



---

seit 1558

---

Friedrich-Schiller-Universität Jena

---

**Untersuchungen zur Retrotransposition  
der mobilen Elemente TRE5-A und  
DGLT-A aus *Dictyostelium discoideum***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Jana Schiefner  
geboren am 03.11.1980 in Meiningen

Februar 2014



- 1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Winckler (Friedrich-Schiller-Universität, Jena)**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Günter Theißen (Friedrich-Schiller-Universität, Jena)**
- 3. Gutachter: Prof. Dr. Theodor Dingermann (Goethe-Universität, Frankfurt am Main)**

**Disputation am: 05. Dezember 2014**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die „soziale Amöbe“ <i>Dictyostelium discoideum</i>	1
1.1.1.	Die Ökologie der <i>Dictyostelia</i>	1
1.1.2.	Die <i>Dictyostelia</i> und ihre phylogenetische Stellung	2
1.1.3.	Die multizelluläre Entwicklung von <i>D. discoideum</i>	4
1.1.4.	Entwicklung der Laborstämme von <i>D. discoideum</i>	6
1.1.5.	Das Genom von <i>D. discoideum</i>	6
1.2.	Der RNA-Polymerase III-Komplex	7
1.2.1.	TFIIIB	8
1.2.2.	TFIIIC	9
1.2.3.	tRNA-Gene in <i>D. discoideum</i>	10
1.3.	Transposable Elemente	10
1.3.1.	DNA-Transposons	12
1.3.2.	Retrotransposons	13
1.3.2.1.	Non-LTR-Retrotransposons	14
1.3.2.2.	LTR-Retrotransposons	16
1.3.2.3.	Insertionspräferenzen von transposablen Elementen	20
1.4.	Transposons in <i>D. discoideum</i>	21
1.4.1.	DNA-Transposons in <i>D. discoideum</i>	22
1.4.2.	LTR-Retrotransposons in <i>D. discoideum</i>	23
1.4.2.1.	<i>Skipper</i>	23
1.4.2.2.	DGLT-P	23
1.4.2.3.	DGLT-A	23
1.4.3.	Das Tyrosin-Rekombinase Retrotransposon DIRS-1 in <i>D. discoideum</i>	24
1.4.4.	Non-LTR-Retrotransposons in <i>D. discoideum</i>	26
1.4.4.1.	TRE5-A	27
1.4.4.2.	TRE5-B und TRE5-C	28
1.4.4.3.	TRE3-Gruppe	29
1.5.	Der C-Modul bindende Faktor A aus <i>D. discoideum</i>	29
1.6.	Retrotranspositions-Testsysteme in <i>D. discoideum</i>	33
1.7.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	35

<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
2.1.	Materialien	37
2.1.1.	Laborgeräte	37
2.1.2.	Chemikalien	38
2.1.3.	Verbrauchsmaterialien	39
2.1.4.	Kits	40
2.1.5.	Enzyme	40
2.1.6.	Größenstandards	41
2.1.7.	Medien, Antibiotika und Additiva	41
2.1.8.	Antikörper	42
2.1.9.	Mikroorganismen	43
2.1.10.	Plasmide und Oligonukleotide	44
2.1.11.	Programme	44
2.2.	Methoden	44
2.2.1.	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	44
2.2.2.	CaCl <sub>2</sub> -Transformation von <i>D. discoideum</i>	45
2.2.3.	Gefrierkultur von <i>D. discoideum</i> Zellen in DMSO	46
2.2.4.	Gefrierkultur von <i>D. discoideum</i> Sporen in Glycerin	47
2.2.5.	Herstellung von <i>D. discoideum</i> Zellpellets	47
2.2.6.	Isolierung von genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i>	48
2.2.7.	Isolation von RNA und Synthese von cDNA aus <i>D. discoideum</i>	49
2.2.8.	<i>D. discoideum</i> Retrotranspositions-Testsystem genetisch markierter Retrotransposons	50
2.2.9.	Oligonukleotid-gerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese	51
2.2.10.	Protein-Protein-Interaktionsexperiment ( <i>Pulldown</i> )	54
2.2.10.1.	Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i>	54
2.2.10.2.	<i>Pulldown</i>	55
2.2.11.	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	56
2.2.12.	<i>Western Blot</i>	57
2.2.13.	Polymerase-Ketten-Reaktion	58
2.2.14.	<i>Real-Time</i> -PCR	58
2.2.15.	Hefe-Zweihybrid-System	59
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1.	Untersuchungen zur Retrotransposition des Retrotransposons TRE5-A in <i>D. discoideum</i>	63
3.1.1.	Untersuchungen zum Einfluss der C-Modul-Struktur von TRE5-A auf die Retrotransposition	65
3.1.2.	Untersuchungen zur CbfA-abhängigen Retrotransposition von TRE5-A	69
3.1.2.1.	Etablierung eines mit einer Hygromycin-Resistenz markierten TRE5-A-Retrotransposons	71

3.1.2.2. Die TRE5-A <sup>HYG</sup> -Retrotransposition im Stamm JH.D ist nicht durch CbfA komplementierbar	78
3.1.3. Untersuchung der Bedeutung der Protein-Interaktion des ORF1-Proteins von TRE5-A mit dem TBP-Protein von TFIIB für die Retrotransposition	82
3.1.3.1. Herstellung und Charakterisierung von TBP- <i>knock-in</i> -Stämmen	83
3.1.3.2. Retrotransposition von TRE5-A <sup>HYG</sup> in TBP(HA)- <i>knock-in</i> -Mutanten	87
3.2. Untersuchungen zum Integrationsmechanismus des Retrotransposons DGLT-A	90
3.2.1. Strukturelle Analyse des Retrotransposons DGLT-A	90
3.2.2. Analyse der endogenen DGLT-A-Retrotransposon-Population im Genom von <i>D. discoideum</i>	93
3.2.3. Analyse der Transkription von DGLT-A	99
3.2.4. Mobilisierung artifizierender markierter DGLT-A-Retrotransposons	101
3.2.5. Nachweis von Protein-Interaktionen zwischen Retrotransposons und Transkriptionsfaktoren unter Verwendung des Hefe-Zweihybrid-Systems	109
3.2.6. Interaktionsstudien des Retrotransposons DGLT-A mit TFIIB	111
3.2.7. Analyse der Protein-Interaktionen zwischen dem ORF von DGLT-A und TFIIC	113
<b>4. Diskussion</b>	<b>123</b>
4.1. Die RNA-Struktur des C-Moduls beeinflusst die Retrotransposition von TRE5-A	123
4.2. TRE5-A <sup>HYG</sup> -Retrotransposons zeigen eine ähnliche Retrotransposition wie TRE5-A <sup>BSR</sup> -Retrotransposons	127
4.3. Die Abhängigkeit der TRE5-A <sup>HYG</sup> -Retrotransposons von CbfA	128
4.3.1. Abhängigkeit der Transkription	129
4.3.2. Abhängigkeit der Retrotransposition	130
4.4. Der Einfluss der TBP-ORF1-Protein-Interaktion auf die Retrotransposition von artifizierender TRE5-A <sup>HYG</sup> <i>in vivo</i>	132
4.5. Analyse der DGLT-A-Population von <i>D. discoideum</i>	134
4.6. DGLT-A steht in Konkurrenz zu den TRE5-Retrotransposons	137
4.7. Konstruktion artifizierender DGLT-A-Retrotransposons	138
4.8. DGLT-A interagiert nicht mit TFIIB	141

4.9.	Protein-Interaktionen zwischen DGLT-A und TFIIC definieren dessen Integrationsort	142
4.10.	Erkennung von Integrationszielen: Konvergente Evolution	145
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>147</b>
<b>6.</b>	<b>Abstract</b>	<b>149</b>
<b>7.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>151</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>169</b>
8.1.	Aufstellung der verwendeten Oligonukleotide	169
8.2.	Aufstellung der verwendeten Plasmide	172
<b>9.</b>	<b>Tabellen und Abbildungen</b>	<b>181</b>
9.1.	Abbildungsverzeichnis	181
9.2.	Tabellenverzeichnis	183
<b>10.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>185</b>
<b>11.</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>187</b>

# 1. Einleitung

---

## 1.1. Die „soziale Amöbe“ *Dictyostelium discoideum*

### 1.1.1. Die Ökologie der *Dictyostelia*

Die einzelligen eukaryotischen „sozialen Amöben“ sind weltweit verbreitet und kommen meist in den oberen Schichten von Waldböden aber auch in anderen Habitaten (Wüsten, Epiphyten) vor (Raper, 1984; Romeralo *et al.*, 2012). Erstmals beschrieben wurden die „sozialen Amöben“ im 19. Jahrhundert und aufgrund der Bildung von Fruchtkörpern in die Gruppe der Pilze eingeordnet (Brefeld, 1869). Der Name „soziale Amöben“ beruht auf der Fähigkeit einzelner Zellen mittels chemischer Lockstoffe zu kommunizieren und im Rahmen einer multizellulären Entwicklung (Fruchtkörperbildung) zusammen zu arbeiten. Der bekannteste Vertreter *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) wurde vor ca. 100 Jahren entdeckt. Das damalige Isolat NC4 gilt als Vorläufer der heutigen Laborstämme (Raper, 1935). Die Nahrung der *Dictyostelia* besteht hauptsächlich aus Bakterien, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*; Bozzarro & Ponte, 1995). Neuere Untersuchungen zeigen, dass *D. discoideum* eine Symbiose mit Bakterien entwickelt und dadurch mit diesen „Landwirtschaft“ betreiben kann (Brock *et al.*, 2011; Swanson *et al.*, 1999). Einzelne Zellen sind 8 µm bis 12 µm groß, durchlaufen etwa alle 3-4 Stunden eine Zellteilung und bewegen sich amöboide fort. Diese amöboide Fortbewegung erfolgt durch die Ausbildung von Pseudopodien mittels Aktin- und Myosinfilamenten (Ashworth & Watts, 1970; Escalante & Vicente, 2000). Der optimale Temperaturbereich für das Wachstum und die Entwicklung der *Dictyostelia* liegt zwischen 20 °C und 25 °C (Raper, 1984). Des Weiteren ist das Wachstum von verschiedenen Umweltbedingungen, wie Licht und Luftfeuchtigkeit abhängig (Bonner *et al.*, 1950; Kessin, 2001; Raper, 1940; Bonner & Shaw, 1957). Die Größe und das Verzweigungsmuster der Fruchtkörper unterscheiden sich zwischen den einzelnen Arten, ebenso wie die Form der Sporen. Alternativ können auch andere Lebenszyklen, zum Beispiel die Ausbildung von Microcysten oder sexuelle Formen auftreten (Romeralo *et al.*, 2012; Schaap, 2011). Die Verbreitung der Sporen erfolgt durch Wasser oder Tiere, wie zum Beispiel durch Insekten und Vögel (Stephenson & Landolt, 1992; Suthers, 1985).

### 1.1.2. Die *Dictyostelia* und ihre phylogenetische Stellung

Der Eukaryot *D. discoideum* gehört, als Teil der *Amoebozoa*, phylogenetisch zu der Klasse der *Dictyostelia*, die nur einzellige Organismen umfasst (Schilde & Schaap, 2013). Frühere Einteilungen der *Dictyostelia* erfolgten morphologisch, aufgrund des Aufbaus und der Bildung von Fruchtkörpern. Anhand dessen wurden sie in die Gruppe der Echten Schleimpilze (*Myxomycetae*) eingeordnet, da angenommen wurde, dass ein Plasmodium ausgebildet wird (Brefeld, 1869). Dass die einzelnen Zellen während der Aggregation nicht fusionieren, sondern nur ein Pseudoplasmodium ausbilden, wurde erst einige Jahre später bekannt (van Tieghem, 1880; Brefeld, 1884). Da keine vegetativen Hyphen ausgebildet werden, wurde die Zuordnung zu den Pilzen revidiert (Potts, 1902). Die Gruppe der *Dictyostelia* umfasst heute ungefähr 150 Arten (Romeralo *et al.*, 2012). *D. discoideum* gehört der Familie der *Dictyosteliidae* an, welche aufgrund von morphologischen Daten in die Gattungen *Dictyostelium*, *Polysphondylium* und *Acytostelium* unterteilt wird (Schaap *et al.*, 2006; Alvarez-Curto *et al.*, 2005). Diese Einteilung basiert unter anderem auf Unterschieden während der Aggregation, des chemischen Lockstoffes während der Entwicklung, im Wachstum und auf speziellen Charakteristika der Fruchtkörper und Sporen (Hagiwara, 1989; Raper, 1984). So besitzt die Gattung *Dictyostelium* unverzweigte oder lateral verzweigte Fruchtkörper, die Gattung *Acytostelium* Stiele mit einem azellulären Aufbau und die Gattung *Polysphondylium* Fruchtkörper mit regelmäßigen Seitenverzweigungen (Romeralo *et al.*, 2012). Aufgrund von molekularen Daten von 18S-ribosomalen DNA-Sequenzen, *internal transcribed spacer*-Sequenzen und  $\alpha$ -Tubulin wird die Gruppe der *Dictyostelia* in vier Gruppen unterteilt (Swanson *et al.*, 2002; Romeralo *et al.*, 2007; Schaap *et al.*, 2006; Abb. 1.1). *D. discoideum* gehört zur Gruppe 4, welche für die Ausbildung der multizellulären Fruchtkörper zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) nutzt (Schaap *et al.*, 2006, 2011). Dagegen nutzen die Arten der Gruppen 1, 2 und 3 den Lockstoff Glorin (Asghar *et al.*, 2011).

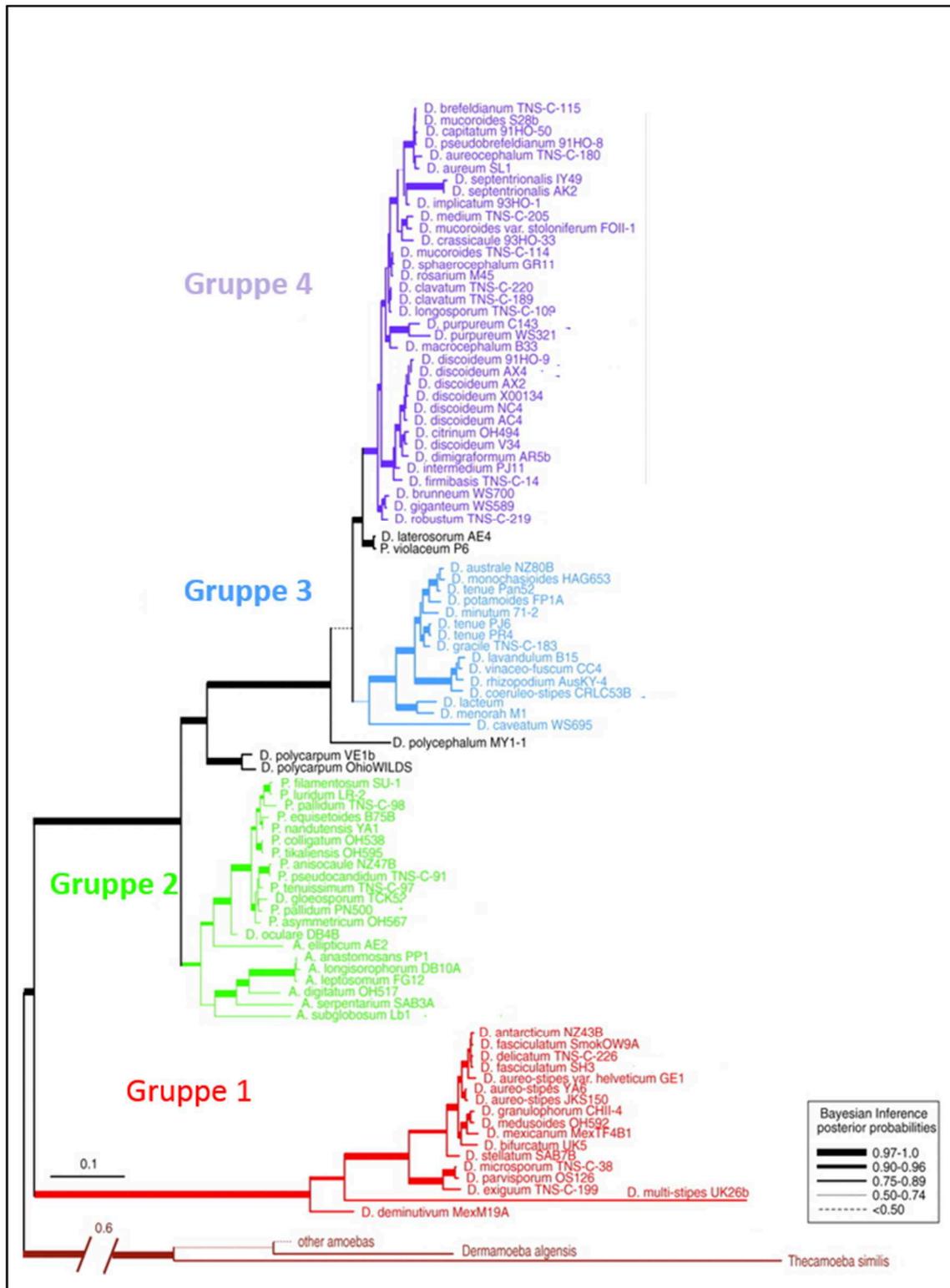


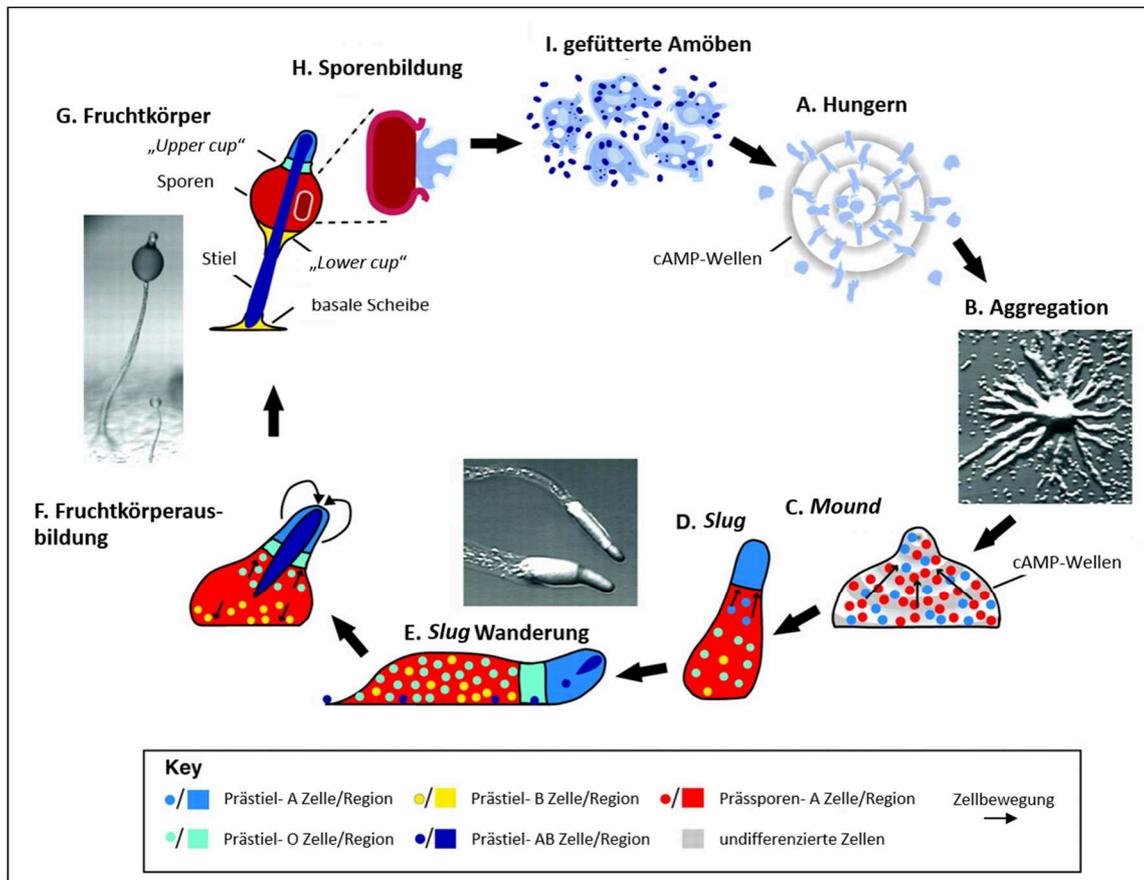
Abbildung 1.1. Phylogenetische Einteilung der Dictyosteliidae.

Der Stammbaum basiert auf molekularen Daten von 18S-ribosomalen DNA-Sequenzen von über 100 Isolaten. Abbildung modifiziert nach Schaap (2011).

