. E. Jacobsen, D. W. Meinke and A. Ray (2002). "DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development." Trends Plant Sci **7**(11): 487-491.
- Schirle, N. T. and I. J. MacRae (2012). "The crystal structure of human Argonaute2." Science **336**(6084): 1037-1040.
- Schleicher, M., G. Gerisch and G. Isenberg (1984). "New actin-binding proteins from *Dictyostelium discoideum*." EMBO J **3**(9): 2095-2100.
- Schmith, A., T. Spaller, F. Gaube, et al. (2015). "A host factor supports retrotransposition of the TRE5-A population in *Dictyostelium* cells by suppressing an Argonaute protein." Mob DNA **6**: 14.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork and C. P. Ponting (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5857-5864.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Scott, M. S., P. V. Troshin and G. J. Barton (2011). "NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins." BMC Bioinformatics **12**: 317.
- Sen, G. L. and H. M. Blau (2005). "Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies." Nat Cell Biol **7**(6): 633-636.
- Shi, Z., T. A. Montgomery, Y. Qi and G. Ruvkun (2013). "High-throughput sequencing reveals extraordinary fluidity of miRNA, piRNA, and siRNA pathways in nematodes." Genome Res **23**(3): 497-508.
- Shiohama, A., T. Sasaki, S. Noda, et al. (2007). "Nucleolar localization of DGCR8 and identification of eleven DGCR8-associated proteins." Exp Cell Res **313**(20): 4196-4207.
- Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, et al. (2001). "On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing." Cell **107**(4): 465-476.
- Sijen, T., F. A. Steiner, K. L. Thijssen and R. H. Plasterk (2007). "Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class." Science **315**(5809): 244-247.
- Singleton, C. K., R. L. Delude and C. E. McPherson (1987). "Characterization of genes which are deactivated upon the onset of development in *Dictyostelium discoideum*." Dev Biol **119**(2): 433-441.
- Sohn, S. Y., W. J. Bae, J. J. Kim, et al. (2007). "Crystal structure of human DGCR8 core." Nat Struct Mol Biol **14**(9): 847-853.
- Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon and L. Joshua-Tor (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." Science **305**(5689): 1434-1437.
- Song, L., M. H. Han, J. Lesicka and N. Fedoroff (2007). "*Arabidopsis* primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5437-5442.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-517.
- Stefl, R., F. C. Oberstrass, J. L. Hood, et al. (2010). "The solution structure of the ADAR2 dsRBM-RNA complex reveals a sequence-specific readout of the minor groove." Cell **143**(2): 225-237.

- Szarzynska, B., L. Sobkowiak, B. D. Pant, et al. (2009). "Gene structures and processing of *Arabidopsis thaliana* HYL1-dependent pri-miRNAs." Nucleic Acids Res **37**(9): 3083-3093.
- Tabara, H., M. Sarkissian, W. G. Kelly, et al. (1999). "The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." Cell **99**(2): 123-132.
- Tabara, H., E. Yigit, H. Siomi and C. C. Mello (2002). "The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*." Cell **109**(7): 861-871.
- Taliaferro, J. M., J. L. Aspden, T. Bradley, et al. (2013). "Two new and distinct roles for *Drosophila* Argonaute-2 in the nucleus: alternative pre-mRNA splicing and transcriptional repression." Genes Dev **27**(4): 378-389.
- Tanzer, A. and P. F. Stadler (2004). "Molecular evolution of a microRNA cluster." J Mol Biol **339**(2): 327-335.
- Thorvaldsdottir, H., J. T. Robinson and J. P. Mesirov (2013). "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration." Brief Bioinform **14**(2): 178-192.
- Till, S., E. Lejeune, R. Thermann, et al. (2007). "A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain." Nat Struct Mol Biol **14**(10): 897-903.
- Tomari, Y., C. Matranga, B. Haley, et al. (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." Science **306**(5700): 1377-1380.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Troll, H., D. Malchow, A. Muller-Taubenberger, et al. (1992). "Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*." J Biol Chem **267**(29): 21072-21079.
- Vagin, V. V., A. Sigova, C. Li, et al. (2006). "A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline." Science **313**(5785): 320-324.
- Vaistij, F. E., L. Jones and D. C. Baulcombe (2002). "Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase." Plant Cell **14**(4): 857-867.
- Vazquez, F., V. Gascioli, P. Crete and 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): 346-351.
- Veltman, D. M., G. Akar, L. Bosgraaf and P. J. Van Haastert (2009). "A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*." Plasmid **61**(2): 110-118.
- Verdel, A., S. Jia, S. Gerber, et al. (2004). "RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex." Science **303**(5658): 672-676.
- Voinnet, O. (2009). "Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs." Cell **136**(4): 669-687.
- Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, et al. (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." Science **297**(5588): 1833-1837.
- Voytas, D. and J. Boeke (2002). Ty1 and Ty5 of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Mobile DNA II*. Washington, D.C., ASM Press: 631-662.
- Wallraff, E., M. Schleicher, M. Modersitzki, et al. (1986). "Selection of *Dictyostelium* mutants defective in cytoskeletal proteins: use of an antibody that binds to the ends of alpha-actinin rods." EMBO J **5**(1): 61-67.

- Wang, X. H., R. Aliyari, W. X. Li, et al. (2006). "RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*." *Science* **312**(5772): 452-454.
- Wassenegger, M. and G. Krczal (2006). "Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases." *Trends Plant Sci* **11**(3): 142-151.
- Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, et al. (2008). "Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes." *Nature* **453**(7194): 539-543.
- Watts, D. J. and J. M. Ashworth (1970). "Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture." *Biochem J* **119**(2): 171-174.
- Wiegand, S., J. Kruse, S. Gronemann and C. Hammann (2011). "Efficient generation of gene knockout plasmids for *Dictyostelium discoideum* using one-step cloning." *Genomics* **97**(5): 321-325.
- Wiegand, S., D. Meier, C. Seehafer, et al. (2014). "The *Dictyostelium discoideum* RNA-dependent RNA polymerase RrpC silences the centromeric retrotransposon DIRS-1 post-transcriptionally and is required for the spreading of RNA silencing signals." *Nucleic Acids Res* **42**(5): 3330-3345.
- Wienke, D., A. Drengk, C. Schmauch, et al. (2006). "Vacuolin, a flotillin/reggie-related protein from *Dictyostelium* oligomerizes for endosome association." *Eur J Cell Biol* **85**(9-10): 991-1000.
- Windhof, I. M., M. J. Dubin and W. Nellen (2013). "Chromatin organisation of transgenes in *Dictyostelium*." *Pharmazie* **68**(7): 595-600.
- Wu, X., Y. Shi, J. Li, et al. (2013). "A role for the RNA-binding protein MOS2 in microRNA maturation in *Arabidopsis*." *Cell Res* **23**(5): 645-657.
- Xie, Z., E. Allen, N. Fahlgren, et al. (2005). "Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes." *Plant Physiol* **138**(4): 2145-2154.
- Xie, Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, et al. (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." *PLoS Biol* **2**(5): E104.
- Yang, L., Z. Liu, F. Lu, et al. (2006). "SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*." *Plant J* **47**(6): 841-850.
- Yang, N. and 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): 763-771.
- Yang, S. W., H. Y. Chen, J. Yang, et al. (2010). "Structure of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing." *Structure* **18**(5): 594-605.
- Yang, Z., Y. W. Ebright, B. Yu and 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): 667-675.
- Ye, R., W. Wang, T. Iki, et al. (2012). "Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* Argonaute4/siRNA complexes." *Mol Cell* **46**(6): 859-870.
- Yeom, K. H., Y. Lee, J. Han, et al. (2006). "Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing." *Nucleic Acids Res* **34**(16): 4622-4629.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* **17**(24): 3011-3016.
- Yigit, E., P. J. Batista, Y. Bei, et al. (2006). "Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi." *Cell* **127**(4): 747-757.
- Yu, B., L. Bi, B. Zheng, et al. (2008). "The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10073-10078.
- Yu, B., Z. Yang, J. Li, et al. (2005). "Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis." *Science* **307**(5711): 932-935.

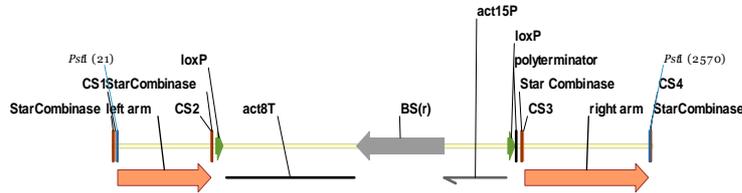
- Zekri, L., E. Huntzinger, S. Heimstadt and E. Izaurralde (2009). "The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release." Mol Cell Biol **29**(23): 6220-6231.
- Zeng, Y., R. Yi and B. R. Cullen (2005). "Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha." EMBO J **24**(1): 138-148.
- Zenk, F. (2014). Funktionelle Charakterisierung von dsRB-Domänen im miRNA-Signalweg von Dictyostelium discoideum. M.Sc., Universität Kassel.
- Zhang, H., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, et al. (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell **118**(1): 57-68.
- Zhang, K., K. Mosch, W. Fischle and S. I. Grewal (2008). "Roles of the Clr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin." Nat Struct Mol Biol **15**(4): 381-388.
- Zhang, X. and Y. Zeng (2010). "The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer." Nucleic Acids Res **38**(21): 7689-7697.
- Zheng, X., J. Zhu, A. Kapoor and J. K. Zhu (2007). "Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing." EMBO J **26**(6): 1691-1701.
- Zilberman, D., X. Cao and S. E. Jacobsen (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." Science **299**(5607): 716-719.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-3415.

Anhang

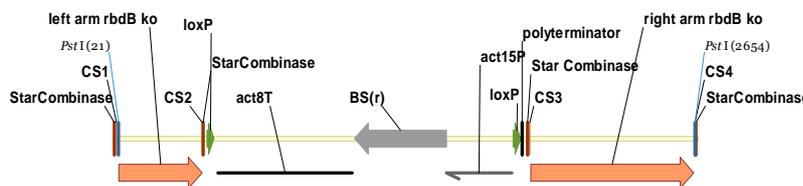
A1: Vektorkarten

Knockout-Plasmide

pKOSG *rbdA* (2585 bp)

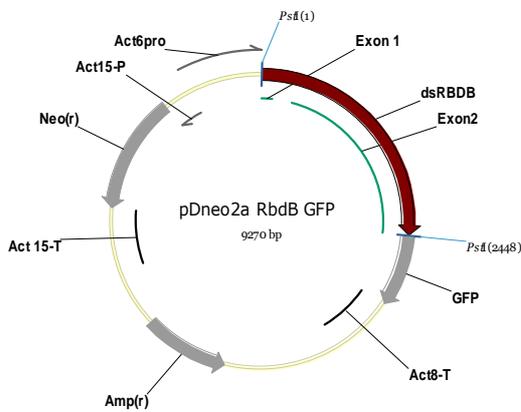


pKOSG *rbdB* (2669 bp)