### 1.1.3. Die multizelluläre Entwicklung von *D. discoideum*

Bei sich verschlechternden Umweltbedingungen, zum Beispiel durch zu hohe Zelldichte oder Nahrungsmangel, erfolgt eine Umstellung der Vermehrung durch mitotische Zellteilung zu einer multizellulären Entwicklung. Dabei kommt es zu einer veränderten Produktion des Glykoproteins *prestarvation factor*, wodurch die Expression bestimmter Proteine und damit die Aggregation der Zellen beginnt (Clarke & Gomer, 1995). Während dieser Hungerphase (Abb. 1.2 A) wird ein weiteres Glykoprotein produziert, der sogenannte *conditioned medium factor*. Durch den *conditioned medium factor* und den *prestarvation factor* werden Signalkaskaden stimuliert, welche spezielle Gene für die Produktion und Erkennung von cAMP induzieren (Clarke & Gomer, 1995; Deery & Gomer, 1999; Schaap, 2011). Die Zellen werden sensitiv gegenüber cAMP oder im Falle anderer *Dictyostelia*, gegenüber Glorin (Burdine & Clarke, 1995). Einige Zellen beginnen mit dem wellenförmigen Ausschleiden von cAMP. Die anderen Zellen bewegen sich mittels Pseudopodien auf das Zentrum des initialen cAMP-Signales zu (*Streaming*) und produzieren weitere cAMP-Signale (Coates & Harwood, 2001; Kessin, 2003; Abb. 1.2 B). Nach dieser ersten Phase des *Streamings* werden Zellaggregate (Pseudoplasmodium) gebildet, die von einer komplexen extrazellulären Matrix aus Proteinen, Zellulose und Polysacchariden umgeben sind. Diese Matrix schützt die sich entwickelnde komplexe Struktur, welche als *Mound* bezeichnet wird (Abb. 1.2 C; Romeralo *et al.*, 2012; Parent & Devreotes, 1996; Freeze & Loomis, 1977). In der Spitze dieser *Mound*-Struktur wird weiterhin cAMP produziert. Durch die Bewegung der Zellen darunter in Richtung des cAMP-Signales, verlängert sich diese Struktur und wird nun als *Slug* bezeichnet (Schaap, 2011; Abb. 1.2 D). *Slugs* können sich abhängig von Temperatur, Luftfeuchtigkeit oder Licht nacktschneckenartig auf der Oberfläche des Substrates fortbewegen (Clark & Steck, 1979; Dormann & Weijer, 2001). Die Zellen innerhalb des *Slugs* differenzieren sich zu unterschiedlichen Zelltypen (Bonner, 1952; Escalante & Vicente, 2000; Abb. 1.2 E). Dabei entstehen zu etwa 70 Prozent Präsporenzellen und zu ca. 15 Prozent Prästielzellen. Die restlichen Zellen bleiben undifferenziert (Raper, 1940; Bonner, 1952; Parent & Devreotes, 1996). Während der weiteren Entwicklung orientiert sich der *Slug* vertikal, indem er unten

flacher wird (basale Scheibe) und sich in der Mitte ein Stiel herausbildet, wobei sich die Prästielzellen am vorderen Ende des Stieles befinden (Raper & Fennell, 1952; Abb. 1.2 F).



**Abbildung 1.2. Entwicklungszyklus von *D. discoideum*.**

Darstellung der einzelnen Entwicklungsstadien unter Angabe der unterschiedlichen Zelltypen. Abbildung modifiziert nach Schaap (2011).

Im vorderen Bereich dieser Region befinden sich dabei die Prästielzellen A, welche das Protein EcmA bilden, und im hinteren Teil die Prästielzellen B, welche das Protein EcmB produzieren (Early *et al.*, 1993). Des Weiteren kommen auch sogenannte Prästielzellen AB vor, die beide Proteine produzieren (Jermyn & Williams, 1991). Die Prästielzellen A und AB bilden den Stiel, während die Prästielzellen B die basale Scheibe und den *Lower Cup* formen (Jermyn *et al.*, 1996). Während der weiteren Entwicklung des Stieles kommt es zur Vakuolisierung der Stielzellen, zur Ausbildung einer Zellwand aus Zellulose und letztendlich zum Zelltod (Tresse *et al.*, 2007; Calvo-Garrido *et al.*, 2010). Die restlichen Zellen des *Slugs*, welche die basale Scheibe formen, vakuolisieren ebenfalls und sterben

etwa zeitgleich ab. Die Präsporenzellen wandern innerhalb des Stieles nach oben und bilden Sporenkopf und Sporen aus, welche durch eine Hülle aus Proteinen und Zellulose geschützt sind (Bonner & Slifkin, 1949; West, 2003; Abb. 1.2 G/H). Unter günstigen Umweltbedingungen können die Sporen innerhalb weniger Stunden wieder zu Einzellern auskeimen (Cotter *et al.*, 1992).

#### **1.1.4. Entwicklung der Laborstämme von *D. discoideum***

Das erste *D. discoideum* Isolat NC4 wurde vor ca. 100 Jahren gewonnen (Raper, 1935). Durch Subkultivierung konnte daraus der erste axenisch, das heißt ohne Bakterien, wachsende Stamm AX1 isoliert werden (Sussman & Sussman, 1967). Eine Veränderung des damaligen Mediums führte unter erneuter Subkultivierung zur Isolation des Stammes AX2 (Watts & Ashworth, 1970). Parallel dazu wurde ein weiterer axenisch wachsender Stamm aus dem Isolat NC4 isoliert, welcher AX3 genannt wurde (Loomis, 1971). Von diesem Stamm ist ein weiterer (AX4) abgeleitet worden (Knecht *et al.*, 1986).

#### **1.1.5. Das Genom von *D. discoideum***

Im Rahmen des internationalen *Dictyostelium*-Genom-Projektes wurde der Stamm AX4 sequenziert (Kay & Williams, 1999; Eichinger *et al.*, 2005). Das ca. 34 Megabasenpaare umfassende haploide Genom von *D. discoideum* besteht aus 6 Chromosomen mit einer Größe von je 4-8 Megabasenpaaren (Eichinger *et al.*, 2005; Loomis & Kuspa, 1997). Die Chromosomen sind acro- oder telozentrisch und wahrscheinlich durch ein Zentromer, bestehend aus Clustern des transposablen Elementes *Dictyostelium intermediate repeat sequence-1* (DIRS-1), gekennzeichnet. Für ein Zentromer spricht auch die Struktur der Region (Eichinger *et al.*, 2005; Glöckner & Heidel, 2009). Die Telomerstruktur wird wahrscheinlich durch Elemente, ähnlich ribosomaler DNA geformt (Eichinger *et al.*, 2005). Das Genom ist durch einen sehr hohen A/T-Gehalt (78 %) gekennzeichnet. Relativ zur kleinen Genomgröße besitzt *D. discoideum* einen hohen Gehalt an Genen (10.000-11.000, 65 % des Gesamtgenoms), was einer Gendichte von einem Gen pro 2,6 Kilobasenpaaren entspricht (Glöckner *et al.*, 2002). Des Weiteren gibt es im Kern ca. 100 Kopien eines

extrachromosomalen palindromischen Elementes, welches die Gene der ribosomalen RNA trägt (Cox *et al.*, 1990; Loomis & Kuspa, 1997). Zusätzlich sind die zentralen 3,2 Kilobasenpaare des Palindroms auch als chromosomale Kopie auf Chromosom 4 zu finden (Eichinger *et al.*, 2005). Ungefähr 10 Prozent des gesamten Genoms bestehen aus repetitiven Elementen welche größtenteils entweder in Clustern oder in der Nähe von *transfer*-RNA (tRNA)-Genen zu finden sind (Glöckner *et al.*, 2001, 2002; Szafranski *et al.*, 1999). Ein weiteres Merkmal ist das Vorkommen von einfachen Sequenzwiederholungen (3-6 Basenpaare) in nicht codierenden Bereichen (Eichinger *et al.*, 2005). Relativ zur Genomgröße anderer Organismen besitzt *D. discoideum* sehr viele tRNA-Gene (390), welche wahrscheinlich größtenteils durch Genduplikation entstanden sind (Eichinger *et al.*, 2005). Das Chromosom 2 des Stammes AX4 besitzt eine 1,51 Megabasenpaare große Duplikation (608 Gene), welche wahrscheinlich durch eine *breakage fusion bridge* entstanden ist (Eichinger *et al.*, 2005; Glöckner *et al.*, 2002). Diese Duplikation kommt jedoch nicht beim Isolat NC4 und auch nicht bei dessen Abkömmling AX2 vor (Kuspa *et al.*, 1992; Eichinger *et al.*, 2005).

## 1.2. Der RNA-Polymerase III-Komplex

Die RNA-Polymerase III der Eukaryoten transkribiert neben tRNA-Genen, die Gene der 5S-ribosomalen RNA und anderer kleiner RNAs. Dabei bilden Transkriptionsfaktoren mit der DNA einen Präinitiationskomplex und sichern so die korrekte Bindung der RNA-Polymerase III am Transkriptionsstart der Gene (Geiduschek & Tocchini-Valentini, 1988). Es werden drei Initiationskomplexe unterschieden. Der Typ I dient der Transkription des 5S-ribosomalen RNA-Gens. Dabei bindet der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) an einen Promotor (C-Box) innerhalb des codierenden Bereiches. Anschließend bindet der Transkriptionsfaktor IIIC (TFIIIC) gefolgt von dem Transkriptionsfaktor IIIB (TFIIB), der für die Bindung der RNA-Polymerase III essentiell ist. Der Typ II transkribiert die tRNA-Gene (Abb. 1.3). Dabei bindet zuerst TFIIIC an die A- und B-Box des tRNA-Gens und rekrutiert anschließend TFIIB, der wiederum die RNA-Polymerase III rekrutiert. Der Initiationskomplex Typ III transkribiert unter anderem die U6-*small nuclear* RNA. Diese Gene enthalten keine internen Promotor-Elemente, besitzen aber oberhalb der

codierenden Region meist Promotor- und *Enhancer*-Elemente (z.B. TATA-Box). Auch hier ist TFIIIB für die Bindung der RNA-Polymerase III am Transkriptionsstart essentiell (Schramm & Hernandez, 2002). TFIIIA und TFIIIC dienen hauptsächlich dazu TFIIIB an die DNA heran zu führen (Kassavetis *et al.*, 1990, 1992).

In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) codieren 17 Gene für die Untereinheiten der RNA-Polymerase III. Diese haben keine Homologien zu bakteriellen Untereinheiten. Drei dieser Untereinheiten weisen eine Ähnlichkeit zu den Untereinheiten der RNA-Polymerase I oder II auf, fünf Untereinheiten kommen in allen RNA-Polymerasen von *S. cerevisiae* vor (Geiduschek & Kassavetis, 2001).

### 1.2.1. TFIIIB

TFIIIB in *S. cerevisiae* ist ein Trimer, gebildet aus den Untereinheiten TATA-Bindeprotein (TBP), *B-double-prime 1* (Bdp1) und *B-related-factor* (Brf1/Brf2) (Abb. 1.3). Brf1 wird nur bei Genen mit internen Promotoren und Brf2 bei Genen mit externen Promotoren gefunden. Brf2 bindet innerhalb des Initiationskomplexes nicht an TFIIIC (White, 2011). Die Untereinheiten TBP und Brf1 binden mit hoher Affinität aneinander (B'-Komplex). Bdp1 ist an diesen Komplex nur schwach gebunden. TFIIIB findet seine DNA-Bindestelle oberhalb des Transkriptionsstartes entweder durch Bindung an eine TATA-Box mittels der Untereinheit TBP oder durch die Bindung an TFIIIC (Geiduschek & Kassavetis, 2001). Nach Bildung des TFIIIB-DNA-Komplexes bindet die RNA-Polymerase III wahrscheinlich über ihre Untereinheit C34 an die Untereinheit Brf1 von TFIIIB. Des Weiteren stabilisiert Brf1 den TFIIIB-Komplex durch die Bindung der C-terminalen-Domäne an die Untereinheiten TBP und Bdp1 (Geiduschek & Kassavetis, 2001; Kassavetis & Geiduschek., 2006). Bdp1 scheint entscheidend für die Stabilisierung des TFIIIB-DNA-Komplexes zu sein. Die humanen TFIIIB Untereinheiten sind denen von *S. cerevisiae* homolog (Geiduschek & Kassavetis, 2001).

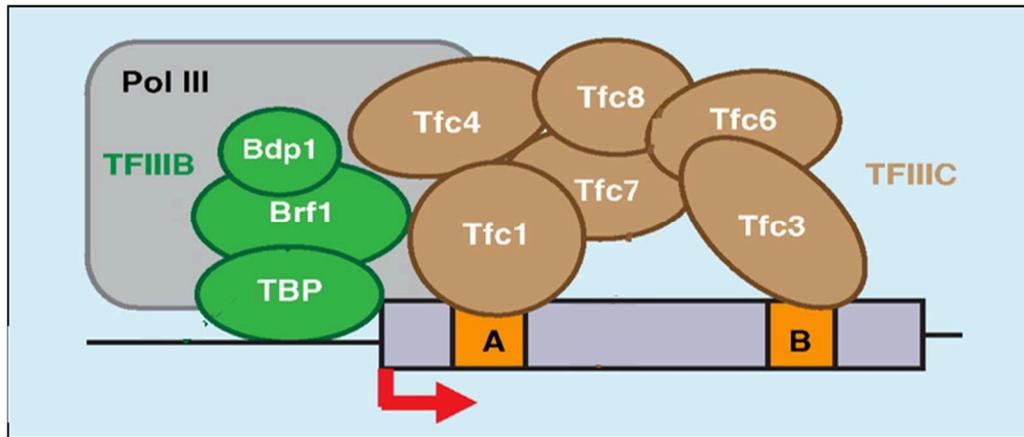
TFIIIB in *D. discoideum* enthält ebenfalls die drei bekannten Untereinheiten. Die Untereinheit TBP besteht aus 205 Aminosäuren und ist 22,8 kDa groß (Chung *et al.*, 2007). Die Sequenz ist zu ca. 68,5 Prozent mit den humanen bzw. Hefe-Orthologen identisch. Das Protein setzt sich vermutlich ähnlich wie der C-terminale Teil des humanen TBP aus zwei

symmetrischen Domänen zusammen, die jeweils zwei Helices (H1 und H2 bzw. H1' und H2') beinhalten. Die N-terminale Domäne von TBP bindet an Brf1 (Chung *et al.*, 2007). Brf1 besteht aus 706 Aminosäuren und ist 79,9 kDa groß. Die N-terminale Domäne ist zu 42 bzw. 48 Prozent mit den Hefe- bzw. humanen- Orthologen identisch. Die C-terminale Domäne von Brf1 weist dagegen nur eine geringe Homologie zu den Orthologen in Hefe bzw. Mensch auf. *In vitro* ist eine Protein-Interaktion zwischen der C-terminalen Domäne von Brf1 und dem TBP-Protein, ähnlich zu *S. cerevisiae* nachweisbar (Chung *et al.*, 2007). Eine Bdp1-Domäne konnte mittels *Blastp*-Suchen ermittelt werden, weist aber nur eine geringe Homologie zu den beiden Orthologen aus Hefe und Mensch auf (Chung *et al.*, 2007).

### 1.2.2. TFIIC

TFIIC von *S. cerevisiae* besteht aus 6 Untereinheiten (Tfc1, Tfc3, Tfc4, Tfc6, Tfc7 und Tfc8), welche zu den humanen Untereinheiten homolog sind. TFIIC ist Teil der Initiationskomplexe Typ I und Typ II (Schramm & Hernandez, 2002; Geiduschek & Kassavetis, 2001; Dumay-Odelot *et al.*, 2007). Die 6 Untereinheiten sind in den zwei großen Domänen  $\tau_A$  (Tfc1, Tfc4, Tfc7) und  $\tau_B$  (Tfc3, Tfc6, Tfc8) organisiert, welche nach ihrer DNA-Bindestelle, der A- oder B-Box von tRNA-Genen, benannt sind (Abb. 1.3; Geiduschek & Kassavetis, 2001). Die Untereinheit Tfc4 enthält 11 Tetratricopeptid-Repeat-Wiederholungen (TPR), welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Marck *et al.*, 1993). Die Untereinheit Tfc8 enthält eine  $\alpha/\beta$ -Struktur, welche für die Bindung mit TBP verantwortlich ist (Mylona *et al.*, 2006). Tfc4 rekrutiert TFIIB aufgrund einer Interaktion mit der Brf1- und Bdp1-Untereinheit von TFIIB (Geiduschek & Kassavetis, 2001).

In *D. discoideum* kommt TFIIC ebenfalls als Multiproteinkomplex vor. Allerdings konnte bisher nur eine Bindung an die B-Box des tRNA-Gens nachgewiesen werden. Zusätzlich zur B-Box bindet TFIIC an die externe B-Box der tRNA-Gene, welche 19-35 Basenpaare unterhalb der codierenden Region liegt. TFIIC nutzt diese möglicherweise als „Parkposition“ während der Transkription der tRNA-Gene (Bukenberg *et al.*, 1994).



**Abbildung 1.3.** Darstellung des RNA-Polymerase III-Komplexes, Typ II von *S. cerevisiae*.

Bindung von TFIIC (braun) und TFIIB (grün) sowie der RNA-Polymerase III an einem tRNA-Gen. Abbildung modifiziert nach Vannini (2013).

### 1.2.3. tRNA-Gene in *D. discoideum*

Im Genom von *D. discoideum* existieren 390 tRNA-Gene, die in bis zu 21 Kopien im Genom vorkommen und in 41 Gruppen eingeteilt werden. Durch den hohen A/T-Gehalt des Genoms kommen hauptsächlich A/T-reiche Codons und entsprechende tRNA-Gene vor (Eichinger *et al.*, 2005). 90 Prozent aller Gene enden mit einem *ochre*-Stopp-Codon (*D. discoideum codon-usage-table*, [www.dictybase.org](http://www.dictybase.org); Winckler *et al.*, 2005).

Die tRNA-Gene besitzen, wie in anderen Organismen auch, eine A-Box und eine B-Box als interne Promotorregionen. Die B-Box ist mit der Basenfolge  $G_{53}TTCRANYC_{61}$  (N: jedes Nukleotid; R: Purin; Y: Pyrimidin) innerhalb aller tRNA-Gene von *D. discoideum* konserviert (Bukenberger *et al.*, 1991). Im Unterschied zu anderen Organismen besitzen ca. 66 Prozent aller tRNA-Gene 19-35 Basenpaare unterhalb ihrer codierenden Region eine externe B-Box (Hofmann *et al.*, 1991; Siol *et al.*, 2006).

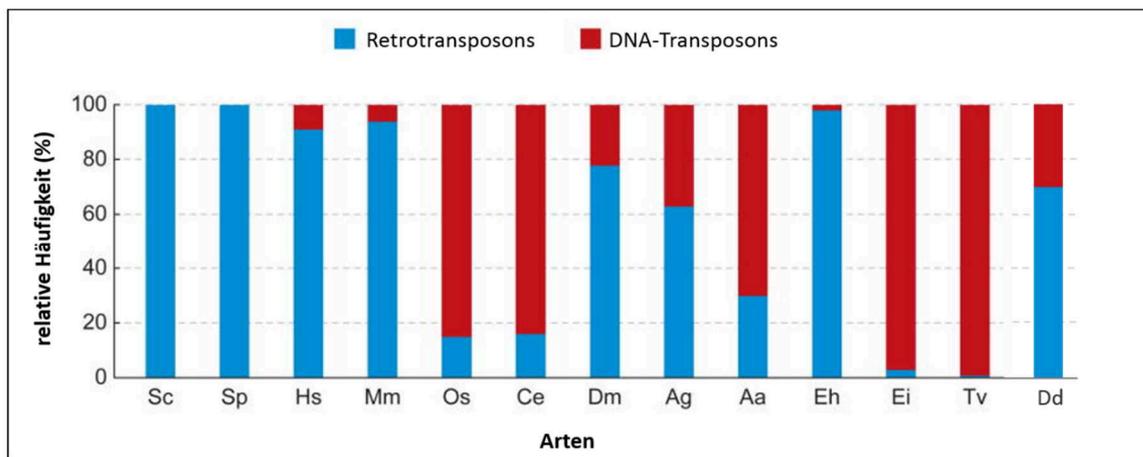
## 1.3. Transposable Elemente

Transposable Elemente, auch als Transposons oder mobile Elemente bezeichnet, sind genetische Einheiten, welche sich von einem Ort des Genoms zu einem anderen bewegen können (Craig *et al.*, 2002). Erstmals wurden sie in den vierziger Jahren des

20. Jahrhunderts von Barbara McClintock in *Zea mays* beschrieben (McClintock, 1948). Mittlerweile sind sie sowohl in zahlreichen Eukaryoten, als auch in vielen Prokaryoten nachgewiesen und können einen beträchtlichen Anteil des Genoms eines Organismus einnehmen (Munoz-Lopez & Garcia-Perez, 2010). Zum Beispiel bestehen über 80 Prozent des Genoms von Mais, 37 Prozent des Genoms der Maus, 45 Prozent des humanen Genoms und ca. 10 Prozent des Genoms von *D. discoideum* aus transposablen Elementen (SanMiguel *et al.*, 1996; Waterston *et al.*, 2002; Lander *et al.*, 2001; Eichinger *et al.*, 2005). Aufgrund ihrer „Mobilität“ innerhalb des Genoms spielen sie eine signifikante Rolle in der Genomevolution. So können beispielsweise Gene inaktiviert, die Genexpression beeinflusst oder auch Rekombinationsvorgänge zwischen homologen transposablen Elementen induziert werden (Kazazian *et al.*, 1988; Lerman & Feder, 2005; Kidwell & Lisch, 2001).