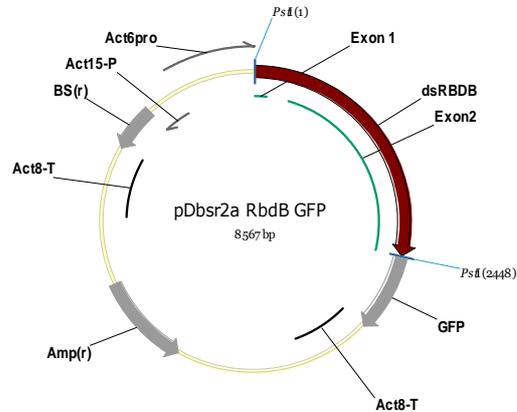


RbdB-Überexpressionsplasmide

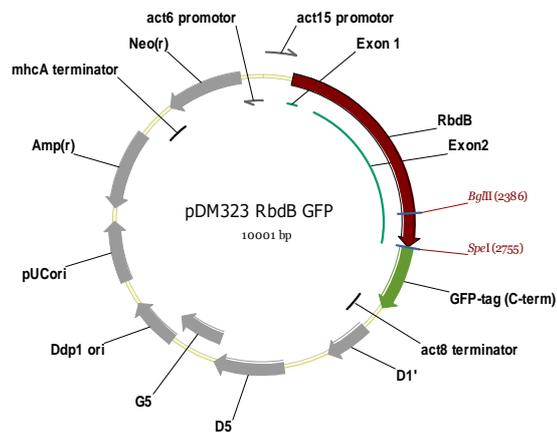
pDneo2a RbdB GFP



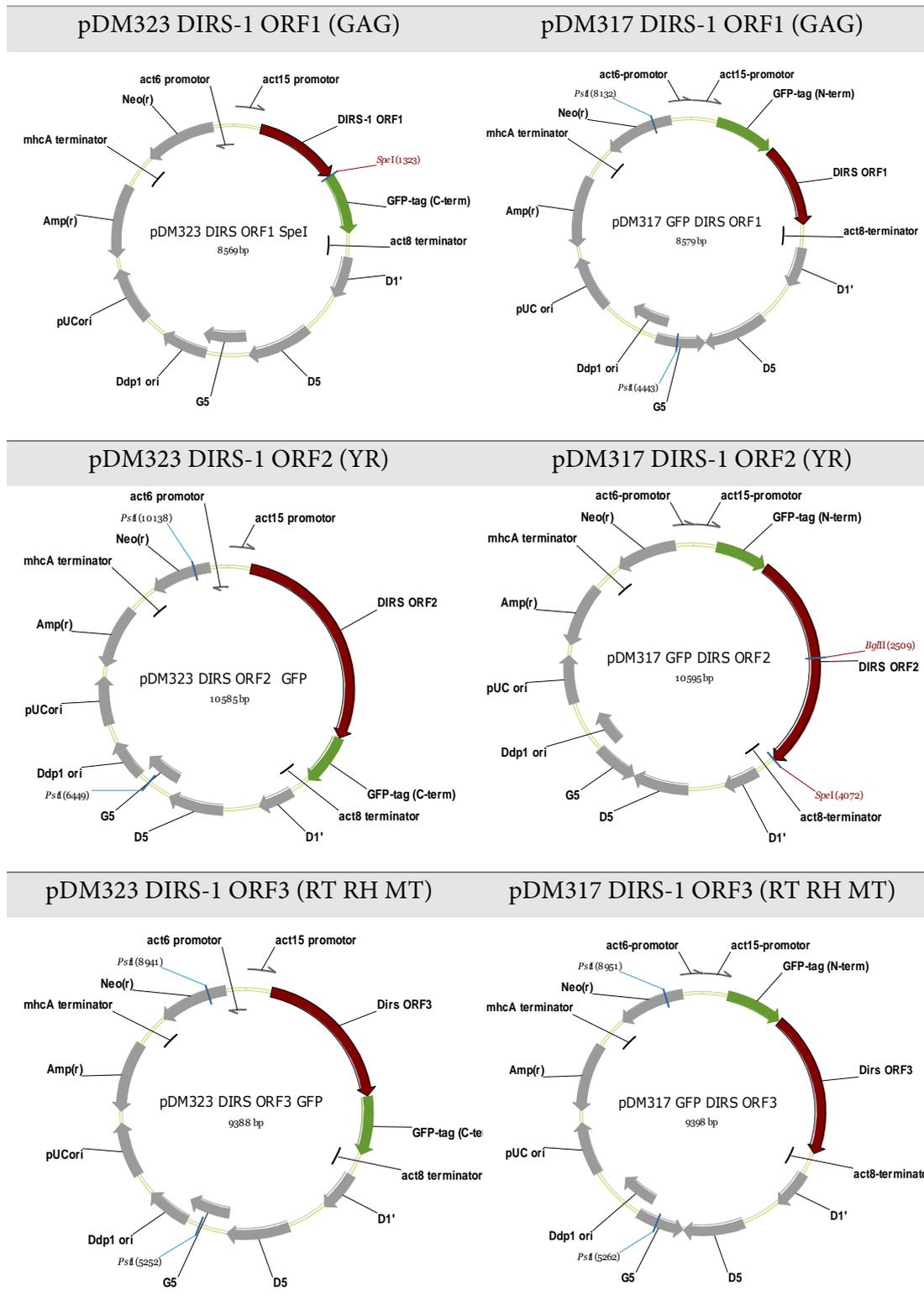
pDbsr2a RbdB GFP



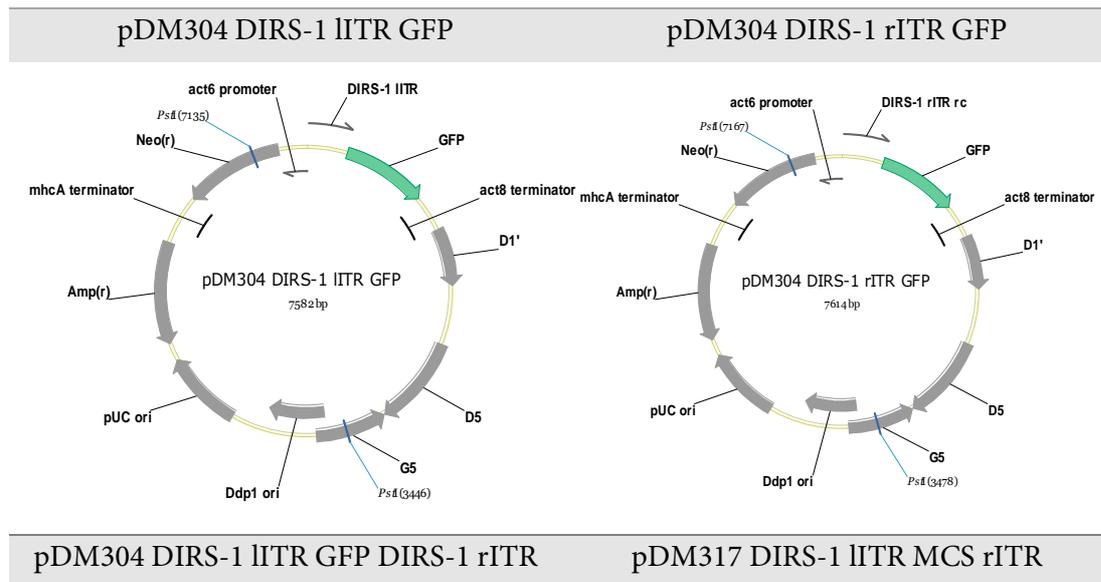
pDM323 RbdB GFP



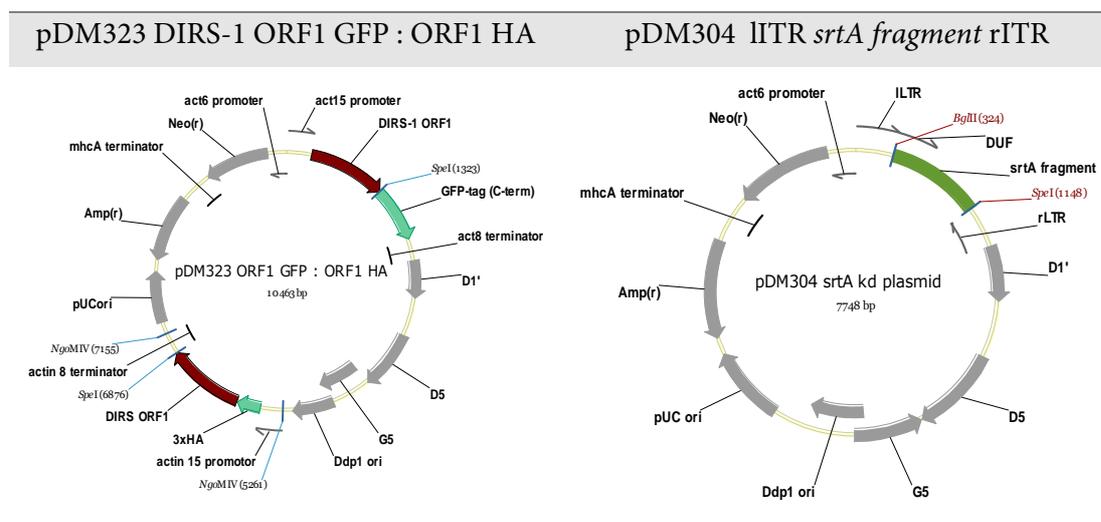
DIRS-1 basierte Plasmide Expressionsplasmide



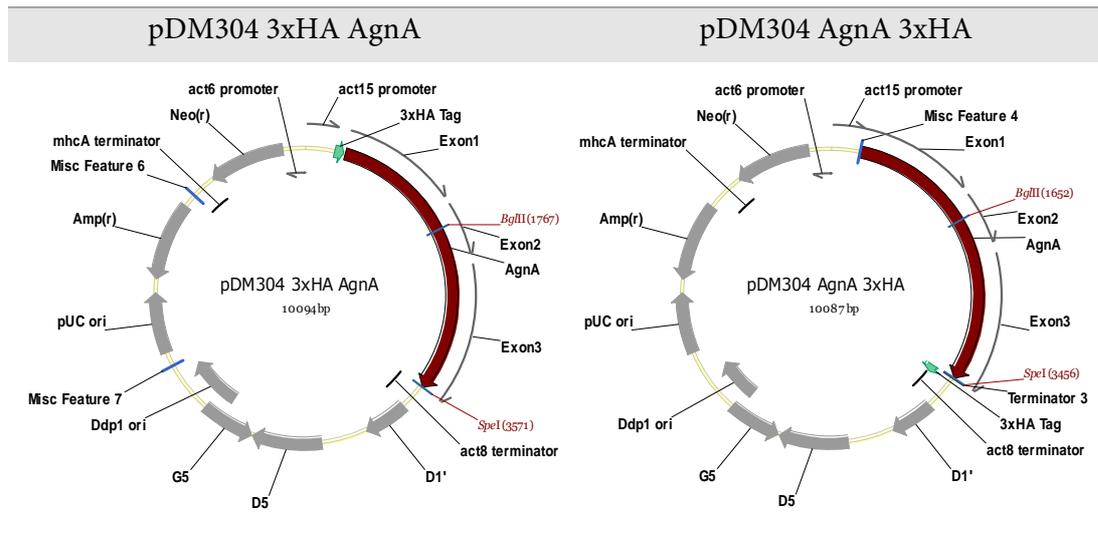
DIRS-1 basierte Reporterkonstrukte und DIRS-1 basierter *Knockdown*-Vektor



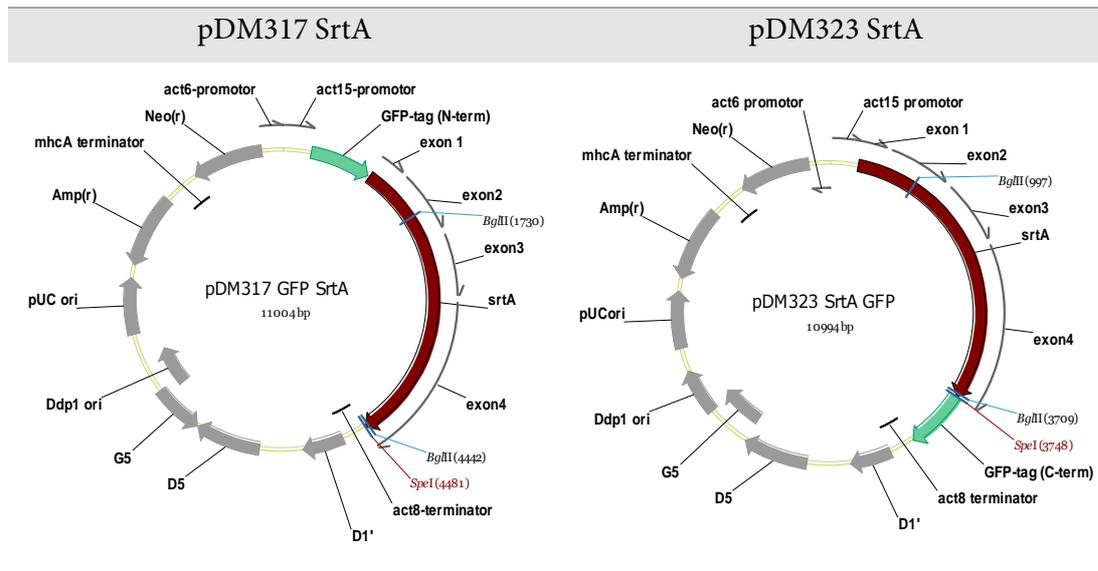
DIRS-1 ORF1 Co-IP Vektor und *SrtA* *Knockdown*-Plasmid