Sowohl von Wirtszellen als auch von transposablen Elementen existieren verschiedene Integrations- und Regulations-Strategien. Manche Transposons integrieren in die Heterochromatin-Regionen oder in die Nähe von tRNA-Genen oder sind nur während der Stammzell- oder Embryonalentwicklung aktiv (Pimpinelli *et al.*, 1995; Devine & Boeke, 1996; Kano *et al.*, 2009). Wirtsorganismen beeinflussen die Transposonaktivität beispielsweise mittels DNA-Methylierung, um deren Expression zu regulieren, durch RNA-Interferenz-Mechanismen oder durch Inaktivierung der Transposons mittels spezifischer Proteine (Barlow, 1993; Sijen & Plasterk, 2003; Schumann, 2007).

Die mobilen Elemente können aufgrund ihres Transpositionsmechanismus in zwei Gruppen eingeteilt werden. (1) DNA-Transposons bewegen sich mittels dem „cut and paste“-Mechanismus von einem Ort zum anderen, das heißt sie schneiden sich selbst aus der DNA heraus und integrieren sich an anderer Stelle wieder. (2) Die Gruppe der RNA-Transposons oder Retrotransposons bewegt sich mittels des „copy and paste“-Mechanismus über messenger-RNA (mRNA) als mobile Zwischenstufe (Munoz-Lopez & Garcia-Perez, 2010). Sowohl Retrotransposons als auch DNA-Transposons sind in unterschiedlichen Mengen in verschiedenen Organismen vertreten (Abb. 1.4; Feschotte & Pritham, 2007).



**Abbildung 1.4. Darstellung der Häufigkeit von DNA-Transposons und Retrotransposons in eukaryotischen Genomen.**

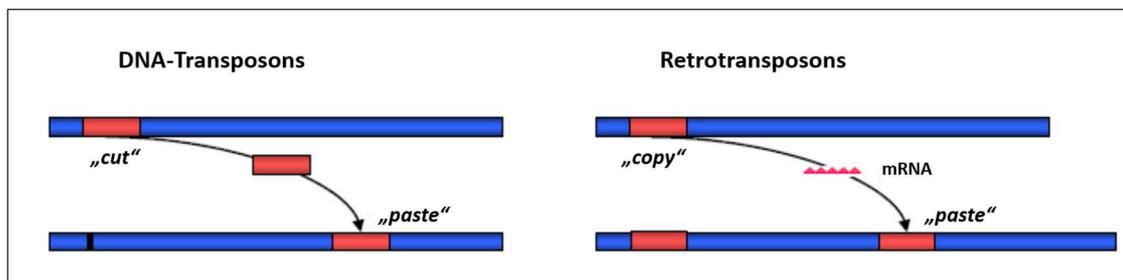
Angegeben ist die relative Häufigkeit der transposablen Elemente. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Os: *Oryza sativa*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ag: *Anopheles gambiae*; Aa: *Aedes aegypti*; Eh: *Entamoeba histolytica*; Ei: *Entamoeba invadens*; Tv: *Trichomonas vaginalis*; Dd: *Dictyostelium discoideum*. Abbildung modifiziert nach Feschotte & Pritham (2007).

### 1.3.1. DNA-Transposons

DNA-Transposons (Klasse-II-Transposons) transponieren meist mittels des klassischen „cut and paste“-Mechanismus (Abb. 1.5). Dabei wird mittels einer Transposase die doppelsträngige DNA des Transposons aus dem Genom herausgeschnitten und an anderer Stelle wieder integriert. Es erfolgt keine signifikante Veränderung der Genomgröße des Wirtsorganismus, da die Anzahl des Transposons konstant bleibt (Craig *et al.*, 2002). Zwei Gruppen der DNA-Transposons (*Helitrons* und *Mavericks*) transponieren interessanterweise über einen abgewandelten „copy and paste“-Mechanismus, mittels einer DNA-Polymerase und einzelsträngiger DNA als mobile Zwischenstufe (Kapitonov & Jurka, 2001; Pritham *et al.*, 2007). Viele DNA-Transposons inserieren in der Nähe ihres Ursprungsortes (*local hopping*; Kazazian, 2004). Eine Vermehrung der meisten DNA-Transposons kann nur während der Replikation des Genoms, in der S-Phase der Wirtszelle, erfolgen (Fedoroff, 1989).

DNA-Transposons bestehen aus einem offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der für eine Transposase codiert und terminalen entgegengesetzt orientierten

Wiederholungen, die als Bindemotiv für die Transposase dienen. Des Weiteren besitzt die 5' invertierte terminale Wiederholung eine Promotoraktivität für den ORF (Plasterk *et al.*, 1999; Craig *et al.*, 2002). Ein weiteres Merkmal vieler DNA-Transposons sind Zielsequenz-Verdopplungen oberhalb und unterhalb des Transposons. Diese entstehen während des Transpositionsprozesses aufgrund eines versetzten Schnittes der Wirts-DNA und verbleiben im Genom als „Fußabdruck“ nachdem das Transposon diesen genetischen Ort wieder verlassen hat (Craig *et al.*, 2002).



**Abbildung 1.5. Transpositionsmechanismen der DNA- und Retrotransposons.**

DNA-Transposons transponieren über den „cut and paste“-Mechanismus (links). Die Kopienzahl der Transposons bleibt dadurch unverändert. Retrotransposons transponieren dagegen über den „copy and paste“-Mechanismus (rechts). Dabei wird ein RNA-Intermediat erstellt, welches nach Umwandlung in DNA mittels Reverser Transkriptase an anderer Stelle in das Genom integriert wird. Dadurch verdoppelt sich die Anzahl des Retrotransposons bei jedem Sprungereignis.

### 1.3.2. Retrotransposons

Retrotransposons bewegen sich über mRNA als mobile Zwischenstufe („copy and paste“-Mechanismus; Abb. 1.5). Diese wird revers transkribiert und an anderer Stelle im Genom integriert. Dadurch erfolgt eine Duplikation des Retrotransposons, so dass sich ihre Anzahl mit jedem Sprungereignis erhöht (Craig *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu Retroviren, sind Retrotransposons in der Regel nicht in der Lage, die Zelle zu verlassen. Sie vermehren sich innerhalb des Genoms ihrer Wirtszelle (Wilhelm & Wilhelm, 2001).

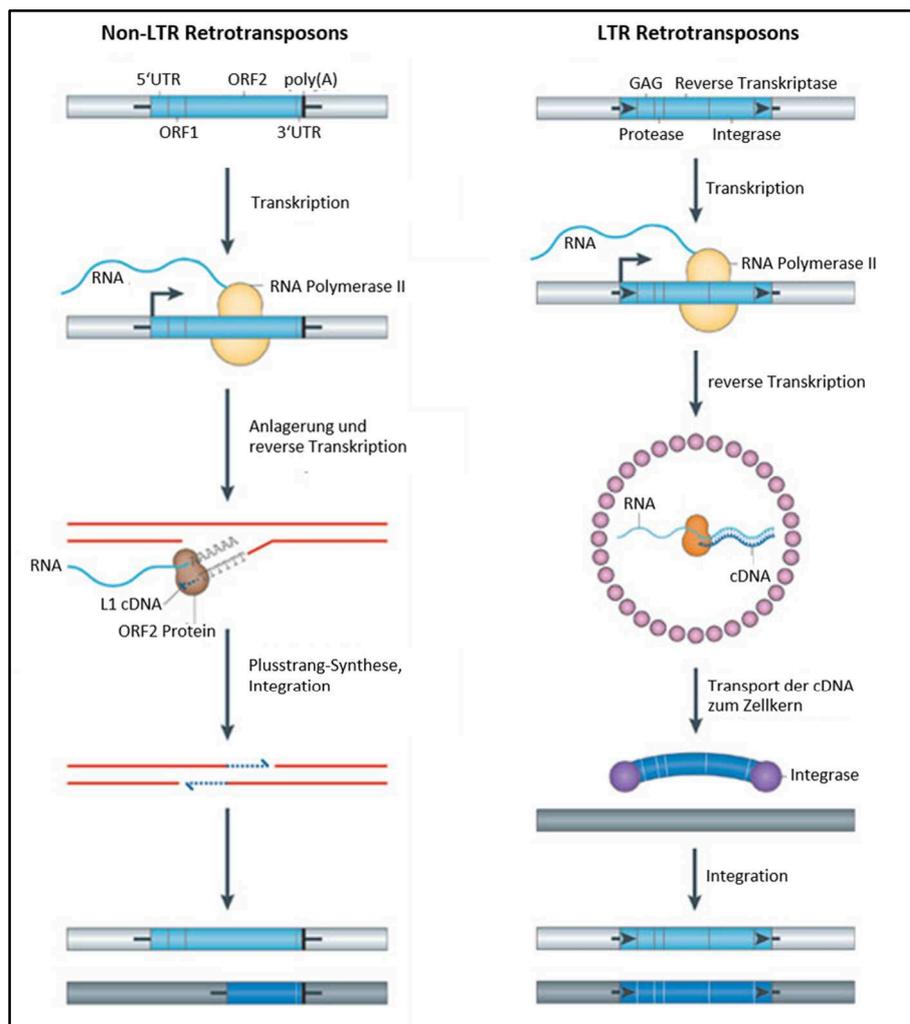
Eingeteilt werden Retrotransposons in zwei Gruppen, abhängig davon, ob sie von langen endständigen Wiederholungen (*long terminal repeat*, LTR) flankiert werden oder nicht. So gibt es zum einen die Gruppe der LTR-Retrotransposons und zum anderen die Gruppe der Non-LTR-Retrotransposons (Boeke & Stoye, 1997; Eickbush & Malik, 2002). Zudem kann auch eine Unterscheidung bezüglich autonomer und nicht-autonomer Retrotransposons

getroffen werden. Autonome Retrotransposons codieren selbst für die Proteine, die sie für ihre Mobilisation benötigen. Nicht-autonome Retrotransposons benötigen die Proteine anderer Retrotransposons um mobilisiert zu werden (Capy, 2005).

### **1.3.2.1. Non-LTR-Retrotransposons**

Die Gruppe der eukaryotischen Non-LTR-Retrotransposons umfasst die größte Klasse aller Transposons (Malik *et al.*, 1999). Non-LTR-Retrotransposons bestehen typischerweise aus einem oder zwei ORFs und sind 4-6 Kilobasenpaare groß. Das ORF1-Protein besitzt eine RNA-Bindeaktivität und dient als Nukleinsäure-Chaperon (Hohjoh & Singer, 1997; Martin & Bushman, 2001). Der ORF2 codiert für ein Polyprotein, mit den Domänen für eine Reverse Transkriptase und eine Endonuklease, die für die Transposition notwendig sind (Yang *et al.*, 1999; Malik *et al.*, 1999). Flankiert werden diese Transposons von sehr variablen 5'- und 3'-untranslatierten Regionen. Die untranslatierte Region am 5'-Ende besitzt meist eine RNA-Polymerase II-Promotoraktivität (Swergold, 1990; Schumann *et al.*, 1994). Die untranslatierte Region am 3'-Ende besitzt ein Terminationssignal, ein Polyadenylierungssignal, einen adenosinreichen Anhang und eine Struktur zur Bindung der reversen Transkriptase (Ostertag & Kazazian, 2001; Batzer & Deininger, 2002; Anzai *et al.*, 2005). Non-LTR-Retrotransposons sind oft am 5'-Ende trunziert, da sie meist nicht komplett revers transkribiert werden (Szak *et al.*, 2002).

Der Vorgang der Transposition der Non-LTR-Retrotransposons ist noch nicht komplett verstanden. Durch Zusammenlagerung der Retrotransposon-RNA mit den ORF1- und ORF2-Proteinen kommt es zur Ausbildung von Ribonukleoprotein-Komplexen (Kulpa & Moran, 2005). Die Endonuklease-Domäne besitzt eine Kernlokalisationssequenz, über welche der Ribonukleoprotein-Komplex in den Zellkern wandert (Kubo *et al.*, 2006). Der Ribonukleoprotein-Komplex bindet dann an die Ziel-DNA, wobei die Minusstrang-DNA durch die Endonuklease geschnitten wird. Nach Anlagerung der Retrotransposon-RNA mittels des A-Anhangs an die DNA startet die Reverse Transkription der Retrotransposon-RNA durch Anlagerung der Reversen Transkriptase an die freie 3'-Hydroxylgruppe der Ziel-DNA (*target prime reverse transcription*, TPRT-Mechanismus, Abb. 1.6). Allerdings ist der Vorgang der Verknüpfung des 5'-Endes der transkribierten Retrotransposon-DNA mit der Ziel-DNA noch nicht verstanden (Kopera *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.6. Transpositionsmechanismen von Retrotransposons.**

Links: Non-LTR-Retrotransposons. Nach Synthese der mRNA (hellblau) des Non-LTR-Retrotransposons, erfolgt ein Schnitt der Minusstrang-DNA durch die eigene Endonuklease. Die Retrotransposon RNA lagert sich nun über den poly(A)-Schwanz an das freie 3'-Ende der DNA an. Die freie 3'-Hydroxylgruppe der DNA dient nun als Startpunkt der reversen Transkription der Transposon-mRNA. Es folgt die Plusstrang-Synthese und die vollständige Integration. Durch eine nicht vollständige Reverse Transkription entstehen häufig 5' trunke Retrotransposons, welche die Fähigkeit zur Transposition verloren haben. Rechts: LTR-Retrotransposons. LTR-Retrotransposons codieren für GAG, Reverse Transkriptase, Protease und Integrase. Der Promotor des 5'-LTR produziert mittels der RNA-Polymerase II die mRNA des LTR-Retrotransposons. In virus-ähnlichen Partikeln wird die mRNA mittels Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben und mittels der Integrase im Zellkern in die genomische DNA integriert. Abbildung modifiziert nach Levin & Moran (2011).

Ebenso wie bei DNA-Transposons können Zielsequenz-Verdopplungen von zwei bis zu mehreren hundert Basen auftreten (Gilbert *et al.*, 2002, 2005). Non-LTR-Retrotransposons können auch *in trans* durch Proteine anderer Transposons des gleichen

Typs, mobilisiert werden. Im Gegensatz zu *in cis*-Mobilisierung, durch die eigenen Proteine, ist diese aber viel schwächer (Kajikawa & Okada, 2002; Wei *et al.*, 2001).

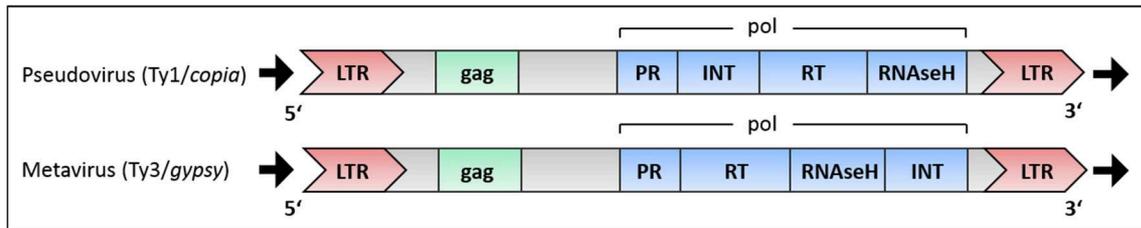
### 1.3.2.2. LTR-Retrotransposons

Die in Eukaryoten weit verbreiteten LTR-Retrotransposons sind aufgrund ihres strukturellen Aufbaus mit den Retroviren verwandt. LTR-Retrotransposons besitzen im Unterschied zu den Retroviren entweder ein unvollständiges, ein funktionsloses oder kein *env*-Gen, welches für Hüllproteine codiert. Daher können sie die Wirtszelle nicht verlassen (Lerat & Capy, 1999). Weiterhin zeichnen sie sich durch ihre flankierenden LTRs aus. Diese sind meist durch das typische 5'-TG...CA-3' *short inverted repeat motif* gekennzeichnet und haben oft die gleiche Orientierung (Boeke & Chapman, 1991). Außerdem können die LTRs meist in eine U3-R-U5-Struktur eingeteilt werden, wobei die R- und U5-Region stärker als die U3-Region konserviert sind (Benachenhou *et al.*, 2009, 2013). Die LTRs besitzen regulatorische Elemente für Integration und Transkription und dienen sowohl als Promotor als auch als Terminator für die Transkription der ORFs. Die U3-Promotorregion enthält eine TATA-Box. Die R-Region wird als Transkriptionsstart (5'-LTR) und als Transkriptionsende (3'-LTR) definiert und enthält am Übergang zu U5 ein Polyadenylierungs-Signal (AATAAA-Motiv). Die U5-Region ist außerdem häufig G/T-reich (Benachenhou *et al.*, 2009, 2013). Zwischen den LTRs befindet sich bei autonomen LTR-Retrotransposons die für strukturelle und enzymatische Proteine codierende Region, welche aus einem oder zwei ORFs besteht. Der ORF1 beinhaltet das sogenannte *gag*-Gen, welches für strukturelle Proteine (Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsidproteine) zum Aufbau der Virus-ähnlichen Partikel codiert und in denen die reverse Transkription der mRNA der LTR-Retrotransposons stattfindet. Der ORF2 beinhaltet das sogenannte *pol*-Gen, welches für verschiedene enzymatische Proteine codiert: Protease, Reverse Transkriptase, Ribonuklease H und Integrase (Havecker *et al.*, 2004). Typisch für LTR-Retrotransposons ist das Vorkommen einer tRNA-Primer-Bindestelle, welche sich unterhalb des 5'-LTR befindet und den Beginn der Reversen Transkription der *minus-strand strong-stop* DNA darstellt (Leng *et al.*, 1998; Arkhipova *et al.*, 1986). An der tRNA-Primer-Bindestelle bindet meist eine komplementäre zelluläre tRNA und initiiert damit die Reverse Transkription (Chen & Barker, 1984). LTR-Retrotransposons besitzen eine Polypurin-Bindestelle, welche

als Start für die Reverse Transkription der *plus-strand strong-stop* DNA dient und sich oberhalb des 3'-LTRs befindet (Leng *et al.*, 1998; Arkhipova *et al.*, 1986).

Die Transposition der LTR-Retrotransposons beginnt mit der Transkription der RNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II und startet an der R-Region des 5'-LTRs. Die RNA dient zum einen für die Translation der Gag- und Pol-Proteine und zum anderen als Transkript für die reverse Transkription. Die Translation erfolgt im Zytoplasma. Das Polyprotein wird durch die Protease in die einzelnen Proteine gespalten und es kommt zur Bildung der Virus-ähnlichen Partikel (Haag *et al.*, 2000). Innerhalb der Virus-ähnlichen Partikel startet die reverse Transkription der mRNA durch Bindung einer tRNA an die tRNA-Primer-Bindestelle in der Nähe des 5'-LTRs. Die so entstandene *minus-strand strong-stop* DNA wird zum 3'-LTR transportiert. Durch Bindung an die Polypurin-Bindestelle erfolgt die Bildung der komplementären *plus-strand strong-stop* DNA (Leng *et al.*, 1998; Arkhipova *et al.*, 1986). Nach Auflösung der Virus-ähnlichen Partikel gelangt die mit der Integrase komplexierte Retrotransposon-DNA in den Zellkern. Bei einigen LTR-Retrotransposons wird dieser Präintegrationskomplex wahrscheinlich aktiv in den Zellkern transportiert, wie zum Beispiel bei den *transposons of yeast* (Ty)-Retrotransposons in *S. cerevisiae* (Kenna *et al.*, 1998). Nach einem durch die Integrase generierten versetzten Doppelstrangbruch in der Zielsequenz der genomischen DNA erfolgt die Integration der kopierten DNA des LTR-Retrotransposons in das Genom der Wirtszelle (Kenna *et al.*, 1998; Havecker *et al.*, 2004; Abb. 1.6). Aufgrund des versetzten Doppelstrangbruchs zur Integration des Retrotransposons entstehen auch typische Zielsequenz-Verdopplungen mit einer Länge zwischen 4-6 Basenpaaren (Sandmeyer *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1998). Aufgrund von homologen Rekombinationsereignissen zwischen den LTRs eines oder verschiedener LTR-Retrotransposons einer Art entstehen häufig einzelne LTR-Sequenzen (Solo-LTRs), wobei der zwischen den LTRs liegende Bereich des Genoms deletiert wird (Vitte & Panaud, 2005).

Eine Einteilung der LTR-Retrotransposons erfolgt auf Basis der stark konservierten Reversen Transkriptase und der ORFs in sieben Gruppen: Ty1/ copia-Gruppe (Abb. 1.7); Hepatitis B Virus-Gruppe, DIRS-1-Gruppe (Tyrosin-Rekombinase-Retrotransposons), BEL/Pao-Gruppe, Ty3/ gypsy-Gruppe (Abb. 1.7), Caulimovirus-Gruppe und Retroviren (Malik *et al.*, 2000; Goodwin & Poulter, 2001; Malik, 2005; de la Chaux & Wagner, 2011).



**Abbildung 1.7. Genomische Organisation unterschiedlicher LTR-Retrotransposon-Familien.**

INT: Integrase; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNaseH: Ribonuklease H; LTR: *long terminal repeat*; gag: *group specific antigen*; pol: *poly protein*. Abbildung modifiziert nach Casacuberta & Santiago (2003).

### Das Ty1-Retrotransposon von *S. cerevisiae*

Das LTR-Retrotransposon Ty1 (5,9 Kb) und dessen Solo-LTRs gehören zur Ty1/ copia-Familie (Abb. 1.7) und stellen das häufigste Retrotransposon im Genom von *S. cerevisiae* dar. Es integriert 75-750 Basenpaare oberhalb von RNA-Polymerase III transkribierten tRNA-Genen, in der Nähe von TFIIB. Dieser Bereich ist meist frei von Genen und somit ein „sicherer“ Integrationsort (Devine & Boeke, 1996; Bachman *et al.*, 2005). Bei der Integration dient eine spezielle Nukleosomen-Oberfläche an der H2A/H2B-Stelle als Integrationsziel (Devine & Boeke, 1996; Mularoni *et al.*, 2012; Bridier-Nahmias & Lesage, 2012). Eine wichtige Rolle bei der Integration von Ty1 an tRNA-Genen spielt die Untereinheit Bdp1 von TFIIB. So scheint Bdp1 bei der Bildung der Chromatinstruktur und somit an der Umbildung der Nukleosomen beteiligt zu sein (Bachman *et al.*, 2005).

Die Anordnung der katalytischen Domänen des *pol*-Gens von Ty1 in der Reihenfolge Protease, Integrase, Reverse Transkriptase und Ribonuklease H (Abb. 1.7) entspricht der Gruppe der *Pseudoviridae* (Sandmeyer *et al.*, 1990) und dem typischen Aufbau der LTR-Retrotransposons. Die Transposition erfolgt nach dem für LTR-Retrotransposons beschriebenen Mechanismus. Zur Bildung der *minus-strand strong-stop* DNA bindet die tRNA-Primer-Bindestelle komplementär die tRNA<sup>Met</sup> (Boeke *et al.*, 1988; Chapman *et al.*, 1992). Mutationen in der Struktur der tRNA haben einschneidende Effekte auf die Transposition (Friant *et al.*, 1998). Die *antisense*-RNA des Ty1-Retrotransposons verringert nach der Translation die Proteinmengen der Gag, Integrase und Reversen Transkriptase durch Inhibition der Transposition innerhalb der Virus-ähnlichen Partikel und somit die Retrotransposition (Matsuda & Garfinkel, 2009).

### **Das Ty3-Retrotransposon von *S. cerevisiae***

Das Retrotransposon Ty3 (5,4 Kb) von *S. cerevisiae* gehört zur Gruppe der gypsy/Ty3-Retrotransposons (*Metaviridae*; Abb. 1.7) und besitzt deren typische Abfolge der katalytischen Domänen des *pol*-Gens: Protease, Reverse Transkriptase, Ribonuklease H und Integrase (Sandmeyer *et al.*, 1990). Das Ty3-Retrotransposon hat mit den Retroviren diverse strukturelle und funktionelle Übereinstimmungen. Neben der Ausbildung von Virus-ähnlichen Partikeln besitzt die Ty3-Integrase ähnlich zu Retroviren eine konservierte Domäne mit einem katalytischen DDX<sub>35</sub>E-Motiv, eine C-/N-terminale Zinkfinger-Domäne und ein GPY/F-Motiv (Nymark-McMahon *et al.*, 2002; Malik & Eickbush, 1999).

Ty3-Retrotransposons integrieren sehr spezifisch in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes von RNA-Polymerase III-transkribierten Genen. Dies geschieht durch eine Interaktion der Ty3-Integrase mit TFIIB und TFIIC (Sandmeyer *et al.*, 1990; Yieh *et al.*, 2000,2002, Qi & Sandmeyer, 2012). TFIIB ist wichtig für die Zielerkennung von Ty3, da TFIIC allein zu keiner Integration führt. Dabei spielen die Untereinheiten TBP und Brf1 als DNA-bindende Komponenten von TFIIB die entscheidende Rolle. Die Untereinheit Bdp1 erhöht lediglich die Effektivität der Integration (Yieh *et al.*, 2000, 2002). Neuere Studien zeigen, dass ein minimales Fusionsprotein aus TBP und Brf1 für die Zielerkennung und der Interaktion mit der Ty3-Integrase ausreichend ist (Qi & Sandmeyer, 2012). TFIIC beeinflusst die Integration von Ty3 durch Interaktionen mit dem N-terminalen Bereich der Ty3-Integrase und darüber hinaus die Orientierung der Bindung von TFIIB an die TATA-Box (Aye *et al.*, 2001).

### **Das Ty5-Retrotransposon von *S. cerevisiae***

Das Ty5-Retrotransposon von *S. cerevisiae* integriert im Gegensatz zu Ty1, Ty2, Ty3 und Ty4 zu 95 Prozent in Heterochromatin-Regionen der Telomere. Dies basiert auf einer Interaktion zwischen der Ty5-Integrase und dem Sir4-Protein, welches eine Komponente des Heterochromatins ist (Bushman, 2003, Xie *et al.*, 2001). Im strukturellen Aufbau ähnelt Ty5 dem Ty1-Retrotransposon (Xie *et al.*, 2001).

### 1.3.2.3. Insertionspräferenzen von transposablen Elementen

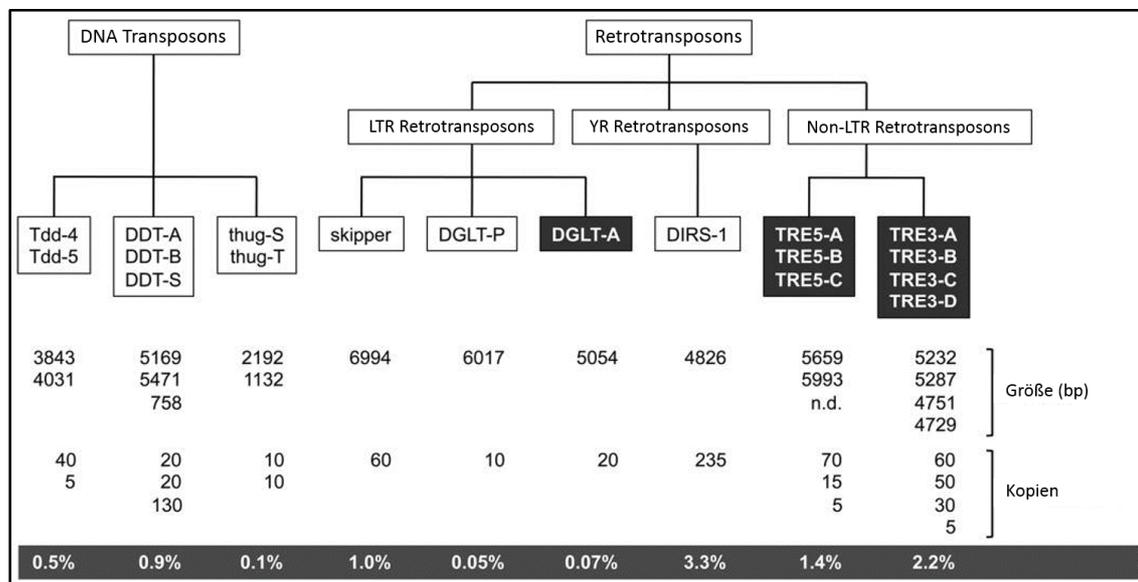
Mit zunehmender Gendichte eines Genoms nimmt der Anteil an Transposons ab und die Ausprägung von Integrationspräferenzen zu, da sich tendenziell die Wahrscheinlichkeit erhöht in codierende und regulierende DNA-Abschnitte zu integrieren. Daher kommen Transposons mit einer Integrationspräferenz häufig in Genomen mit einer hohen Gendichte vor (Boeke & Devine, 1998; Eichinger *et al.*, 2005).

Innerhalb aller Transposon-Gruppen sind Integrationspräferenzen bekannt. So integriert das DNA-Transposon *piggyBac* vorrangig in Introns (Wilson *et al.*, 2007), während das DNA-Transposon *Sleeping Beauty* und das Ty5-Retrotransposon aus *S. cerevisiae* in Heterochromatin-Bereiche integrieren (Ikeda *et al.*, 2007; Yant *et al.*, 2005; Bushman, 2003). Telomere dienen ebenfalls als Integrationsziele, wie beispielsweise für die Non-LTR-Retrotransposons HeTA und TART von *Drosophila melanogaster* (George *et al.*, 2010). Es gibt aber auch Transposons, welche bevorzugt in genreichen Regionen integrieren ohne dabei ORFs anderer Gene zu zerstören. So integriert das Transposon Tn7 von *E. coli* nur an einer einzigen Stelle des Wirtschromosoms oder in konjugierende Plasmide (Kuduvalli *et al.*, 2001; Wolkow *et al.*, 1996). Das P-Element von *Drosophila melanogaster* integriert innerhalb von 500 Basenpaaren oberhalb des Transkriptionsstartes von Genen (Bellen *et al.*, 2011). Bei den Non-LTR-Retrotransposons R1 und R2 erkennen zum Beispiel sequenzspezifische Endonukleasen spezifische Stellen in der 28S-ribosomalen-DNA (Luan *et al.*, 1993) und initiieren dort die Integration der Retrotransposons (TPRT-Mechanismus). Bei den LTR-Retrotransposons integrieren Ty1 und Ty3 aus *S. cerevisiae* spezifisch oberhalb von RNA-Polymerase III-transkribierten Genen, wie beispielsweise tRNA-Gene. Diese Integration beruht unter anderem auf Interaktionen mit TFIIIB und TFIIIC (Devine & Boeke, 1996; Lesage & Todeschini, 2005; Yieh *et al.*, 2000). Parallel dazu gibt es auch in *D. discoideum* Retrotransposons, die spezifisch oberhalb von tRNA-Genen integrieren. Das Non-LTR-Retrotransposon *tRNA gene-targeted retroelement 5-A* (TRE5-A) integriert wahrscheinlich aufgrund einer Interaktion des ORF1-Proteins mit TFIIIB ca. 48 Basenpaare oberhalb von tRNA-Genen (Chung *et al.*, 2007). Das LTR-Retrotransposon *Dictyostelium gypsy-like transposable element A* (DGLT-A) weist eine Integrationsspezifität von ca. 10-30 Basenpaaren oberhalb von tRNA-Genen auf (Glöckner *et al.*, 2001). In der Nähe von tRNA-Genen gibt es ein Gen-freies Fenster von ca.

800 Basenpaaren Länge. Dies konnte durch Untersuchungen in *S. cerevisiae* ermittelt werden. Durch Integrationen in diesen Bereich kann die Anzahl an Insertionsmutationen verringert werden (Bolton & Boeke, 2003).

### 1.4. Transposons in *D. discoideum*

Das erste transposable Element in *D. discoideum* wurde 1983 beschrieben (Zuker *et al.*, 1983). In den folgenden Jahren wurden weitere mit tRNA-Genen assoziierte transposable Elemente entdeckt (Marschalek *et al.*, 1989, 1992). Durch das Genomprojekt konnte schließlich eine ganze Reihe an transposablen Elementen im Genom von *D. discoideum* identifiziert werden (Glöckner *et al.*, 2001; Eichinger *et al.*, 2005). Das haploide Genom ist dicht gepackt. 65 Prozent des nur 34 Megabasenpaare großen Genoms bestehen aus Genen. Der Bereich zwischen den Genen umfasst im Durchschnitt gerade einmal 1.000 Basenpaare. Umso erstaunlicher ist der mit ca. 10 Prozent relativ große Gehalt an transposablen Elementen (Abb. 1.8; Eichinger *et al.*, 2005).



**Abbildung 1.8. Transposable Elemente des *D. discoideum* Genoms.**

Überblick über die Transposons in *D. discoideum*, unter Angabe der Länge, der Kopienzahl und des prozentualen Anteils im Genom. In den dunklen Boxen sind die Transposons hervorgehoben, die spezifisch in der Nähe von tRNA-Genen integrieren. LTR: *long terminal repeat*; YR: Tyrosin-Rekombinase. Abbildung modifiziert nach Winckler *et al.* (2011).

Die meisten Transposons befinden sich in der Nähe von tRNA-Genen oder als Cluster im Bereich der Zentromere (Winckler *et al.*, 2005).

#### **1.4.1. DNA-Transposons in *D. discoideum***

Die DNA-Transposons von *D. discoideum* werden in drei Gruppen eingeteilt (Winckler *et al.*, 2005; Abb. 1.8).

(1) Das Tdd-4-Element wurde bereits vor dem Genomprojekt beschrieben (Wells *et al.*, 1999). Die ca. 3,8 Kilobasen langen Transposons besitzen invertierte terminale Wiederholungen, welche 145 Basenpaare umfassen. Der ORF ist durch 6 Introns unterbrochen und codiert für ein Protein. Das Protein besitzt vermutlich eine Transposase-Domäne und enthält ein HHCC-Motiv, welches ein Merkmal der Pol-Proteine der LTR-Retrotransposons ist (Winckler *et al.*, 2005). Ein zu Tdd-4 ähnliches Element wurde als Tdd-5 beschrieben (Glöckner *et al.*, 2001). Jedoch fehlen Tdd-5 im Vergleich zu Tdd-4 die letzten beiden Introns. Möglicherweise handelt es sich bei beiden um DNA-Transposons, die eine Integrase-Domäne von LTR-Retrotransposons dazu bekommen haben und so eine Mischung aus beiden Gruppen darstellen (Winckler *et al.*, 2005).

(2) Die 40 Kopien der zweiten Gruppe, der autonomen DDT-Elemente A und B besitzen zwei ORFs und invertierte terminale Wiederholungen, welche 39 Basenpaare lang sind. Die ORF-Proteine haben keine Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Organismen. Das dritte Transposon dieser Gruppe, DDT-S (130 Kopien), ist wahrscheinlich ein nicht-autonomes Derivat eines der beiden anderen Transposons und vermutlich durch Rekombination entstanden (Glöckner *et al.*, 2001; Winckler *et al.*, 2005).

(3) Die mit nur 20 Kopien vorkommende dritte Gruppe, die *Thug*-Elemente, besitzt keine codierenden Sequenzen. Sie sind 2,1 Kilobasen oder 1,1 Kilobasen lang, und werden von 5'-TG...CA-3' gekennzeichneten terminalen Wiederholungen flankiert. Sie weisen keine Ähnlichkeit zu anderen Transposons auf, können aber wahrscheinlich durch andere Transposon-Proteine *in trans* mobilisiert werden (Glöckner *et al.*, 2001; Winckler *et al.*, 2005).

## 1.4.2. LTR-Retrotransposons in *D. discoideum*

### 1.4.2.1. *Skipper*

Das ca. 7 Kilobasen lange LTR-Retrotransposon *Skipper* wird aufgrund von Vergleichen der Reversen Transkriptase zur Ty3/ *gypsy*-Familie zugeordnet (Malik & Eickbush, 2001). Trotz der geringen Anzahl von 60 Kopien wird dieses Element stark exprimiert (Leng *et al.*, 1998; Glöckner *et al.*, 2001). Die beiden flankierenden LTRs sind 390 Basenpaare lang und die beiden ORFs sind im Leserahmen versetzt (Abb. 1.9; Glöckner *et al.*, 2001; Winckler *et al.*, 2005).

### 1.4.2.2. DGLT-P

Das *Dictyostelium gypsy-like* Transposon-P, das zur Familie Ty3/ *gypsy* gehört, ist ca. 6,2 Kilobasen lang und wird von identischen LTRs flankiert, welche 208 Basenpaare lang sind (Abb. 1.9). DGLT-P besteht wahrscheinlich aus vier ORFs. Der erste codiert für ein Gag-ähnliches Protein, der zweite für eine Reverse Transkriptase und endet mit einem Polyadenylierungssignal. Unterhalb der Reversen Transkriptase codiert die Transposon-DNA mit einem separaten Leserahmen für eine Integrase-Domäne. Der vierte ORF codiert für ein unbekanntes Protein, welches ein CX<sub>2</sub>C-X<sub>12</sub>C-X<sub>2</sub>C Zinkfinger-Motiv enthält. Die Zielsequenz-Verdopplungen sind 4 Basenpaare lang (Glöckner *et al.*, 2001; Winckler *et al.*, 2005).

### 1.4.2.3. DGLT-A

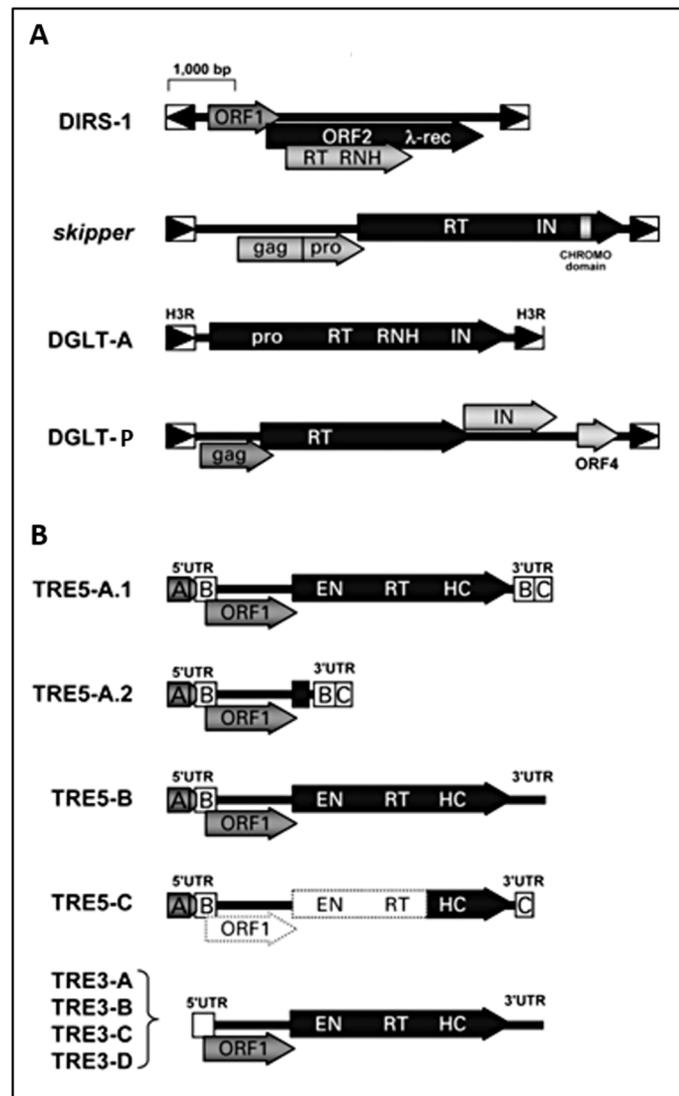
Zu diesem Retrotransposon erfolgt nur eine kurze Einleitung, da es im Ergebnisteil ausführlich beschrieben wird. Das ebenfalls zur Familie Ty3/ *gypsy* gehörende LTR-Retrotransposon DGLT-A ist ca. 5,1 Kilobasenpaare lang und wird von identischen LTR-Sequenzen flankiert, welche 268 Basenpaare lang sind (Abb. 1.9). DGLT-A besteht im Gegensatz zu anderen LTR-Retrotransposons aus nur einem ORF (Abb. 3.16; Glöckner *et al.*, 2001). Die LTRs treten im Genom von *D. discoideum* auch einzeln auf und werden dann Solo-LTR genannt. Diese Solo-LTRs wurden ursprünglich als eigene repetitive Elemente,

als sogenannte *Hind3-repeats* identifiziert und definiert, bevor sie durch das Genomprojekt von *D. discoideum* dem DGLT-A-Retrotransposon zugeordnet werden konnten (Hofmann *et al.*, 1991, Glöckner *et al.*, 2001). Innerhalb des Genoms wurden 15 Solo-LTRs gefunden. Diese entstehen wahrscheinlich aufgrund von Rekombinationsereignissen innerhalb des Retrotransposons (Glöckner *et al.*, 2001). Der ORF codiert für ein Polyprotein mit 1.437 Aminosäuren und die für LTR-Retrotransposons typischen Domänen Gag, Protease, Reverse Transkriptase, Ribonuklease H und Integrase (Winckler *et al.*, 2002, 2005). Der Integrationsort von DGLT-A befindet sich ca. 10-30 Basenpaare oberhalb von tRNA-Genen und ähnelt damit dem Integrationsort von TRE5-A (Marschalek *et al.*, 1989; Hofmann *et al.*, 1991; Winckler, 1998).