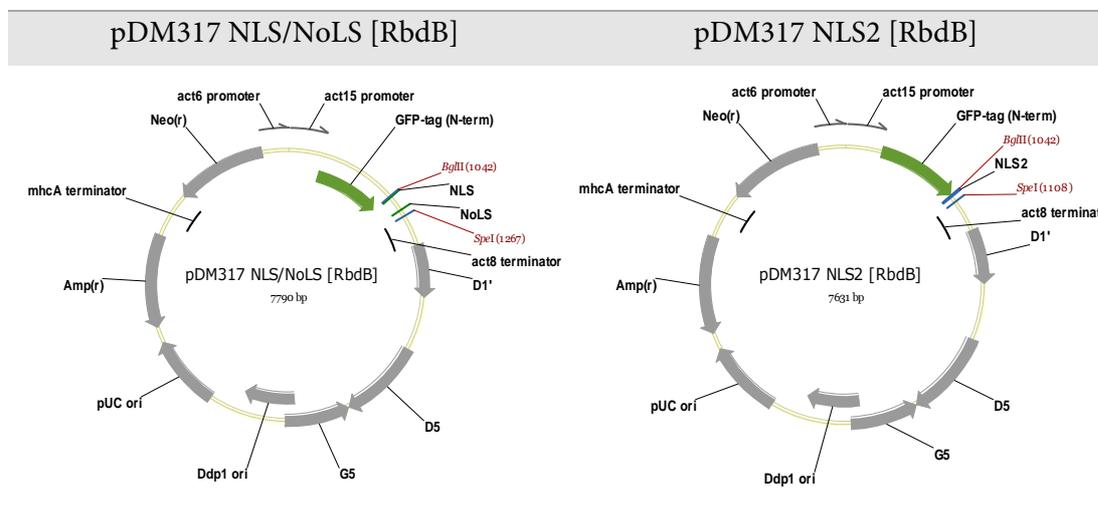
AgnA Überexpressionsplasmide

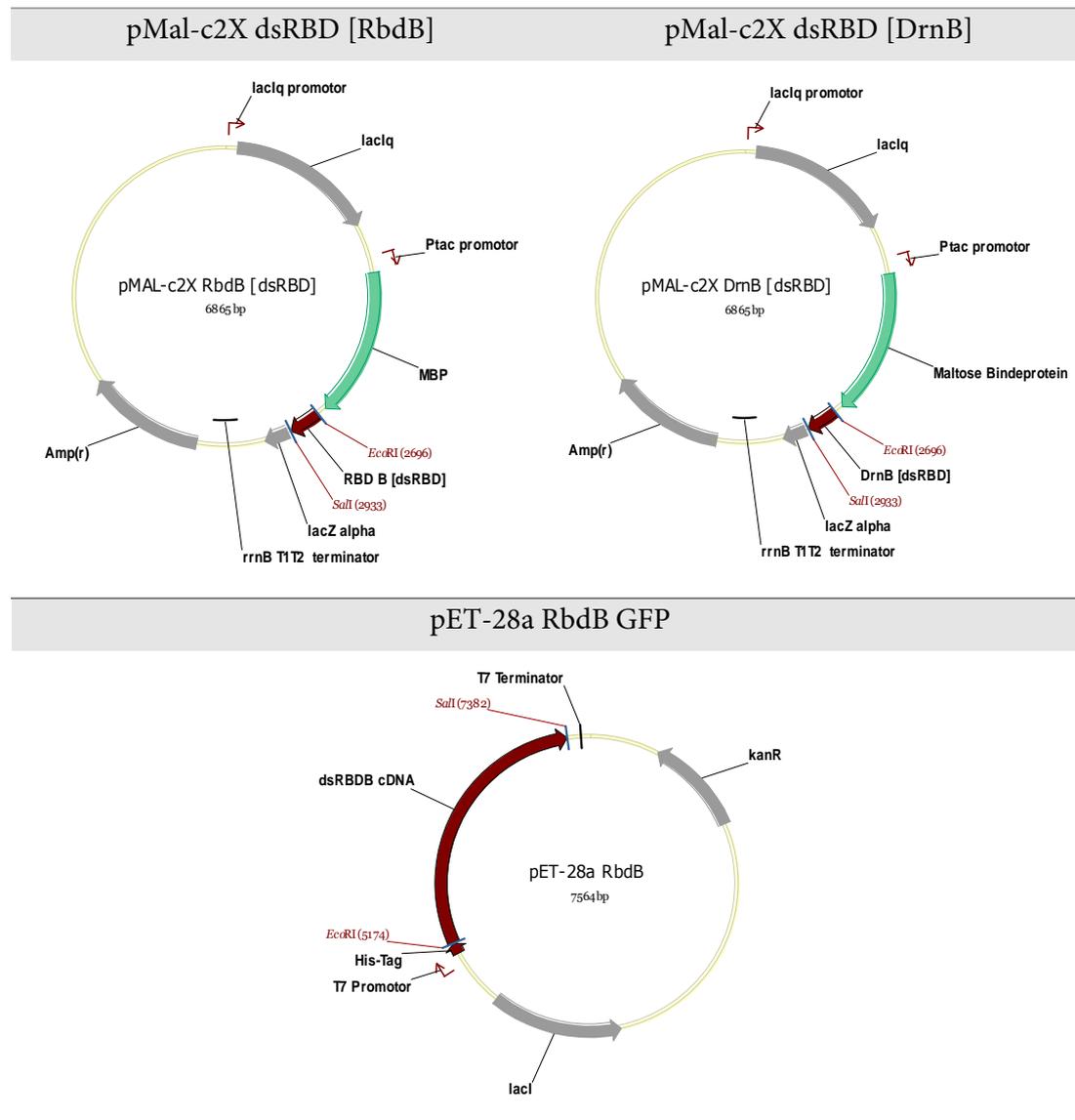


SrtA Überexpressionsplasmide

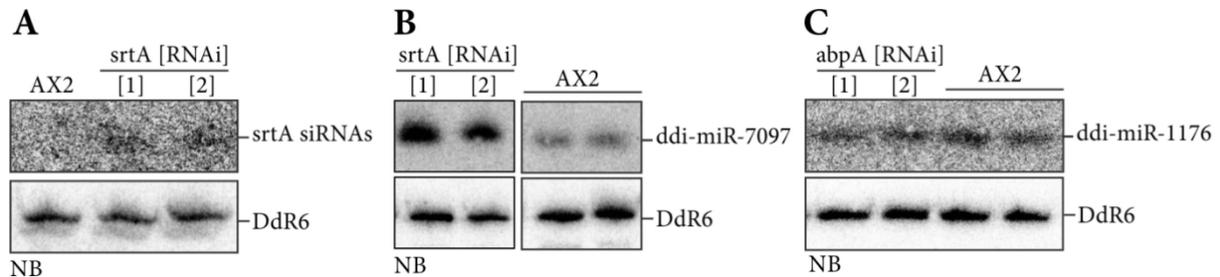


RbdB NLS und NoLS Reporterkonstrukte



Expressionsvektoren zur Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*

A2: Verifizierung/Charakterisierung der *srtA* [RNAi] Stämme



A: Die Produktion *srtA* spezifischer siRNAs wurde in den unabhängigen *srtA* [RNAi] Stämmen durch Northern Blot Analysen kontrolliert. Als Negativkontrolle diente Gesamt-RNA aus dem AX2 wt. Der Nachweis der *Trigger*-siRNAs erfolgt mit Hilfe der ^{32}P markierten Oligonukleotide DM201 und DM202. Als Ladekontrolle wurde die snoRNA DdR6 mit Hilfe des ^{32}P markierten Oligonukleotids #2654 detektiert.

B: Die Expression von *ddi-miR-7097* wurde in *srtA* [RNAi] Stämmen und im AX2 wt mittels Northern Blot untersucht. *Ddi-miR-7097* wurde mit dem ^{32}P markierten Oligonukleotid DM217 nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von DdR6. Genau wie *ddi-miR-1176* ist auch *ddi-miR-7097* im Hintergrund der *Knockdown*-Stämme angereichert.

C: Als weitere Kontrolle wurde die Expression von *ddi-miR-1176* in zwei unabhängigen *abpA* [RNAi] Stämmen untersucht. Diese wurden ebenfalls unter Verwendung des DIRS-1 basierten *Knockdown*-Vektors generiert. Der Nachweis von *ddi-miR-1176* erfolgte mit dem ^{32}P markierten Oligonukleotid #2601. Als Ladekontrolle diente erneut die snoRNA DdR6. *AbpA* [RNAi] Stämme zeigen keinen erhöhten miRNA-Level. Die deutliche Akkumulierung von *ddi-miR-1176* in *srtA* [RNAi] Stämmen ist somit nicht auf die Präsenz des *Knockdown*-Vektors zurückzuführen.