### **1.4.3. Das Tyrosin-Rekombinase Retrotransposons DIRS-1 in *D. discoideum***

DIRS-1 ist das mit 235 Kopien am häufigsten vorkommende transposable Element in *D. discoideum* (Glöckner *et al.*, 2001). Da es erhebliche Unterschiede zu anderen Retrotransposons aufweist, bildet es eine eigene Gruppe, die der Tyrosin-Rekombinase Retrotransposons (YR-Retrotransposons). Es besitzt nicht identische LTR-ähnliche Strukturen, welche entgegengesetzt orientiert sind. Des Weiteren sind diese nicht durch die für LTR-Retrotransposons typischen 5'-TG...CA-3' Dinukleotide gekennzeichnet. Komplette DIRS-1-Retrotransposons sind 4,8 Kilobasenpaare lang und besitzen zwei ORFs, die sich partiell überlappen. Zusätzlich wird eine Reverse Transkriptase/ Ribonuklease H-Domäne durch einen eigenen Leserahmen codiert, welcher von ORF2 überlappt wird (Abb. 1.9; Winckler *et al.*, 2005; Cappello *et al.*, 1985). DIRS-1 codiert nicht für eine Protease- und nicht für eine konservierte retrovirale Integrase-Domäne, sondern enthält in ORF2 eine Protein-Domäne, die Tyrosin-Rekombinase, die Ähnlichkeiten zur Bakteriophagen  $\lambda$ -Integrase aufweist (Goodwin & Poulter, 2001). DIRS-1 bildet wahrscheinlich zirkuläre Doppelstrang-DNA-Intermediate und transponiert nicht über den typischen LTR-Retrotranspositionsmechanismus (Goodwin & Poulter, 2001; Poulter & Goodwin, 2005). Es kommt daher auch nicht zur Ausbildung von Zielsequenz-Verdopplungen. DIRS-1-Transposons haben ihre eigenen Kopien als Integrationspräferenz

entwickelt. Sie bilden dadurch große Cluster in chromosomalen Regionen, welche vermutlich als Zentromere fungieren (Eichinger *et al.*, 2005; Glöckner & Heidel, 2009).



**Abbildung 1.9. Strukturen der Retrotransposons in *D. discoideum*.**

(A) Darstellung der LTR- und YR-Retrotransposons, sowie (B) der Non-LTR-Retrotransposons. Die Orientierung der LTR-Sequenzen ist durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet. gag: *gene specific antigen*; pro: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; λ-rec: Tyrosin-Rekombinase; CHROMO: *chromatin organizer*-Domäne; EN: Endonuklease; HC: Histidin- und Cystein- reiche Domäne; A, B, C: Module der untranslatierten Regionen; ORF: offener Leserahmen. Abbildung aus Winckler *et al.* (2005).

#### 1.4.4. Non-LTR-Retrotransposons in *D. discoideum*

Innerhalb des *D. discoideum* Genoms gibt es eine Familie von sieben Non-LTR-Retrotransposons, die TREs genannt werden und nach ihrer Integrationspräferenz in der Nähe von tRNA-Genen eingeteilt sind. Die TRE5-Retrotransposons integrieren oberhalb (5'), während die TRE3-Retrotransposons unterhalb (3') von tRNA-Genen integrieren (Winckler *et al.*, 2002, 2005). Als Erstes wurde TRE5-A beschrieben (Marschalk *et al.*, 1989), welches das am besten untersuchteste TRE-Retrotransposon in *D. discoideum* ist (Hofmann *et al.*, 1991; Schumann *et al.*, 1994; Siol *et al.*, 2011). Das erste TRE3-Retrotransposon (TRE3-A) konnte 1998 beschrieben werden (Winckler *et al.*, 1998). Durch das Genomprojekt wurden dann weitere Mitglieder der TRE-Familie entdeckt (Abb. 1.9; Glöckner *et al.*, 2001).

Ein wichtiges Merkmal der TRE-Retrotransposons ist die modularisierte Struktur der untranslatierten Regionen (Abb. 1.9 B). Das A-Modul besitzt eine Promotoraktivität und initiiert die Transkription des kompletten Retrotransposons ab der ersten Base (Schumann *et al.*, 1994). Die A-Module von TRE5-A und TRE5-B sind fast identisch und damit gut konserviert und können in mehreren Kopien (bis 7) vorliegen (Winckler *et al.*, 2005). Das B-Modul der TRE5-Retrotransposons dient als Translationsstart des ORF1-Proteins und ist analog zu der untranslatierten Region am 5'-Ende der TRE3-Retrotransposons lokalisiert (Winckler *et al.*, 2005). Das C-Modul am 3'-Ende besitzt eine Promotoraktivität zur Bildung der *antisense*-mRNA (Schumann *et al.*, 1994). TREs erzeugen bei ihrer Integration Zielsequenz-Verdopplungen, welche 12-16 Basenpaare lang sind. Alle TRE-Retrotransposons integrieren etwa 48 Basenpaare oberhalb oder etwa 100 Basenpaare unterhalb von tRNA-Genen (hinter der B-Box). Dies erfolgt orientierungsspezifisch mit dem 5'-Ende in Richtung der tRNA-Gene (Beck *et al.*, 2002; Winckler *et al.*, 2002). tRNA-Gene können für mehrere TRE-Retrotransposons als Integrationsziel dienen (TRE-Tandems), wobei TREs nicht in schon vorhandene Kopien integrieren (Winckler *et al.*, 2002, 2005). 54 Prozent der vorhandenen 390 tRNA-Gene in *D. discoideum* sind mit TREs assoziiert (Winckler *et al.*, 2005). Allerdings zeigen TREs keine Präferenz für bestimmte tRNA-Gene.

#### 1.4.4.1. TRE5-A

TRE5-A.1 ist 5,7 Kilobasenpaare lang und besitzt zwei ORFs, die sich um 22 Basenpaare überlappen (Marschalek *et al.*, 1992). ORF1 codiert für ein 51 kDa großes Protein (Hentschel *et al.*, 2001). ORF2 codiert für drei Proteine, welche Ähnlichkeiten mit Reversen Transkriptasen, Endonukleasen und Histidin-/ Cystein-reichen Domänen anderer LTR-Retrotransposons aufweisen (Malik *et al.*, 1999). Endonuklease-Domänen bilden durch den Schnitt der Ziel-DNA eine freie 3'OH-Gruppe als *Primer* für die reverse Transkription und Histidin-/ Cystein-reiche Domänen stellen Bindedomänen für Nukleinsäuren dar (Han, 2010). Da TRE5-A.1 beide ORFs aufweist, ist es autonom. Durch die Promotorfunktionen des A- und C-Moduls werden Plus- und Minusstrang-RNA des Retrotransposons gebildet (Winckler *et al.*, 2005). Nach der Retrotransposition sind viele neue Kopien der TRE5-A-Retrotransposons am 5'-Ende deletiert und können nicht weiter mobilisiert werden, da sie keinen funktionellen Promotor mehr besitzen (Beck *et al.*, 2002; Winckler *et al.*, 2005).

Zwischen den TRE5-As gibt es strukturelle Unterschiede (Abb. 1.9). Das etwa 2,6 Kilobasenpaare große TRE5-A.2 ist durch eine große Deletion in ORF2 gekennzeichnet. Dadurch ist TRE5-A.2 nicht autonom und muss durch TRE5-A.1-Proteine *in trans* mobilisiert werden (Winckler *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2002; Siol *et al.*, 2006). Zusätzlich besitzt TRE5-A.2 eine Deletion in der B- und C-Modul Sequenz, so dass nur noch die 87 Basenpaare am 3'-Ende des C-Moduls intakt sind. Diese scheinen für die Retrotransposition essentiell zu sein (Siol *et al.*, 2011). TRE5-A.3 besteht nur aus einem A-, B- und C-Modul und ist wahrscheinlich durch eine interne Rekombination zwischen den B-Modulen entstanden. Dabei wurden ORF1 und ORF2 deletiert. Eine Retrotransposition dieser TREs findet wahrscheinlich nicht mehr statt (Winckler *et al.*, 2002).

Ähnlich dem humanen L1-Element kommt es wahrscheinlich zur Ausbildung eines Präintegrationskomplexes (Ribonukleoprotein-Komplex), bestehend aus der TRE5-A-RNA und den Proteinen von ORF1 und ORF2 (Kulpa & Moran, 2006). Analog der Ty1- und Ty3-Retrotransposons in *S. cerevisiae* erfolgt die Zielfindung des Präintegrationskomplexes von TRE5-A wahrscheinlich durch Protein-Interaktionen des ORF1-Proteins mit TFIIB des RNA-Polymerase III-Komplexes. Dabei bindet TFIIC mindestens an die interne B-Box eines

tRNA-Gens und rekrutiert TFIIIB. Dadurch ist die DNA bis ca. 50 Basenpaare oberhalb des tRNA-Gens verdeckt (Beck *et al.*, 2002; Siol *et al.*, 2006). Der Präintegrationskomplex von TRE5-A bindet nun wahrscheinlich an die Untereinheiten von TFIIIB und findet so seinen Integrationsort. Durch *in vitro*-Experimente konnten Protein-Interaktionen zwischen ORF1 und den TFIIIB-Untereinheiten TBP, Brf1 und Bdp1 gezeigt werden (Chung *et al.*, 2007). TBP bindet wahrscheinlich an den C-Terminus von ORF1. Durch Punktmutationen in der Helix H2' des TBP-Proteins wird die Interaktion mit ORF1 teilweise (S195A) bzw. ganz (S195K) aufgehoben (Chung *et al.*, 2007). Die Aminosäure Lysin stellt den bedeutendsten Unterschied zwischen der Helix H2' des humanen TBP (Lysin) zum TBP von *D. discoideum* (Serin) dar. Der Präintegrationskomplex von TRE5-A findet sein Integrationsziel somit hauptsächlich über die Protein-Interaktion zwischen ORF1 und TBP (Chung *et al.*, 2007). Mittels genetisch markierter nicht-autonomer TRE5-A-Retrotransposons konnte eine *in trans*-Mobilisierung durch ORF2-Proteine endogener TRE5-A-Retrotransposons *in vivo* nachgewiesen werden. Das ORF1-Protein besitzt vermutlich eine *cis*-Präferenz für seine eigene RNA, da das artifizielle nicht-autonome TRE5-A-Retrotransposon ohne eigenen ORF1 nicht durch endogene ORF1- und ORF2-Proteine *in trans* mobilisiert wird (Siol *et al.*, 2011). Des Weiteren ist das A-Modul *per se* nicht essentiell für die Retrotransposition von TRE5-A *in vivo*, da dieses durch den Aktin-6-Promotor von *D. discoideum* ersetzt werden kann. Der Aktin-6-Promotor führt sogar zu einer Erhöhung der Retrotranspositionsaktivität (Siol *et al.*, 2011). Das C-Modul von TRE5-A ist für die Retrotransposition notwendig. So führt ein Austausch des C-Moduls gegen den Aktin-8-Terminator und Basenaustausche in der Sequenz des C-Moduls zum vollständigen bzw. fast kompletten Verlust der Retrotranspositionsaktivität. Eine intakte Sekundärstruktur des C-Moduls bzw. der untranslatierten Region des 3'-Endes scheint somit für die Retrotransposition essentiell zu sein (Siol *et al.*, 2011).

#### **1.4.4.2. TRE5-B und TRE5-C**

Die TRE5-B-Retrotransposons haben den gleichen strukturellen Aufbau wie die TRE5-A-Retrotransposons, jedoch fehlt ihnen das B- und C-Modul der untranslatierten Region des 3'-Endes (Abb. 1.9; Szafranski *et al.*, 2002). TRE5-B stimmt in seiner Integrationspräferenz mit TRE5-A überein. *In vitro* zeigt ORF1 (25 % der Aminosäuresequenz identisch mit TRE5-

A) eine Protein-Interaktion mit der TFIIIB-Untereinheit TBP und interessanterweise mit Bdp1. TRE5-B findet somit sein Integrationsziel ähnlich wie TRE5-A (Chung *et al.*, 2007). Alle TRE5-C-Retrotransposons sind am 5'-Ende stark verkürzt, enthalten in der untranslatierten Region des 5'-Endes aber dennoch ein A- und B-Modul. Des Weiteren besitzen sie wahrscheinlich zwei partiell überlappende ORFs und in der untranslatierten Region des 3'-Endes ein C-Modul (Abb. 1.9; Winckler *et al.*, 2002).

#### **1.4.4.3. TRE3-Gruppe**

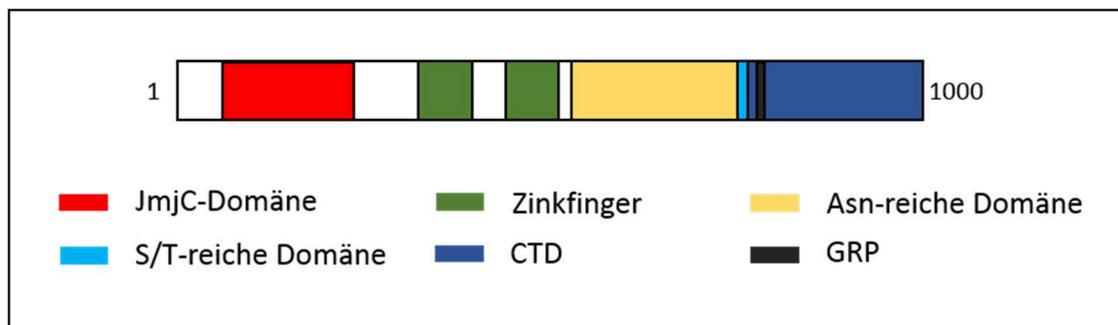
Die TRE3-Retrotransposons sind ca. 5 Kilobasenpaare lang und durch zwei ORFs gekennzeichnet, welche durch untranslatierte Regionen flankiert werden (Abb. 1.9). Die untranslatierten Regionen entscheiden sich deutlich voneinander. Am Ende der untranslatierten Region des 3'-Endes befindet sich ein bis zu 70 Basenpaare langer poly(dA)-Anhang. Die untranslatierte Region des 5'-Endes von TRE3-A besitzt eine schwache Promotoraktivität (Winckler *et al.*, 1998, 2002). Zielsequenz-Verdopplungen sind zwischen 14 und 40 Basenpaare lang und kommen im Gegensatz zu TRE3-C und TRE3-D nicht bei allen Kopien der TRE3-A- und TRE3-B-Retrotransposons vor (Winckler *et al.*, 2002). Alle TRE3-Retrotransposons integrieren im Durchschnitt ca. 100 Basenpaare unterhalb einer B-Box oder einer externen B-Box von tRNA-Genen (Szafranski *et al.*, 1999). TFIIIC des RNA-Polymerase III-Komplexes bindet an die B-Boxen von tRNA-Genen in *D. discoideum* (Bukenberg *et al.*, 1994). Daher wird vermutet, dass die Integrationsspezifität der TRE3-Retrotransposons auf Interaktionen zwischen TRE3-Proteinen und TFIIIC beruht (Winckler *et al.*, 2005).

### **1.5. Der C-Modul bindende Faktor A aus *D. discoideum***

Der C-Modul bindende Faktor A (CbfA, CMBF-Protein) aus *D. discoideum* wurde bei der Suche nach Regulatoren des C-Moduls des Retrotransposons TRE5-A entdeckt. Der Name CMBF wurde an die gebräuchliche Nomenklatur für Gene angepasst und in CbfA umbenannt (Winckler *et al.*, 2004). Das C-Modul am 3'-Ende des Retrotransposons TRE5-A besitzt Promotoraktivität für die Synthese der Minusstrang-RNA (Geier *et al.*, 1996; Horn

*et al.*, 1999). Innerhalb des C-Moduls von TRE5-A existieren zwei CbfA-Bindestellen, die durch poly(dT)-Bereiche gekennzeichnet sind (Geier *et al.*, 1996). Allerdings ist die CbfA-Erkennung eher von einer spezifischen Konformation, als von der Sequenz der Ziel-DNA abhängig (Horn *et al.*, 1999).

Das *cbfA*-Gen von *D. discoideum* befindet sich auf Chromosom 3 und codiert mit seinen 1.000 Aminosäuren für ein 115 kDa großes Protein. Das CbfA-Protein weist mehrere charakteristische Domänen auf (Abb. 1.10) (Winckler *et al.*, 2004).



**Abbildung 1.10. Die Proteinstruktur von CbfA.**

Darstellung der einzelnen Domänen und Motive in der Proteinstruktur von CbfA. JmjC: Jumonji-Domäne; S/T-reiche Domäne: Serin/ Threonin-reiche Domäne; CTD: C-terminale Domäne; GRP: AT-Haken, bestehend aus dem zentralen Tripeptidmotiv Glycin, Arginin, Prolin.

(1) Von Aminosäure 113-280 erstreckt sich eine Jumonji-Domäne, welche aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Jumonji-Domäne des Jumonji-Proteins der Maus entdeckt wurde. (Clissold & Ponting, 2001; Takeuchi *et al.*, 1995). Die Jumonji-Domäne hat möglicherweise einen Einfluss auf die Regulation der Chromatin-Struktur bzw. auf die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen im Chromatin-*Remodeling*-Komplex (Clissold & Ponting, 2001; Tronnorsjö *et al.*, 2007). So sind Jumonji-Domänen enthaltende Proteine bei der Demethylierung bestimmter Aminogruppen in Histonen beteiligt (Tsukada *et al.*, 2006; Trewick *et al.*, 2005).

(2) Zwei Zinkfinger-Motive (Aminosäure 373-414/ 492-550) befinden sich hinter der Jumonji-Domäne (Horn *et al.*, 1999). Zinkfinger sind in eukaryotischen Proteinen weit verbreitete Motive, deren Struktur durch die Bindung eines Zinkions stabilisiert wird. Die Zinkfinger-Motive werden in 20 Gruppen eingeteilt, wobei die häufigste durch eine  $Cis_2His_2$ -Struktur (Cys-Xn-Cys-Xn-His-Xn-His) gekennzeichnet ist (Wolfe *et al.*, 2000; Babu

*et al.*, 2006; Krishna *et al.*, 2003). Diese Motive können in Gruppen hintereinander angeordnet sein. Ursprünglich wurden Zinkfinger-Motive als DNA-Bindedomäne von Transkriptionsfaktoren (besonders TFIIIA) beschrieben, sind aber mittlerweile auch als RNA- und Protein-Bindemotive bekannt (Brown, 2005; Brayer & Segal, 2008; Gamsjaeger *et al.*, 2007). Die Zinkfinger-Motive von CbfA können keiner der 20 Gruppen zugeordnet werden. Zinkfinger 1 besteht aus 8 Cysteinen und 3 Histidinen in einem Bereich von 44 Aminosäuren und Zinkfinger 2 enthält 11 Cysteine und ein Histidin in einem Bereich von 59 Aminosäuren. Dadurch ergibt sich eine gewisse Ähnlichkeit von Zinkfinger 2 zum *plant homeo domain*-Typ von kernständigen Proteinen, welche an der Regulation der Transkription durch eine Bindung an Nukleosomen beteiligt sind (Bienz, 2006; Sanchez & Zhou, 2011). Es wird vermutet, dass die Zinkfinger-Motive von CbfA aufgrund ihrer DNA-bindenden Eigenschaften für die Bindung von CbfA an das C-Modul von TRE5-A zuständig sind (Horn *et al.*, 1999).

(3) Die Asparagin-reiche-Domäne von Aminosäure 574 bis 769 besteht zu mehr als 50 Prozent aus Asparagin und trennt die Zinkfinger von der C-terminalen Domäne. Die Asparagine, welche von Serin-reichen Abschnitten unterbrochen werden, sind in drei fast homopolymeren Abschnitten angeordnet. Anhäufungen bestimmter Aminosäuren sind in vielen Proteinen zu finden und wahrscheinlich wichtig für die Bildung der nativen Proteinstruktur und zur Bindung von mRNA und anderen Proteinen (Methot *et al.*, 1996; Wootton & Federhen, 1996).

(4) Der C-terminale Abschnitt von CbfA, dessen C-terminale Domäne (CTD), hat eine Länge von 280 Aminosäuren und besitzt einen sogenannten AT-Haken. AT-Haken vermitteln DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen, die Einfluss auf die Chromatinstruktur und auf die Regulation der Transkription haben (Reeves, 2001; Reeves & Beckerbauer, 2001). Der AT-Haken der CTD zeichnet sich durch das Tripeptid GRP (Glycin, Arginin, Prolin) aus. Das zentrale Arginin scheint dabei essentiell für die Bindung an die kleine Furche der DNA zu sein, wodurch der AT-Haken eine entscheidende Bedeutung an der Bindung von CbfA an das C-Modul von TRE5-A hat (Horn *et al.*, 1999). Die CTD von CbfA besitzt unabhängig von Gesamt-CbfA genregulatorische Eigenschaften und kann die Transkriptmenge des Retrotransposons TRE5-A beeinflussen (Lucas *et al.*, 2009; Schmith *et al.*, 2013).

Für Untersuchungen der Funktion des *cbfA*-Gens wurde der CbfA-Suppressionsstamm JH.D aus AX2 entwickelt (Winckler *et al.*, 2001). Hierzu wurde ein *amber*-Stopp-Codon (UAG), sowie das *amber*-Suppressor-tRNA-Gen (*glu(su)*) inklusive eines Blasticidin-Resistenzgens verwendet. Durch homologe Rekombination wurde das Konstrukt als *knock-in* in das *cbfA*-Gen des Stammes AX2 eingeführt. Dadurch wurde ein Großteil des *cbfA*-Gens in 3'-Richtung verschoben. Es entstanden in der Mutante JH.D zwei Kopien des *cbfA*-Gens, eine mit dem *amber*-Stopp-Codon und eine am 5'-Ende verkürzte Variante, die nicht exprimiert wird (Winckler *et al.*, 2001). Da die Translation meist am *amber*-Stopp-Codon abbricht, wird zu ca. 80-95 Prozent ein C-terminal verkürztes Protein produziert. Zu 5-20 Prozent kommt es zur Erkennung des *amber*-Stopp-Codons durch die *amber*-Suppressor-tRNA, zum Einbau von Glutaminsäure und somit zur vollständigen Bildung von CbfA (Winckler *et al.*, 2001). Die geringe Expression von CbfA verändert den Phänotyp der Zellen. So haben die JH.D-Zellen im Vergleich zum natürlichen Stamm AX2 ein größeres Zellvolumen (30-50 %), was auf einer erhöhten Pinocytoserate (133 %) beruht, sowie eine langsamere Wachstums- und Phagozytoserate (Winckler *et al.*, 2001). CbfA hat darüber hinaus einen großen Einfluss auf die multizelluläre Entwicklung. So zeigt der Stamm JH.D Entwicklungsdefekte, die sich in einer längeren Entwicklungsdauer und kleineren Fruchtkörpern widerspiegeln (Winckler *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2002). Diese Entwicklungsdefekte beruhen auf dem Einfluss von CbfA auf cAMP-induzierte Gene. Durch Zugabe von cAMP oder die Expression von Gesamt-CbfA in den CbfA-supprimierten JH.D-Zellen, können diese Entwicklungsdefekte aufgehoben werden. Eine Expression der CTD alleine zeigt keine Effekte (Winckler *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2009). Eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Genen durch CbfA spielt dessen CTD (Lucas *et al.*, 2009; Schmith *et al.*, 2013). Die Regulation scheint durch die Bindung an AT-reiche DNA-Abschnitte zu erfolgen (Winckler *et al.*, 2004; Schmith *et al.*, 2013).

Die Transkriptmenge (Plus- und Minusstrang-RNA) des Retrotransposons TRE5-A ist in der Suppressionsmutante JH.D stark verringert und lässt sich durch zusätzliche Expression von CbfA oder dessen CTD alleine regulieren (Lucas *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in JH.D stark reduziert (Beck *et al.*, 2002; Bilzer *et al.*, 2011). Diese lässt sich allerdings nur durch eine Expression von Gesamt-CbfA wieder erhöhen, nicht aber durch alleinige Expression der CTD (Bilzer *et al.*, 2011). Einen Einfluss

auf die Promotoraktivität des A- und C-Moduls des Retrotransposons TRE5-A scheint CbfA nicht zu haben (Bilzer *et al.*, 2011).

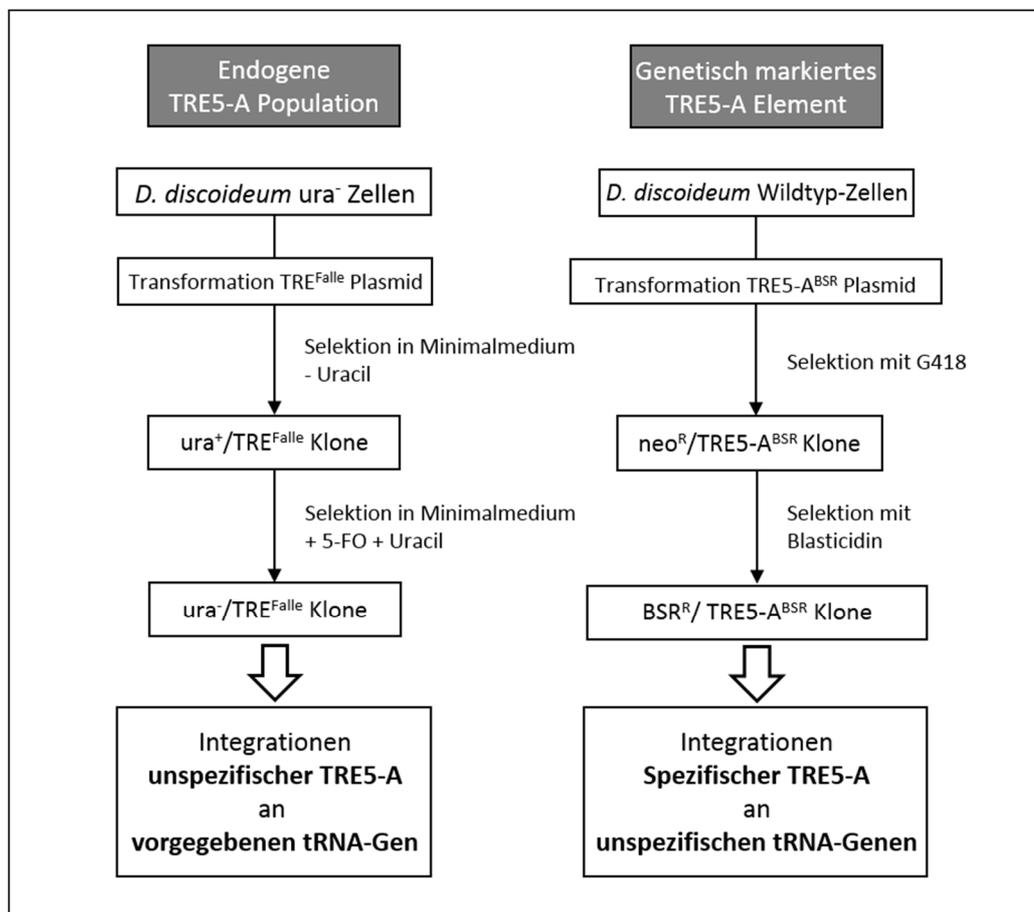
## 1.6. Retrotranspositions-Testsysteme in *D. discoideum*

Für Untersuchungen zur Mobilisierung des Retrotransposons TRE5-A wurden zwei Retrotranspositionsexperimente entwickelt, die auf (1) endogenen TRE5-A (Beck *et al.*, 2002; Siol *et al.*, 2006) oder (2) artifiziellen genetisch markierten TRE5-A beruhen (Siol *et al.*, 2011).

(1) Um Retrotranspositionereignisse endogener TRE5-A-Retrotransposons an bestimmten tRNA-Loci zu untersuchen, wurde die „TRE-Falle“ entwickelt (Beck *et al.*, 2002; Siol *et al.*, 2006; Abb. 1.11). Dieses Experiment kann nur in *D. discoideum*-Stämmen durchgeführt werden, die Uracil auxotroph (*ura*<sup>-</sup>) sind und somit kein Uracil bilden können. Die Plasmide der TRE-Falle enthalten ein Uridinmonophosphat-Synthase (UMPS)-Gen. Innerhalb eines Introns im UMPS-Gen befindet sich ein tRNA-Gen, welches für Val<sup>UAC</sup> codiert. Dieses Intron (inkl. des tRNA-Gens) wird funktionell herausgespleißt. Die Zellen können über ihren Stoffwechsel Uracil bilden und sind somit *ura*<sup>+</sup>. Eine Selektion dieser Zellen mit 5-Fluoroorotat (5-FO) führt zum Tod der Zelle, da die UMP-Synthase 5-FO in 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat umwandelt. Dies ist ein irreversibler Inhibitor der Thymidylat-Synthase, weshalb Desoxy-Thymidinmonophosphat nicht mehr gebildet werden kann. Im Falle einer Integration eines endogenen Retrotransposons in die Nähe dieses Köder-tRNA-Gens wird das UMPS-Gen zerstört und die Zelle kann keine UMP-Synthase mehr exprimieren (*ura*<sup>-</sup>). Führt man mit diesen Zellen eine Selektion mit 5-FO durch, entsteht aus 5-FO kein toxisches 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat. Die Zellen können so unter Zusatz von Uracil überleben und bilden Klone, mit einem Integrationsereignis eines endogenen Retrotransposons.

(2) Zur Untersuchung der Retrotransposition an endogenen tRNA-Genen wurde ein System mit artifiziellen genetisch markierten TRE5-A-Retrotransposons entwickelt (Siol *et al.*, 2011; Abb. 1.11). Die artifiziellen Retrotransposons (TRE5-A<sup>BSR</sup>) enthalten oberhalb der untranslatierten Region des 3'-Endes einen Blasticidin-Resistenzmarker (*mbsrI*) in reverser Richtung zur Transkriptionsrichtung des ORF1 des Retrotransposons. Innerhalb

des *mbsrl*-Gens befindet sich ein Intron in der gleichen Orientierung des Retrotransposons. Das *mbsrl*-Gen kann somit nicht funktionell gespleißt und exprimiert werden. Durch die Transkription des artifiziellen Retrotransposons wird das Intron herausgespleißt. Nach Integration des genetisch markierten Retrotransposons in das Genom der Wirtszelle wird das *mbsrl*-Gen wieder funktionell exprimiert. Es entstehen Blasticidin-resistente Klone, welche für weitere Untersuchungen verwendet werden können. Diese artifiziellen, mit dem Blasticidin-Resistenzmarker (*mbsrl*) markierten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons sind nicht autonom. Sie besitzen keinen ORF2 und sind auf die ORF2-Proteine der endogenen TRE5-A-Retrotransposons angewiesen, um *in trans* mobilisiert zu werden (Siol *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.11. Übersicht der Retrotranspositionssysteme in *D. discoideum*.**

Retrotranspositionssystem mit der „TRE-Falle“ (links) und Retrotranspositionssystem mit genetisch markierten Retrotransposons (rechts). *ura*: Uracil auxotroph; *ura*<sup>+</sup>: Uracil-Bildung; 5-FO: 5-Fluoroorotat; BSR: Blasticidin; neo: Neomycin (G418); <sup>R</sup>: resistent; TRE5-A<sup>BSR</sup>: mit Blasticidin-Resistenzmarker markierte TRE5-A-Retrotransposons. Abbildung modifiziert nach Winckler *et al.* (2011).

Zur Steigerung der Retrotranspositionsfrequenz der artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons wurde der interne Promotor (A-Modul) gegen den stärkeren Aktin-6-Promotor von *D. discoideum* ausgetauscht (Siol *et al.*, 2011).

## 1.7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das haploide Genom von *D. discoideum* besteht zu etwa zwei Dritteln aus codierenden Regionen. Die intergenischen Bereiche sind mit durchschnittlich 1.000 Basenpaaren sehr klein. Insertionsmutagenesen der DNA durch Transposon-Integrationen erscheinen daher aufgrund der kompakten Genomstruktur als sehr wahrscheinlich. Die beiden Retrotransposons TRE5-A und DGLT-A aus *D. discoideum* integrieren positionsspezifisch oberhalb von tRNA-Genen. Als Arbeitshypothese dieser Arbeit wurde angenommen, dass durch diese Integrationspezifität Insertionsmutagenesen im Genom von *D. discoideum* vermieden werden. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte des molekularen Mechanismus der Erkennung von tRNA-Genen durch die beiden Retrotransposons untersucht werden.

*In vitro*-Experimente legen nahe, dass die Integrationspezifität des Retrotransposons TRE5-A aus einer Protein-Interaktion des ORF1-Proteins von TRE5-A mit der Untereinheit TBP von TFIIB resultiert. Daher sollte in dieser Arbeit ein *in vivo*-Testsystem etabliert werden, mit dem die für die Zielerkennung relevanten Protein-Interaktionen zwischen Retrotransposons und Wirtsproteinen charakterisiert werden können. Nach bioinformatischen Analysen bildet die TRE5-A-RNA am 3'-Ende eine Sekundärstruktur aus. Die Relevanz dieser Sekundärstruktur sollte anhand eines *in vivo*-Retrotranspositionsmodells betrachtet werden. Des Weiteren sollten strukturelle, für die Retrotransposition von TRE5-A relevante Merkmale untersucht werden.

Das Retrotransposon DGLT-A weist einen ähnlichen Integrationsort wie TRE5-A auf. Es wird daher ein zu TRE5-A ähnlicher Mechanismus für die Erkennung des Integrationsortes diskutiert. Als Ziel dieser Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der Erkennung von tRNA-Genen durch DGLT-A untersucht werden. Analog zu den Erkenntnissen über TRE5-A wird davon ausgegangen, dass Protein-Interaktionen zwischen DGLT-A codierten Proteinen und Untereinheiten von TFIIB oder TFIIC die tRNA-Gen-Erkennung vermitteln.

Daher sollten potentielle Protein-Interaktionen analysiert werden. Um darüber hinaus die Relevanz solcher Protein-Interaktionen untersuchen zu können, sollte ein *in vivo*-Retrotranspositionstest mit klonierten DGLT-A-Retrotransposons etabliert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Laborgeräte

Im Folgenden werden nur Geräte aufgeführt, die nicht der Standardlaborausstattung entsprechen.

**Tabelle 2.1. Verwendete Geräte.**

Geräte	Hersteller
Elektrophoresen:	<i>PerfectBlue</i> Gelsystem Mini (Peqlab) <i>PerfectBlue</i> Doppelgelsystem Twin M/ L (Peqlab)
Elektroporator:	<i>Gene Pulser Xcell</i> mit <i>ShockPod</i> (BioRad)
Geldokumentation:	<i>Gel Jet Imager 2004</i> (Intas)
Inkubationsschränke:	TS606-G/4-i (WTW) B20 (Heraeus)
Inkubationsschüttler:	Multitron 2 HAT-Infors (Infors)
Lichtmikroskope:	Binokular-Mikroskop SZX9 (Olympus) Mikroskop CXX 41 (Olympus)
<i>Real-Time</i> -PCR-System:	Mx3000P (Stratagene)
Reinstwasseranlagen:	Seradest SD 2800 (SERAL) Serapur Delta (SERAL)
Sterilwerkbank:	MRF-B (Steag)
Thermocycler:	Primus 96 <i>advanced</i> (Peqlab)
Ultraschallhomogenisator:	Labsonic (B. Braun, Sartorius)
UV/VIS-Spektrometer:	BioPhotometer (Eppendorf)
Western Blot Apparatur:	<i>PerfectBlue Semi-Dry Electroblotter</i> SEDEK M (Peqlab)
Zellzählsystem:	CASY-Zellzähler Modell DT (Innovatis, Schärfe System)
Zentrifugalevaporator:	Concentrator 5301 (Eppendorf)

Zentrifugen:	Centrifuge 5810 R (Eppendorf)
	Centrifuge 5702 (Eppendorf)
	Centrifuge 5415 D/ 5424 (Eppendorf)
	Centrifuge 5417 R (Eppendorf)
	Rotina 420 R (Hettich)
	Avanti J-E (Beckmann Coulter)

---

### 2.1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad „pro analysis“ auf und wurden von den Firmen BD Biosciences, Fluka, Invitrogen, Merck, Carl-Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen. Besonders wichtige Chemikalien sind im Einzelnen nachfolgend aufgelistet.

**Tabelle 2.2. Verwendete Chemikalien.**

Chemikalien /Chemikaliengemische	Hersteller/ Lieferant
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth
2-(N-morpholino)ethanesulfonic Säure (MES)	Serva
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (X- $\alpha$ -Gal)	Clontech
Acrylamid-Bis 30 % (37,5:1)	Merck
Adenin Hemisulfat	Sigma
Agar-Agar	Roth
Agarose (peqGold Universal –Agarose)	Peqlab
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Bacto-Pepton	BD Biosciences
<i>Bovine</i> Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Roth
Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)	Roth
D-Glucose-Monohydrat	Roth
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
EvaGreen TM Fluorescent DNA Stain	Jena Bioscience

FM-Medium	ForMedium
Glycerin 86 %	Roth
Hefe-Dropout: Leu <sup>-</sup> /Trp <sup>-</sup> /Ade <sup>-</sup> /His <sup>-</sup> DO Supplement	Clontech
Hefe-Dropout: Leu <sup>-</sup> /Trp <sup>-</sup> DO Supplement	Clontech
Hefeextrakt	Serva
Hefeminimalmedium: Minimal SD Base	Clontech
HL5 Medium	ForMedium
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Laemmli-Puffer (2x)	Sigma
Lysozym	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin (Bicin)	Roth
NP40	Roth
Pepton	Roth
Polyethylenglykol (PEG) 1000, 8000	Roth
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Proteaseinhibitoren ( <i>complete EDTA-free Protease Inhibitor cocktail tablets</i> )	Roche
ROX Reference Dye	Jena Bioscience
Sammelgel-Puffer	BDH
Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Trenngel-Puffer	Applichem
Tris-Puffer	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypton	Serva
Tween 20	Roth

### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.3. Verbrauchsmaterialien.**

	Hersteller/ Lieferant
CL-Xposure® Film	Thermo Scientific
Elektroporationsküvetten (1 mm, 2 mm)	Peqlab
Film-Entwickler GBX	Kodak
Film-Fixierer GBX	Kodak
Filterpapier 3 MM	Whatman
Mikrotiterplatten (24 Nöpfchen)	Greiner

Ni-NTA Agarose	Quiagen
Ni-NTA magnetische Agarose Kügelchen	Quiagen
Nitrozellulose-Membran Protran BA 85	Whatman
Petrischalen	Greiner, Nunc
Pierce Glutathione magnetische Kügelchen	Thermo Scientific
Pipettenspitzen, unsteril	Greiner
Reaktionsgefäße	Greiner
Rotilabo® Spritzenfilter steril 0,22 µm	Roth
Vakuum Filter System	Renner GmbH

---

## 2.1.4. Kits

**Tabelle 2.4. Verwendete Kits.**

	Hersteller/ Lieferant
ECL® <i>Advance Western Blotting Detection</i> -Kit	GE Healthcare
<i>Gateway</i> ® LR Clonase® II <i>Enzyme mix</i>	Invitrogen
<i>High Fidelity</i> Polymerase Kit	Jena Bioscience
Omniscript <i>Reverse Transcription</i> Kit	Qiagen
pCR®8/GW/TOPO® TA <i>Cloning</i> Kit	Invitrogen
pGEM-T® Vector System	Promega
QIAquick® Gelextraktions-Kit	Qiagen
QIAquick® PCR-Aufreinigungs-Kit	Qiagen
RNase-Free DNase-Set	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
StarGate® <i>Transfer Reagent Set</i> (pKOSG-IBA-Dicty1)	IBA GmbH
Taq Pol Kit	Jena Bioscience

---

## 2.1.5. Enzyme

**Tabelle 2.5. Verwendete Enzyme.**

	Hersteller/ Lieferant
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
<i>Calf Intestinal Alkaline</i> Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Proteinase K	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs

RNase A	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Fermentas und Invitrogen
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
T7-DNA-Polymerase	New England BioLabs

### 2.1.6. Größenstandards

**Tabelle 2.6. Verwendete Größenstandards.**

	Hersteller/ Lieferant
DNA-Größenstandard pUC19 BsiSI (HpaII)	Jena Bioscience
DNA- Größenstandard Lambda DNA/ PstI	Fermentas
<i>Low Range DNA Ladder</i> (50 bp-1 kb)	Jena Bioscience
<i>Mid Range DNA Ladder</i> (100 bp – 3kb)	Jena Bioscience
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas

### 2.1.7. Medien, Antibiotika und Additiva

**Tabelle 2.7. Antibiotika und ihre eingesetzten Konzentrationen.**

	eingesetzte Konzentration	Hersteller/ Lieferant
Ampicillin	100 µg/ml	Roth
Kanamycin	30-50 µg/ml	Serva
Blasticidin S	5-10 µg/ml	Invitrogen
Geneticin Disulfat (G418)	5-10 µg/ml	Calbiochem
Spectinomycin	100 µg/ml	Sigma
Hygromycin	18,5-35 µg/ml	Roth

LB-Medium/ Agar (1 l):	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; (18 g Agar)
YPDA-Medium/ Agar (1 l):	20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt; 20 g Glucose; (18 g Agar); pH 6,5. Nach dem Autoklavieren 15 ml 0,2 % Adenin Hemisulfat (sterilfiltriert) dazugeben.
SD-Medium/ Agar (1 l):	26,7 g SD-Base; Hefe-Dropout (Leu <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , Ade <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> ); pH 5,8 ; (18 g Agar)
HL5 (1 l):	22 g ForMedium HL5 Medium. Nach dem Autoklavieren 25 ml 40 % Glucose (autoklaviert) dazugeben.

FM (1 l):	19,3 g ForMedium FM-Granulat
Phosphat-Agar (1 l):	20 ml Phosphatpuffer (100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 735 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 5,7); 20 g Agar
SOC-Medium (1 l):	5 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 1 g Glucose
MES-Medium (1 l):	10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 1,3 g MES; pH 7,1 einstellen mit NaOH. Nach Autoklavieren 25 ml 40 % Glucose (autoklaviert) dazugeben.