A3: Ergänzende Informationen zu den neu identifizierten miRNAs

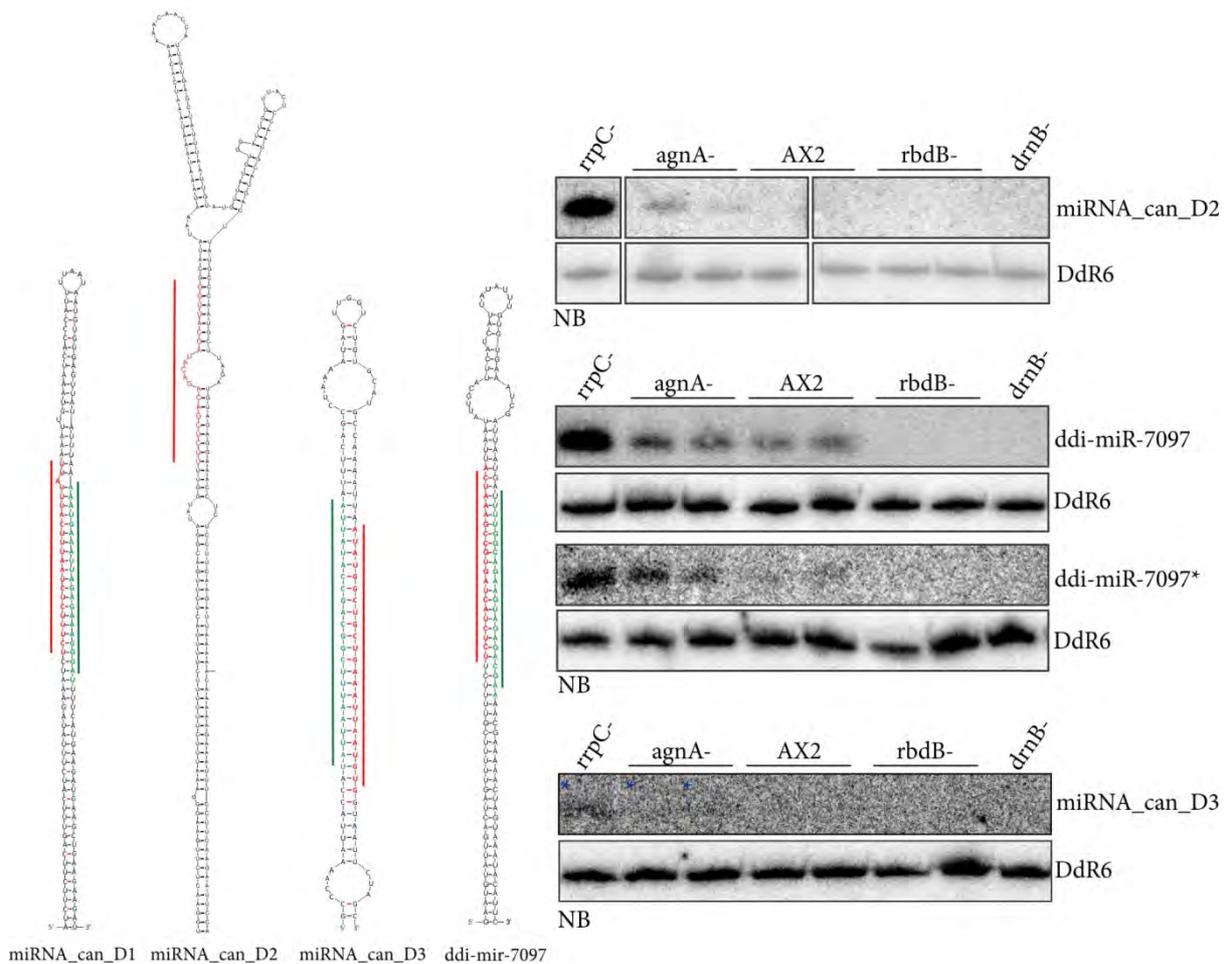
A

In der Tabelle sind alle Positionen der neu identifizierten miRNAs im Genom angegeben. Einige werden von mehreren Loci kodiert. Die angegebenen Koordinaten können um einige Nukleotide abweichen. Der Verweis auf *plus* oder auf *minus* bezieht sich auf den entsprechenden Strang. Nd = nicht detektierbar (in den RNA-Sequenzierungsdaten).

miRNA	Chromosom	Position	Strang
*miRNA			
kanonische miRNAs			
miRNA_can_D1	4	1706374..1706395	plus
miRNA_can_D1*	4	1706440..1706461	plus
miRNA_can_D2	5	4871887..4871908	plus
miRNA_can_D2*	nd	-	-
ddi-mir-7097	3	3739275..3739295	minus
ddi-mir-7097*	3	3739208..3739228	minus
miRNA_can_D3	5	4796459..4796481	minus
miRNA_can_D3*	5	4796524..4796544	minus
miRNA_can_D3	5	425213..425235	plus
miRNA_can_D3*	5	425150..425170	plus
miRNA_can_D3	3	4529863..4529841	minus
miRNA_can_D3*	3	4529926..4529906	minus
miRNA_can_D3	2	1631003..1630981	minus
miRNA_can_D3*	2	1631066..1631046	minus
miRNA_can_D3	2	2783137..2783116	minus
miRNA_can_D3*	2	2783200..2783180	minus
miRNA_can_D3	2	3248649..3248671	plus
miRNA_can_D3*	2	3248586..3248606	plus
nicht-kanonische miRNA			
miRNA_non_can_D4	6	3669..3690	plus
miRNA_non_can_D4*	nd	-	-