### 2.1.8. Antikörper

Anti-CbfA 7F3: monoklonaler, primärer Antikörper aus Maus-Hybridomazellen, gerichtet gegen die CTD von CbfA (Aminosäuren 795-998) von *D. discoideum* (Winckler *et al.*, 2001).  
Einsatz im *Western Blot* 1:1

Anti-His *Tag*: muriner monoklonaler Antikörper gegen 4-6x His-*Tags* von Fusionsproteinen. (GenScript)  
Einsatz im *Western Blot* 1:5.000

Anti-TBP 7A3: muriner monoklonaler Antikörper gegen die N-terminale Region von TBP in *D. discoideum* (Dissertation Thanh Chung, 2007).  
Einsatz im *Western Blot* 1:5

Anti-*Mouse* IgG, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase:  
sekundärer Pferde-Antikörper zur Detektion von murinen, primären Antikörpern. (New England Biolabs (Cell Signaling))  
Einsatz im *Western Blot* 1:2.000

Anti-*Rabbit* IgG, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase:  
sekundärer Antikörper aus Ziege zur Detektion von primären Antikörpern aus Kaninchen. (New England Biolabs (Cell Signaling))  
Einsatz im *Western Blot* 1:2.000

## 2.1.9. Mikroorganismen

### E. coli K12-Stämme

- DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>)  
*phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*
- JM109: *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>), *relA1, supE44,  $\lambda$ -*,  $\Delta$ (*lac-proAB*),  
[F', *traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>* $\Delta$ M15], IDE3
- RZ1032: F', *cat*, (pCJ105, m13s, CMR) *dut, ung1, thi-1, relA1, spoT1, mcrA*  
(Sambrook, 1989)
- BL21 (DE3): F<sup>-</sup> *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*])

### S. cerevisiae-Stamm

- AH109: MATa, *trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2* : :  
GAL1<sub>UAS</sub><sup>-</sup> GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub><sup>-</sup> GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 : : MEL1<sub>UAS</sub><sup>-</sup>  
MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ

### D. discoideum-Stämme

- AX2: Durch natürliche Selektion, über den Stamm AX1 (Sussman und Sussmann, 1967),  
aus dem Isolat NC4 (Raper, 1935) hervorgegangener, axenisch wachsender  
Laborstamm (Watts & Ashwoth, 1970). *axeA, axeB, axeC*  
Bezugsquelle: *Dictyostelium Stock Center* ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org))
- JH.D: Aus dem Stamm AX2 entstandene *amber*-Suppressionsmutante des *cbfA*-Gens  
(Winckler *et al.*, 2001), die nur ca. 5 Prozent der Wildtyp-Menge von CbfA  
exprimiert. *axeA, axeB, axeC, cbfA(amber)(pJH1.2(am)-tetO:Glu(su)), bsR*
- DH1: Mutante des AX3-Stamms, bei der das UMPS-Gen durch homologe Rekombination  
mit dem Plasmid pRG24 deletiert ist und daher einen *ura*<sup>-</sup> Phänotyp aufweist  
(Caterina *et al.*, 1994). *axeA1, axeB1, axeC1, pyr5-6-(pRG24), ura-*  
Bezugsquelle: *Dictyostelium Stock Center* ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org))

### 2.1.10. Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide und Oligonukleotide sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG oder Metabion synthetisiert (Reinheit: entsalzt, HPLC). Die Plasmide wurden unter Verwendung der *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  und JM109 kloniert.

### 2.1.11. Programme

Tabelle 2.8. Verwendete Programme.

	Hersteller
Dictybase	<a href="http://dictybase.org">http://dictybase.org</a>
Mfold	<a href="http://mfold.rna.albany.edu">http://mfold.rna.albany.edu</a>
MxPro™ QPCR Software	Stratagene
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Office 2013	Microsoft
pDRAW32 DNA analysis software	AcaClone software
Prosite	<a href="http://prosite.expasy.org/scanprosite">http://prosite.expasy.org/scanprosite</a>
RNAComposer	<a href="http://rnacomposer.ibch.poznan.pl">http://rnacomposer.ibch.poznan.pl</a>

## 2.2. Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden werden in dieser Arbeit nicht näher beschrieben, bzw. wurden, bei der Verwendung von Kits, nach Angaben der entsprechenden Hersteller durchgeführt.

### 2.2.1. Kultivierung von *D. discoideum*

#### Stamm AX2

Die Kultivierung des Wildtyp-Stammes AX2 erfolgte axenisch, sowohl in Petrischalen als auch in Schüttelkultur (150 Upm) bei 22 °C (Ashworth & Watts, 1970) in HL5-Medium. Unter diesen Bedingungen beträgt die Generationszeit ca. 10 bis 12 Stunden. Eine

Zelldichte von  $4\text{-}6 \times 10^6$  Zellen/ml wurde nicht überschritten, da sonst ein Übergang der Zellen in die stationäre Wachstumsphase erfolgt. Zur Selektion transformierter Zellen wurden dem Medium  $10\ \mu\text{g/ml}$  G418,  $5\ \mu\text{g/ml}$  Blastidicin S oder  $35\ \mu\text{g/ml}$  Hygromycin zugegeben.

#### Stamm JH.D

Der Stamm JH.D lässt sich unter den gleichen Bedingungen wie AX2 kultivieren, jedoch ist die Generationszeit gegenüber AX2 geringfügig länger. Des Weiteren ist JH.D aufgrund der Konstruktion der CbfA-Suppression (Winckler *et al.*, 2001) resistent gegen Blastidicin S, so dass das HL5-Medium nach dem Auftauen von Gefrierkulturen für eine Zellpassage mit  $5\ \mu\text{g/ml}$  Blastidicin S versetzt wurde. Zur Selektion transformierter JH.D Zellen wurden dem Medium  $5\ \mu\text{g/ml}$  G418 oder  $25\ \mu\text{g/ml}$  Hygromycin zugesetzt.

#### Stamm DH1

Der Uracil-auxotrophe Stamm DH1 lässt sich sowohl in HL5-, als auch in FM-Medium unter Zugabe von Uracil bei  $22\ ^\circ\text{C}$  kultivieren. Die Generationszeit beträgt 12-14 Stunden. Transformierte Zellen, bei denen das UMPS-Gen wieder ins Genom integriert wurde, sind in der Lage in FM-Medium ohne Uracil zu wachsen. Für die Selektion transformierter Zellen wurden  $10\ \mu\text{g/ml}$  Blastidicin S,  $10\ \mu\text{g/ml}$  G418 oder  $30\ \mu\text{g/ml}$  Hygromycin verwendet. Bei doppelt transformierten Zellen wurde die Konzentration der Antibiotika auf  $7,5\ \mu\text{g/ml}$  G418 und  $18,5\ \mu\text{g/ml}$  Hygromycin herabgesetzt.

### **2.2.2. $\text{CaCl}_2$ -Transformation von *D. discoideum***

**Tabelle 2.9. Zusammensetzung der Lösungen und Puffer für die  $\text{CaCl}_2$ -Transformation.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
HBS-Puffer (2x)	20 mM HEPES; 140 mM NaCl; 10 mM KCl; 0,5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 % Glucose; pH 7,5
Schock-Lösung	1,0 ml HBS (2x); 0,6 ml Glycerin (60 % m/v); 0,4 ml ddH <sub>2</sub> O

Die Transformationsmethode ist geeignet, um ein bis zwei Plasmide stabil ins Genom zu integrieren (Gaudet *et al.*, 2007). Mittels dadurch eingebrachter Antibiotikum-Resistenz können die transformierten Zellen selektiert werden.

Zur Transformation wurden *D. discoideum*-Zellen verwendet, die zu 80-90 Prozent konfluent Petrischalen bewachsen hatten. Dazu wurde das Medium durch MES-Medium ersetzt und die Zellen für mindestens 45 Minuten damit inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 8-25 µg Plasmid-DNA mit 300 µl 2x HBS versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 600 µl aufgefüllt. Unter leichtem Mischen wurden 38 µl einer 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Die so vorbereitete DNA wurde für weitere 10 Sekunden durchmischt und für 25 Minuten bei 22 °C inkubiert. Das MES-Medium wurde kurz vor Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt. Die DNA-Lösung wurde in die Mitte der Platte getropft und durch Schwenken verteilt. Nach 30 Minuten Inkubation mit DNA bei 22 °C erfolgte die Zugabe von 10 ml MES-Medium und eine anschließende Inkubation über 3 Stunden (22 °C). Das MES-Medium wurde abgesaugt und durch vorsichtige Zugabe der Schock-Lösung ersetzt. Nach 6-8 Minuten wurde diese gründlich abgesaugt und die Zellen mit HL5-Medium bedeckt. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht, welches alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Nach 7-10 Tagen wurden positive Transformanten entweder auf der Platte weiterkultiviert (*Pool*) oder als Einzel-Klone in eine Mikrotiterplatte überführt. Zusätzlich wurden von diesen Transformanten Gefrierkulturen und Zellpellets angefertigt.

### **2.2.3. Gefrierkultur von *D. discoideum* Zellen in DMSO**

Der *D. discoideum*-Stamm JH.D ist aufgrund der CbfA-Suppression entwicklungsgestört und kann keine Sporen ausbilden. Daher ist es essentiell von diesem Stamm Gefrierkulturen mit DMSO anzufertigen. Dazu wurden von einer logarithmisch wachsenden Kultur  $2-4 \times 10^7$  Zellen zentrifugiert (130 g, 5 min, 4 °C), in 1,5 ml HL5-Medium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis wurden 150 µl DMSO zu den Zellen gegeben und gemischt. Die Konserven wurden 2 Stunden bei -20 °C gekühlt und anschließend bei -80 °C gelagert.

Um Zellen aus einer DMSO-Konserve zu kultivieren, wurde diese bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und anschließend zentrifugiert (1.400 g, 30 s, RT). Das Medium wurde abgenommen, die Zellen in frischem HL5-Medium resuspendiert und in einer Petrischale mit HL5-Medium ohne Zusätze bei 22 °C kultiviert.

#### 2.2.4. Gefrierkultur von *D. discoideum* Sporen in Glycerin

**Tabelle 2.10. Zusammensetzung des Phosphatpuffers.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Phosphatpuffer (50x)	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 735 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 5,7

Für die Herstellung von Gefrierkulturen der Stämme AX2 oder DH1 wurden 1x10<sup>8</sup> Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur zentrifugiert (200 g, 5 min, 4 °C). Nach zweimaligen Waschen der Zellen mit 20 ml kaltem 1x Phosphatpuffer (4 °C) wurden diese in 5 ml 1x Phosphatpuffer aufgenommen und auf einer Phosphatagar-Platte verteilt. Nach mindestens 30 Minuten wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt, die Platte für 5-10 Minuten getrocknet und anschließend bei 22 °C inkubiert. Nach Abschluss der multizellulären Entwicklung wurden die Sporen mit einer Pipettenspitze abgeschabt, in 500 µl 86 % Glycerin gegeben, durchmischt und bei -80 °C gelagert.

Für eine erneute Kultivierung der Zellen wurde mit einer Pipettenspitze ein kleines Volumen der Gefrierkultur entnommen und in einer Petrischale mit HL5-Medium ohne Zusätze bei 22 °C kultiviert.

#### 2.2.5. Herstellung von *D. discoideum* Zellpellets

Für die Gewinnung von DNA, RNA oder für die Verwendung im *Western Blot* wurden Pellets von je 2x10<sup>7</sup> Zellen einer logarithmisch wachsenden *D. discoideum*-Kultur verwendet und zentrifugiert (AX2 und DH1 200 g; JH.D 130 g, 5 min, 4 °C). Nach zweimaligen Waschen mit 20 ml 1x Phosphatpuffer (4 °C) wurden die Zellen in 1 ml 1x Phosphatpuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach

Zentrifugation (10.000 g, 1 min, 22 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.6. Isolierung von genomischer DNA aus *D. discoideum*

(1) Für die Gewinnung von genomischer DNA für Standardmethoden wurden Pellets mit  $2 \times 10^7$  Zellen verwendet. Pro Pellet wurden

336 µl ddH<sub>2</sub>O  
 40 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer  
 20 µl Triton X-100 (10 %)  
 4 µl Proteinase K (10 mg/ml)

dazugegeben. Die Lösung wurde durchmischt und für eine Stunde bei 56 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde der Ansatz anschließend für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (10.000 g, 1 min, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 6 µl RNase A (1 mg/ml) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Tabelle 2.11. Zusammensetzung der Puffer zur Herstellung von genomischer DNA.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Zell-Lysepuffer	50 mM HEPES; 40 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM KCl; 5 % (m/v) Saccharose
SDS-Lysepuffer	0,7 % (m/v) SDS in TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0 einstellen mit HCl)

(2) Für die Gewinnung von genomischer DNA mit höherer Reinheit wurden Zellpellets von  $1-2 \times 10^8$  Zellen zweimal mit 1x Phosphatpuffer gewaschen (5 min, 390 g, 4 °C) und anschließend in 45 ml Zell-Lysepuffer (4 °C) resuspendiert. Danach wurde NP40 (10 %) so lange tropfenweise dazugegeben bis die Lösung klar wurde, wobei das Gesamtvolumen nicht mehr als 50 ml bzw. die Endkonzentration von NP40 nicht größer als ein Prozent sein durfte. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 5.900 g, 4 °C) der Lösung wurde das

vorhandene Pellet in 5 ml SDS-Lysepuffer resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 100 µl Proteinase K (25 mg/ml) erfolgte eine Inkubation, mit mehrmaligem Schwenken der Lösung, für ein bis drei Stunden bei 60 °C. Einer nachfolgenden Fällung der DNA mit dem gleichen Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1; 5 ml) schloss sich eine gemischte Fällung der DNA mittels Ethanol (9 ml, 100 %, RT) und LiCl (400 µl, 8 M) für mindestens 30 Minuten (oder über Nacht) bei -20 °C an. Nach dem Zentrifugieren (10.000 g, 15 min, 4 °C) des Ansatzes wurde die DNA zwei weitere Male mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in mindestens 100 µl TE-Puffer gelöst.

### 2.2.7. Isolation von RNA und Synthese von cDNA aus *D. discoideum*

Zur Extraktion der RNA aus Zellpellets wurde der *RNeasy*<sup>®</sup> *Tissue* Kit (Qiagen) verwendet und nach dem *Animal Cell*-Protokoll des Herstellers gewonnen. Nach einer Konzentrationsbestimmung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Die Synthese der *complementary*-DNA (cDNA) erfolgte mit dem Omniscript<sup>®</sup> *Reverse Transcription* Kit (Qiagen) und einem oligo(dT)<sub>18</sub>-Oligonukleotid (komplementär zum Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA) bzw. einem spezifischen Oligonukleotid (5 pmol) zur Synthese spezifischer-cDNA der Plusstrang-RNA. Pro Reaktion wurden 500 ng RNA eingesetzt. Um eine Verunreinigung der mit einem oligo(dT)<sub>18</sub>-Oligonukleotid erzeugten cDNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) an der synthetisierten cDNA mit den Oligonukleotiden Q-GAPDH-01 und Q-GAPDH-02 durchgeführt. Diese ergeben das Produkt des Standard-Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Das cDNA Produkt (ohne Intron) ist 447 Basenpaare groß, das Produkt an genomischer DNA (mit Intron) 521 Basenpaare. Anhand der Produktgröße kann so eine Verunreinigung mit genomischer DNA nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase eingesetzt. Für die Synthese spezifisch-erzeugter cDNA der artifiziellen Retrotransposons (um Transkripte der Plusstrang-RNA zu erhalten) wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

DGLT-A <sup>BSR</sup> -Retrotransposons:	Oligonukleotid DGLTA-25
TRE5-A <sup>BSR</sup> -Retrotransposons:	Oligonukleotid BSR-05

TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons: Oligonukleotid Rep-24

Somit wird nur die funktionelle mRNA der Retrotransposons erfasst und nicht die, die durch den Aktin-15-Promotor des Resistenzmarkers erzeugt wird.

### **2.2.8. *D. discoideum* Retrotranspositions-Testsystem genetisch markierter Retrotransposons**

Dieses Retrotranspositionsexperiment nach Siol *et al.* (2011) wird benutzt um die Retrotransposition von artifiziellen Retrotransposons in Wildtyp-Stämmen von *D. discoideum* zu untersuchen. Die artifiziellen Retrotransposons (TRE5-A<sup>BSR/ HYG</sup>, DGLT-A<sup>BSR</sup>) enthalten oberhalb der untranslatierten Region des 3'-Endes bzw. des 3'-LTR einen Blasticidin- bzw. Hygromycin-Resistenzmarker (*mbsr1/ mhygl*) in reverser Richtung zum ORF des Retrotransposons. Innerhalb des Resistenz-Gens befindet sich ein Intron in der gleichen Orientierung zum ORF des Retrotransposons (Abb. 3.2). Das Resistenz-Gen kann somit nicht funktionell exprimiert werden. Durch die Transkription des artifiziellen Retrotransposons wird das Intron herausgespleißt. Nach Integration des genetisch markierten Retrotransposons in das Genom der Wirtszelle wird das Resistenz-Gen wieder funktionell exprimiert, es entstehen Blasticidin- oder Hygromycin-resistente Klone.

Für die Durchführung wurden *D. discoideum*-Zellen nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode mit dem Plasmid pISAR (enthält G418-Resistenzgen) und einem Retrotransposon-Plasmid (TRE5-A<sup>BSR</sup>, TRE5-A<sup>HYG</sup>, DGLT-A<sup>BSR</sup>) transformiert. Eine Selektion mit G418 führte zur Isolation von Zellen, die das markierte Retrotransposon enthielten. Aus diesen G418-resistenten Klonen wurden Gefrierkulturen und für eine nähere Charakterisierung Zellpellets angefertigt. Zunächst wurde die Kopienzahl der in das Genom eingebrachten artifiziellen Retrotransposons mittels *Real-Time*-PCR bestimmt. Das Retrotranspositionsexperiment wurde mit polyklonalen Zellen ähnlicher Kopienzahl (mindestens zwei) durchgeführt. Dies erfolgte entweder direkt nach der G418-Selektion oder nach erneuter Aufnahme der Stocks aus Gefrierkulturen. Dabei wurde auf eine einheitliche Kulturdauer der verwendeten *Pools* geachtet. Von jedem Zell-*Pool* wurden 1x10<sup>7</sup> Zellen in dreifacher Bestimmung in HL5-Medium mit Blasticidin/ Hygromycin kultiviert. Nach 7-10 Tagen

erschieden resistente Klone auf der Platte, die Retrotranspositionseignisse der artifiziellen Retrotransposons enthielten. Von diesen resistenten Klonen wurden Gefrierkulturen und für eine nähere Charakterisierung Zellpellets angefertigt. Die Retrotranspositionsaktivität wurde durch die Anzahl der Blasticidin-/ Hygromycin-resistenten Klone pro  $1 \times 10^7$  Zellen bestimmt. Für signifikante Aussagen wurde die Retrotranspositionsaktivität von 6-10 unabhängig transformierten G418-*Pools* bestimmt und gemittelt.

Die Retrotransposition wurde auch anhand von genomischer DNA von Blasticidin-/ Hygromycin-resistenten Zellen im Vergleich zu G418-resistenten Zellen mittels PCR überprüft. Dabei wurden für das Blasticidin-Resistenz-Gen die Oligonukleotide bsr-02/ bsr-06 und für das Hygromycin-Resistenz-Gen die Oligonukleotide mhygl-01/ mhygl-02 benutzt. Diese binden beidseits des Introns. Anhand der Produkt-Größe lässt sich gespleißtes Blasticidin-/ Hygromycin-Resistenz-Gen von ungespleißtem unterscheiden. Für die Analyse der Transkription der artifiziellen Retrotransposons wurde eine PCR mit obigen Oligonukleotiden an spezifisch-erzeugter cDNA durchgeführt.

### 2.2.9. Oligonukleotid-gerichtete *in vitro*-Mutagenese

**Tabelle 2.12. Zusammensetzung der Puffer für die *in vitro*-Mutagenese.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
<i>Annealing</i> -Puffer (5x)	200 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; pH 8,0
Elongations-Puffer (10x)	100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM ATP; 10 mM DTT
Präzipitations-Lösung	3,5 M NH <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> COOH; 20 % PEG 8000
<i>lowTE</i> -Puffer	10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 8,0 einstellen mit HCl
Hochsalzpuffer	100 mM Tris; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8,0 einstellen mit HCl

Die Oligonukleotid-gerichtete *in vitro*-Mutagenese wird mit nur einem Oligonukleotid, welches für die Zielsequenz kodiert, an Einzelstrang-DNA durchgeführt. Die Einzelstrang-DNA wird mit Hilfe des F1-Helferphagen M13K07 hergestellt. Hierfür muss die zu

mutierende DNA-Sequenz in einem Plasmid mit einem f1-Replikationsursprung, Phagemid genannt, enthalten sein (z.B. pGEM®-T).