miRNA_non_can_D4	4	3223..3244	plus
miRNA_non_can_D4*	nd	-	-
miRNA_non_can_D4	3	10372..10351	minus
miRNA_non_can_D4*	nd	-	-
miRNA_non_can_D4	2	3773252..3773232	minus
miRNA_non_can_D4*	nd	-	-

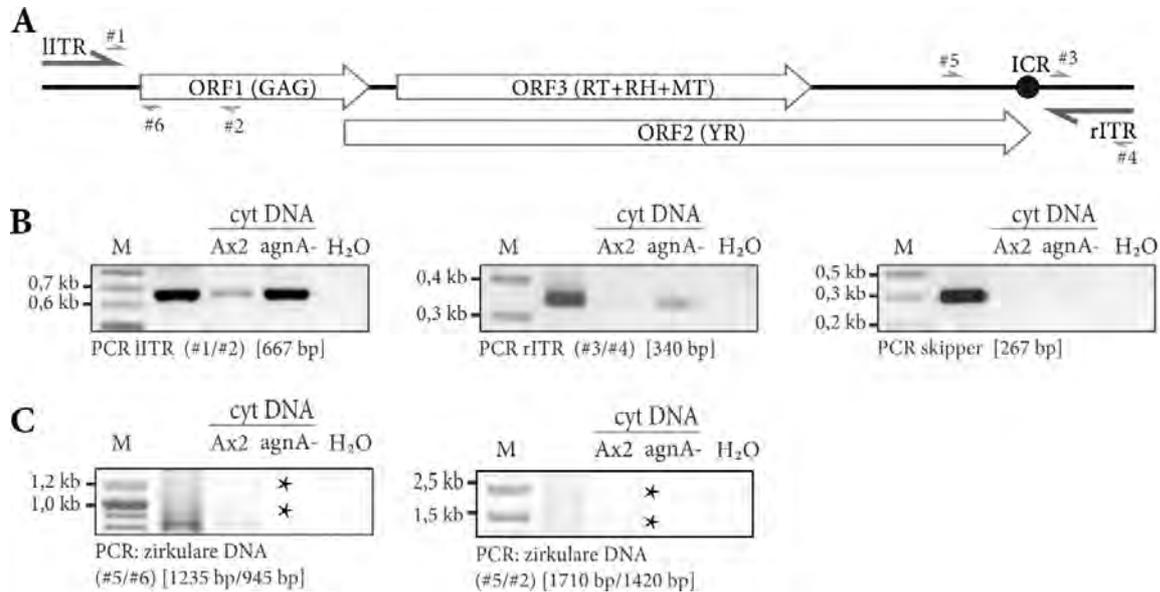
In der Tabelle sind alle Positionen der neu identifizierten miRNAs im Genom angegeben. Einige werden von mehreren Loci kodiert. Die angegebenen Koordinaten können um einige Nukleotide abweichen. Der Verweis auf *plus* oder auf *minus* bezieht sich auf den entsprechenden Strang. Nd = nicht detektierbar (in den RNA-Sequenzierungsdaten).

B



Links: Haarnadelstrukturen verschiedener neu identifizierter (kanonischer) sowie von *ddi-miR-7097* (Avesson et al. 2012). Rot: miRNA, grün: miRNA*. Die miRNA* wurde nur markiert, wenn sie durch *Read-Counts* in der Hochdurchsatzsequenzierung abgedeckt war. Das trifft zum Beispiel auf die zuvor identifizierte miRNA *ddi-miR-7097* zu. Für *miRNA_can_D3* ist exemplarisch die Faltung für den Lokus auf Chromosom 5, Koordinaten 4796459..4796481 gezeigt. **Rechts:** Northern Blot Analysen der neu identifizierten miRNA-Kandidaten. Dazu wurde Gesamt-RNA aus dem *AX2* wt und den angegebenen Mutanten verwendet. Die miRNAs wurden mit spezifischen ^{32}P markierten Oligonukleotiden nachgewiesen.

A4: Charakterisierung der extrachromosomalen DIRS-1 DNA



A: Schematische Darstellung eines vollständigen DIRS-1 Elementes mit Bindepositionen der für die PCR-Analysen verwendeten Primer #1 bis #6: #1 = DM173, #2 = BB143, #3 = #869, #4 = DM135, #5 = MD83, #6 = BB141. **B:** Als Template für die PCR-Analysen der extrachromosomalen DIRS-1 DNA diente DNA aus dem Cytoplasma von *agnA*⁻ Stämmen und dem AX2 wt. Als Kontrolle wurden die PCR-Reaktionen mit genomischer DNA als *Template* durchgeführt. Die erwarteten Fragmentlängen und die verwendeten Primer sind jeweils unter der Abbildung angegeben. *Links:* PCR zum Nachweis von Sequenzen aus der IITR. Es stellte sich heraus, dass sie zum überwiegenden Teil fehlte. *Mitte:* Unter Verwendung der Primer #3 und #4 konnte die gesamte rITR amplifiziert werden. *Rechts:* Eine PCR auf das *skipper* LTR-Retrotransposon wies auf geringe Mengen an kontaminierender gDNA in den cytoplasmatischen Fraktionen hin. **C:** PCR-Analysen zum Nachweis zirkulärer DIRS-1 DNA Intermediate im *agnA*⁻ Stamm. Die Zahlen (und * im Gelbild) geben die Größe der erwarteten Produkte (mit bzw. ohne linke ITR) an. Jedoch konnte mit keinem Primer-Set ein entsprechendes PCR-Produkt generiert werden.

9 Liste der wissenschaftlichen Publikationen

- Friedrich, M., D. Meier, I. Schuster and W. Nellen (2015). "A Simple Retroelement Based Knock-Down System in Dictyostelium: Further Insights into RNA Interference Mechanisms." PLoS One 10(6): e0131271. (joint first authors)
- Boesler, B., D. Meier, K. U. Foerstner, M. Friedrich, C. Hammann, C. M. Sharma and W. Nellen (2014). "Argonaute proteins affect siRNA levels and accumulation of a novel extrachromosomal DNA from the Dictyostelium retrotransposon DIRS-1." J Biol Chem. (joint first authors)
- Wiegand, S., D. Meier, C. Seehafer, M. Malicki, P. Hofmann, A. Schmith, T. Winckler, B. Foldesi, B. Boesler, W. Nellen, J. Reimegard, M. Kaller, J. Hallman, O. Emanuelsson, L. Avesson, F. Soderbom and C. Hammann (2014). "The Dictyostelium discoideum RNA-dependent RNA polymerase RrpC silences the centromeric retrotransposon DIRS-1 post-transcriptionally and is required for the spreading of RNA silencing signals." Nucleic Acids Res 42(5): 3330-3345.

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2011 bis September 2015 in der Abteilung Genetik (Universität Kassel) unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Nellen angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die gute Betreuung und die konstruktiven Diskussionen bedanken; er hat mich während meiner Promotion gefördert, gefordert und mich dazu ermutigt, eigenen Fragestellungen nachzugehen.

Mein Dank geht weiterhin an Prof. Dr. Raffael Schaffrath, der sich dazu bereit erklärt hat, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu erstellen. Prof. Dr. Christian Hammann und Prof. Dr. Mireille Schäfer danke ich für die Bereitschaft, Mitglied in meiner Prüfungskommission zu sein.

Bei Dr. Cynthia Sharma und Dr. Konrad Förstner (IMIB, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) möchte ich mich für die Durchführung der RNA-Illumina-Sequenzierung und die Unterstützung bei der Datenauswertung bedanken.

An dieser Stelle soll die kooperative Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Ribogenetics (Jacobs Universität Bremen) unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Hammann erwähnt werden. Insbesondere danke ich Marek Malicki und Dr. Janis Kruse für die Bereitstellung von *D. discoideum* Stämmen sowie Plasmiden, für die Diskussion unveröffentlichter Daten und die wertvollen Anregungen, was Fragestellungen und Experimente betrifft.

Für die Anleitung und Durchführung elektronenmikroskopischer Untersuchungen möchte ich mich weiterhin bei Dr. Katja Richert-Pöggeler (Julius-Kühn-Institut, Braunschweig) bedanken. Ich habe während der Aufenthalte in ihrem Labor viel gelernt und hoffe, dass die Zusammenarbeit auch in Zukunft fortgesetzt werden kann.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Genetik bedanken, die in den vergangenen Jahren zu einer harmonischen und hilfsbereiten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Das gilt insbesondere für die kooperative Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Boesler und Michael Friedrich, die ebenfalls an RNA vermittelten Signalwegen zur Genregulation in *D. discoideum* geforscht haben. Ohne euch hätte die Arbeit im Labor nicht annähernd so viel Spaß gemacht. Ein herzlicher Dank geht an Sonja Kasten, Sonja Fuhrmann, Birgit Simon und Monika Winneknecht, die für einen reibungslosen Ablauf des Laboralltags gesorgt haben. Birgit Jäger kümmert sich immer schnell und zuverlässig um bürokratische Hürden und verliert dabei nie ihre gute Laune.

Ich habe mich sehr darüber gefreut, dass Jann Buttlar, Alexander Bruch, Pia Theißen, Fides Zenk und Niklas Wollenhaupt im Rahmen ihrer Bachelor-, Master- oder Diplomarbeiten ebenfalls an kleinen regulatorischen RNAs in *D. discoideum* gearbeitet haben. Ihr habt durch euren Einsatz und eure Ideen das Projekt tatkräftig unterstützt und mich immer wieder neu motiviert.

Der Abteilung Zellbiologie unter der Leitung von Prof. Maniak danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern, Plasmiden und Reagenzien sowie für die Hilfe beim Mikroskopieren. Gleiches gilt für die Mitarbeiter der Entwicklungsbiologie, der Tierphysiologie und der Biochemie, deren Laborequipment jederzeit genutzt werden durfte.

Das größte Dankeschön gilt jedoch meinen Freunden, lieben Kollegen und meiner Familie, die immer ein offenes Ohr hatten.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter 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. Dritte waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Dissertation nicht beteiligt; insbesondere habe ich hierfür nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den 8. November 2015