#### Herstellung von Einzelstrang-DNA

Das zu mutierende Plasmid, mit f1-Replikationsursprung, wurde in den *E. coli*-Stamm RZ 1032 transformiert. Mit einer Kolonie wurde eine 3 ml Vorkultur in LB-Medium beimpft und über Nacht kultiviert (37 °C, 200 Upm). Daraus wurde mit 1 ml eine 50 ml Schüttelkultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 37 °C geschüttelt (200 Upm). Zu der Kultur wurden 100 µl von einer Helferphagen-Suspension (M13K07, New England Biolabs; enthalten Kanamycin-Resistenz-Gen) zugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde (37 °C, 200 Upm) erfolgte die Zugabe von 70 µl Kanamycin (50 mg/ml). Während der anschließenden Inkubation der Kultur über Nacht (37 °C, 200 Upm) kam es zur Vermehrung von Phagen, die einzelsträngige Phagemid-DNA enthalten und in das Kultur-Medium abgegeben werden. Nach Zentrifugation der Zellen (9.000 g, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand mit 20 µl RNase A (1 mg/ml) versetzt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte eine Präzipitation der Helferphagen mit ¼ Volumen Präzipitationslösung für 30 Minuten auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (9.000 g, 15 min, 4 °C) erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 400 µl Hochsalzpuffer, wodurch die Proteinhülle der Phagen zerstört wurde. Nach anschließenden Fällungen mit Phenol und Ethanol wurde die Einzelstrang-DNA in 30 µl *lowTE* aufgenommen und deren Konzentration durch Messung der OD<sub>260</sub> bestimmt.

#### 5'-Phosphorylierung der Oligonukleotide

Da PCR-Produkte vor der Ligation phosphoryliert sein sollten, wurden die Oligonukleotide für die *in vitro*-Mutagenese am 5'-Ende mittels des folgenden Reaktionsansatzes phosphoryliert:

15 µl ddH<sub>2</sub>O  
2 µl Oligonukleotid (100 pmol/µl)  
2 µl Polynukleotidkinasepuffer (10x)  
1 µl ATP (100 mM)  
0,5 µl T4 Polynukleotidkinase

Der Ansatz wurde gemischt, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit reinem Ethanol (10.000 g, 20 min, 4 °C) gefällt. Das Pellet wurde in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### In vitro-Mutagenese

Für die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids an die einzelsträngige DNA wurden

- 10 µl ddH<sub>2</sub>O
- 4 µl Annealing-Puffer (5x)
- 5 µl phosphoryliertes Oligonukleotid
- 1 µg Einzelstrang-DNA

gemischt. Der Ansatz wurde bei 100 °C 4 Minuten erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Für die Elongation des Hybridisierungsansatzes wurden folgende Bestandteile dazugegeben:

- 10 µl ddH<sub>2</sub>O
- 4 µl Elongations-Puffer (10x)
- 2 µl dNTPs (25 mM)
- 1 µl T7 DNA-Polymerase
- 3 µl 4 DNA-Ligase

Nach einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis, 5 Minuten bei RT und weiteren 2 Stunden bei 37 °C erfolgte eine Fällung der DNA mit Ethanol (10.000 g, 20 min, 4 °C) und deren Resuspendierung in 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Davon wurden verschiedene Verdünnungen in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft, ob die Mutagenese erfolgreich war.

## 2.2.10. Protein-Protein-Interaktionsexperiment (*Pulldown*)

### 2.2.10.1. Proteinaufreinigung aus *E. coli*

Tabelle 2.13. Zusammensetzung der Proteinaufreinigungspuffer.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,2 % Glucose; pH 8,0; Sterilfiltrieren
Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol; pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0

#### Expression

Die für die rekombinante Expression der Proteine notwendigen Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert. Zunächst wurde ein Expressionstest durchgeführt. Von jeweils 2 Klonen wurden Vorkulturen beimpft (10 ml) und über Nacht (37 °C, 200 Upm) kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurde eine 20 ml Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 beimpft und bei 22 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert (200 Upm). Nach Entnahme einer Probe (1 ml) erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG über fünf Stunden bei 22 °C (200 Upm). Nach Messung der OD<sub>600</sub> erfolgte eine erneute Probenentnahme, die der Zellzahl der OD<sub>600</sub> von 0,6 vor der Induktion entsprach. Des Weiteren wurde von jeder Kultur eine Gefrierkultur hergestellt und bei -80 °C eingefroren. Zur Analyse der Expression wurden die Proben zentrifugiert, in 20 µl PBS aufgenommen, mit 20 µl 2x Lämmli-Puffer gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Auswertung der Expression erfolgte per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Nach erfolgreichem Expressionstest wurde wie oben beschrieben eine 100 ml Expressionskultur fermentiert, nach 5 Stunden pelletiert und bei -80 °C gelagert.

#### Proteinaufreinigung

Ein Zellpellet wurde für 20 Minuten auf Eis aufgetaut und in Lysepuffer (2-5 ml/g Zellen) aufgenommen. Es erfolgte die rasche Zugabe von 30 µl Proteaseinhibitoren (50x) und 1,5 mg Lysozym (1 mg/ml). Nach Durchmischen wurde der Ansatz für 30 Minuten auf Eis

inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschallbehandlung (3x 30 s). Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (15.000 g, 30 min, 4 °C) und der pH-Wert des Überstandes mittels Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt. Die anschließende Aufreinigung der Proteine erfolgte über einen His<sub>6</sub>-Tag. Dazu wurden 200 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA magnetische Kügelchen (Qiagen) zweimal mit 700 µl Lysepuffer gewaschen. Daraufhin wurden 1,5 ml des Zell-Lysat-Überstandes dazugegeben und bei 4 °C für eine Stunde rotiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Kügelchen sechsmal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Kügelchen mit 500 µl Elutionspuffer versetzt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Das Eluat wurde abgenommen und auf Eis gestellt. Die Kügelchen wurden ein zweites Mal mit 500 µl Elutionspuffer für 10 Minuten inkubiert und das Eluat erneut abgenommen. Von beiden Elutionen wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden sie aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.10.2. Pulldown

**Tabelle 2.14. Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Protein-Pulldown.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Puffer I	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 8,0
Puffer II	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM NaCl; pH 8,0
Puffer III	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 400 mM NaCl; pH 8,0
Proteaseinhibitoren (50x)	1 Tablette <i>complete tablets</i> (Roche); 1 ml ddH <sub>2</sub> O

Dieses Experiment diente zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*. Für die Immobilisierung der Proteine wurden magnetische Glutathion-Kügelchen verwendet. Alle Reaktionen wurden in Protein-*low bind*-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine als Glutathion-S-Transferase- und als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteine exprimiert. Das Protein Glutathion-S-Transferase wurde als Negativkontrolle verwendet. Pro Ansatz wurden 20 µl Glutathion-Kügelchen eingesetzt. Nach Abnahme des Überstandes am Magnetständer wurden die Glutathion-Kügelchen dreimal mit je 800 µl Puffer II (mit 0,01 % Tween 20, 1 mM DTT) gewaschen. Anschließend

wurden die Kügelchen mit 2 % BSA in Puffer II (mit 0,01 % Tween 20, 1 mM DTT) für 30 Minuten bei RT unter Schwenken geblockt. Die Bindung der mit Glutathion-S-Transferase fusionierten Proteine bzw. von Glutathion-S-Transferase (Negativkontrolle) an die Kügelchen erfolgte rotierend in 500 µl Puffer II (mit 0,01 % Tween 20, 0,1 % BSA, 1 mM EDTA, 10 µl 50x Proteaseinhibitoren, 1 mM DTT) für 2 Stunden bei RT. Der Überstand wurde abgenommen und die Kügelchen wurden mit jeweils 500 µl Puffer I (mit 0,01 % Tween 20, 0,1 % BSA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) viermal gewaschen. Danach wurde der potentielle Bindungspartner in den Überstand gegeben. Dies erfolgte in einem Volumen von 500 µl Puffer I (mit 0,01 % Tween 20, 0,1 % BSA, 1 mM EDTA, 10 µl 50x Proteaseinhibitoren, 1 mM DTT) rotierend für 3 Stunden bei RT. Anschließend wurden die Kügelchen mit Puffer II oder Puffer III sechsmal gewaschen (500 µl; mit 0,01 % Tween 20). Nach Waschschrift zwei und sechs wurden die Ansätze in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Elution der immobilisierten Proteine inklusive Bindungspartner erfolgte in 40 µl Puffer II oder III, abhängig davon mit welchem der letzte Waschschrift durchgeführt wurde, und 40 µl 2x Laemmli-Puffer für 5 Minuten bei 95 °C. Die Analyse des *Pulldowns* erfolgte mittels *Western Blot* und einem Anti-His<sub>6</sub>-Tag Antikörper.

### **2.2.11. SDS-PAGE und Coomassie-Färbung**

Für die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele (12,5 %) verwendet (Laemmli, 1970). Gesamtzelllysate wurden vorher in 1x PBS resuspendiert und 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt. Alle anderen Proben wurden ebenfalls 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer gemischt. Nach anschließendem Erhitzen für 5 Minuten bei 95 °C wurden alle Proben zentrifugiert (10.000 g, 5 min) um Zelltrümmer abzutrennen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110-160 Volt mit 1x SDS-Laufpuffer. Die Proteine wurden mittels anschließender Coomassie-Färbung (Mikrowelle 45 s, 460 W) detektiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte mit ddH<sub>2</sub>O.

**Tabelle 2.15. Zusammensetzung der Puffer und Gele für die SDS-PAGE.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris; 2 M Glycin; 1 % SDS; pH 8,3	
Trenngel 12,5 %	ddH <sub>2</sub> O	9,2 ml
	Trenngel-Puffer (4x)	7 ml
	Acrylamid-Bis 30 % (37,5:1)	11,7 ml
	APS	90 µl
	TEMED	30 µl
Sammelgel	ddH <sub>2</sub> O	7,7 ml
	Sammelgel-Puffer (10x)	1,0 ml
	Acrylamid-Bis 30 % (37,5:1)	1,3 ml
	TEMED	15 µl
	APS	30 µl
Coomassie-Lösung (1 l)	70 mg Coomassie G250; 3 ml HCl (37 %); ddH <sub>2</sub> O	

### 2.2.12. Western Blot

Die *Western Blots* wurden mit einem *Semidry-Blot*-System durchgeführt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) je nach Proteingröße für 1-1,5 Stunden mit 0,8-1,2 mA/cm<sup>2</sup> geblottet. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in BSA-Blockierlösung geschwenkt und über Nacht mit dem primären Antikörper (in 3 % BSA/TBS-T) bei 4 °C inkubiert. Die Konzentration der Antikörper ist im Kapitel 2.1.8 aufgeführt. Die Membran wurde dreimal in TBS-T gewaschen (5 min, 5 min, 20 min) und anschließend für 30 Minuten in Milch-Blockierlösung blockiert. Nach erneutem Waschen (siehe oben) wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (in Milch-Blockierlösung), inkubiert (Kapitel 2.1.8). Anschließend wurde die Membran nochmals mit TBS-T (siehe oben) gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels ECL<sup>®</sup>-System (GE Healthcare) über Chemolumineszenz und Röntgen-Film. Nach unterschiedlichen Detektionszeiten wurde der Film entwickelt, fixiert und analysiert.

**Tabelle 2.16. Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den *Western Blot*.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
TBS (10x)	200 mM Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,4
TBS-T	1x TBS; 0,05 % Tween 20
Anoden-Puffer I	300 mM Tris; 20 % Methanol, pH 10,4
Anoden-Puffer II	25 mM Tris; 20 % Methanol, pH 10,4
Kathoden-Puffer	25 mM Tris; 40 mM 6-Amino-n-Hexansäure; 20 % Methanol; pH 9,4
BSA-Blockierlösung	3 % BSA in TBS-T
Milch-Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBS-T

### 2.2.13. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR wurde unter Standardbedingungen in 20 bzw. 50 µl Ansätzen durchgeführt. Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide am Hygromycin-Resistenz-Gen lag standardmäßig bei 58 °C, für das Blastocidin-Resistenz-Gen bei 60 °C und für das Retrotransposon DGLT-A bei 56 °C.

Für einen PCR-Ansatz wurden 1-2 µl genomischer DNA und 1 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt.

### 2.2.14. *Real-Time-PCR*

Um die Anzahl der ins Genom integrierten markierten Retrotransposon in *D. discoideum* zu ermitteln, wurde eine *Real-Time-PCR* an genomischer DNA durchgeführt. Als Standard wurde das Gen für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verwendet, welches mit einer Kopie im Genom vorliegt (Oligonukleotide Q-GAPDH-01 und Q-GAPDH-02). Als Oligonukleotide für das Blastocidin-Resistenz-Gen wurden bsr-3'seq und bsr-06, für das Hygromycin-Resistenz-Gen die Oligonukleotide mhygl-02 und mhygl-03 verwendet. Für die *Real-Time-PCR* wurde genomische DNA eingesetzt, die nach der Extraktion 1:100 verdünnt wurde. Verwendet wurden das System MxPro 3000 (Stratagene), sowie ein Taq-

Polymerase Kit und der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® (Jena Bioscience). Pro Ansatz wurden zusammen gemischt:

10x Puffer	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
Oligonukleotid I	2,8 µl
Oligonukleotid II	2,8 µl
EvaGreen	0,5 µl
ROX 1:1000	1 µl
Taq	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,65 µl
gDNA 1:100	10 µl

Nach einer 10-minütigen Denaturierung schlossen sich 40 Zyklen (30 s 95 °C; 30 s 58 °C (Hygromycin) oder 60 °C (Blasticidin); 30 s 72 °C) an. Die Auswertung erfolgte mittels der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Pfaffl, 2001). Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt.

### 2.2.15. Hefe-Zweihybrid-System

**Tabelle 2.17. Zusammensetzung der Lösungen für das Hefe-Zweihybrid-System.**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Lösung A	0,5 M Ethylenglykol; 10 mM Bicin; 1 M Sorbitol
Lösung B	0,4 M PEG 1.000; 0,2 M Bicin
Lösung C	150 mM NaCl; 10 mM Bicin
1 M Bicin (100 ml)	16,35 g Bicin; ddH <sub>2</sub> O; pH 8,35 einstellen mit NaOH
Lysepuffer Hefe	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 300 mM NaCl; 1 % SDS; 2 % Triton X-100; pH 8,0

#### Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation von AH109

Von dem *S. cerevisiae*-Stamm AH109 wurde zunächst eine 10 ml Vorkultur (YPDA-Medium) mit einem Klon beimpft und über Nacht (30 °C, 150 Upm) kultiviert. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine 100 ml Hauptkultur beimpft und für weitere 3-4 Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde zu je 50 ml auf Reaktionsgefäße verteilt und zentrifugiert (5 min, 1.500 g, 4 °C). Der Überstand wurde

verworfen und die Zellpellets in 10 ml Lösung A resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Pellets kurz getrocknet und in 1 ml Lösung A aufgenommen. Nach Zugabe von je 55 µl DMSO pro Pellet wurden die Zellen zu je 200 µl in Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation (Gietz & Woods, 2001) wurden je Plasmid 2 µg DNA zu den auf Eis aufgetauten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 37 °C und 700 Upm geschüttelt und nach Zugabe von 1 ml Lösung B für eine Stunde (30 °C, 400 Upm) inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 2.000 g) wurden die Zellen in 1 ml Lösung C resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf SD Leu<sup>-</sup>/ Trp<sup>-</sup>-Platten ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### Protein-Protein-Interaktionsexperiment (Clontech)

Für die Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden die entsprechenden Gene in ein Köder-(pGBKT7) bzw. ein Beute-(pAct2) Plasmid kloniert. Diese enthalten die GAL4-DNA-Bindedomäne bzw. die GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne. Die beiden Plasmide wurden in den Stamm AH109 transformiert. Bei einer Interaktion der Köder- und Beute-Fusionsproteine wird über die Binde- und Aktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert und die Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1* exprimiert. Um Protein-Protein-Interaktionen zu testen wurden pro Transformation 10 Klone auf Selektionsplatten ausgestrichen (SD Ade<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>), die zudem noch X-α-Gal enthielten. Diese wurden für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Im Fall einer Protein-Protein-Interaktion zeigten die Transformanten Wachstum und eine Blaufärbung. Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit diesem System gelang nur in einer Testrichtung.

#### Isolierung von Plasmid-DNA

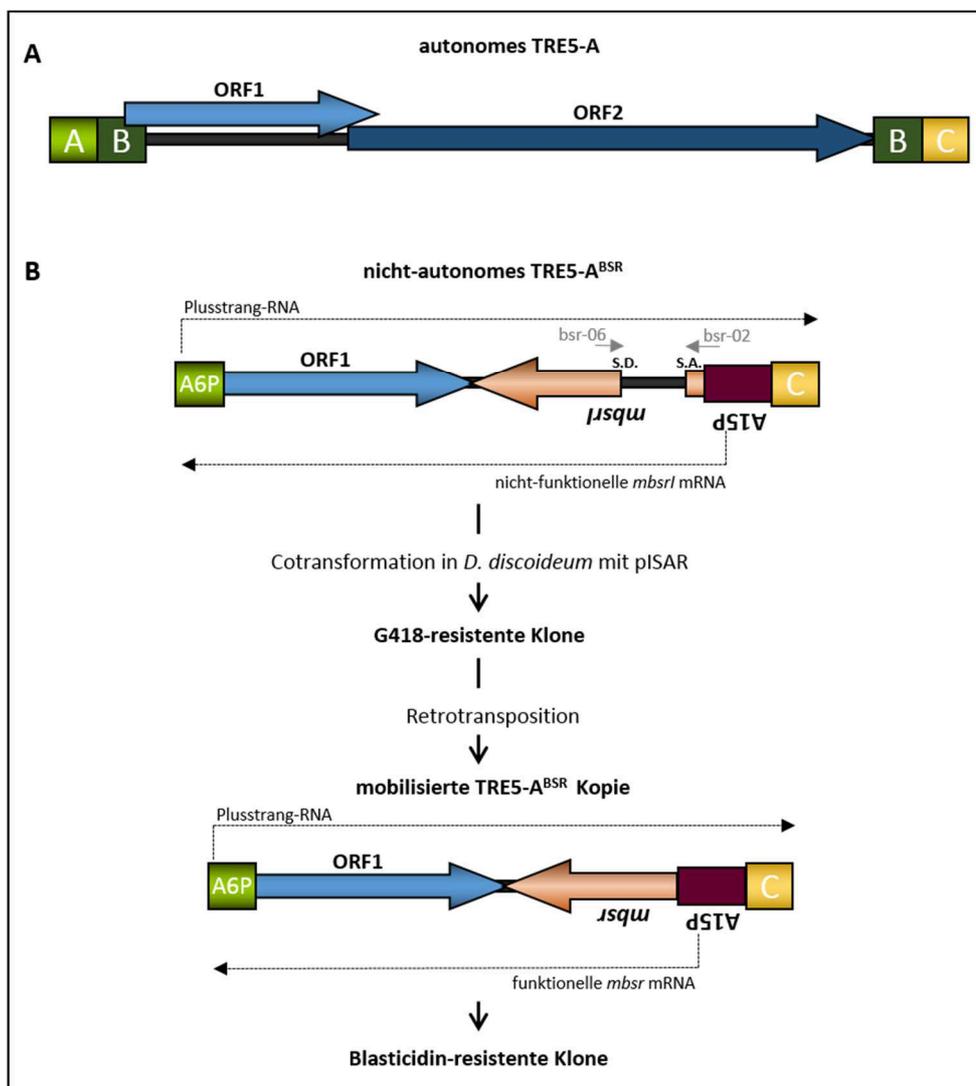
Um die Plasmide der Transformanten zu überprüfen, wurden diese aus den Hefe-Zellen isoliert. Dazu wurde SD Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>-Minimalmedium (5 ml) mit einer Kolonie beimpft und für ca. 48 Stunden bei 30 °C geschüttelt (180 Upm). Nach Überführen der Kultur in 1,5 ml Reaktionsgefäße erfolgte eine Zentrifugation (10.000 g, 1 min). Die Zellpellets wurden in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen und 200 µl Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Ansätze für 2 Minuten stark geschüttelt

und anschließend zentrifugiert (5 min, 10.000 g, 4 °C). Die obere, Plasmid-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und wieder zentrifugiert. Wiederum wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Fällung der Plasmid-DNA mit Isopropanol (0,7 Volumen) und 0,1 Volumen von 3 M Natriumacetat (20 min, 10.000 g, 4 °C). Danach wurde die pelletierte DNA zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 3 µl in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert. Ein Viertel der transformierten Zellen wurde auf LB<sub>Ampicillin</sub>- und der Rest auf LB<sub>Kanamycin</sub>-Platten ausplattiert. Danach wurden die Plasmide isoliert und auf ihre Identität überprüft.





nachfolgenden Experimente das hier verwendete Retrotranspositionsexperiment näher erläutert werden. Autonome TRE5-A.1 Retrotransposons bestehen neben A-, B- und C-Modulen aus zwei ORFs, die für die benötigten Proteine codieren (Abb. 3.2 A).



**Abbildung 3.2. Retrotranspositionsexperiment mit genetisch markierten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons.**

(A) Darstellung eines endogenen autonomen TRE5-A-Retrotransposons. (B) Retrotranspositionssystem mit genetisch markierten nicht-autonomen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons. *mbsr*: Blastidin-Resistenzmarker; *bsr-02/-06*: Oligonukleotide; A6P: Aktin-6-Promotor; ORF: offener Leserahmen; A15P: Aktin-15-Promotor; S. D.: *splice-donor-site*; S.A.: *splice-acceptor-site*; A/B/C: Module von TRE5-A; pISAR: G418-Resistenz vermittelndes Plasmid. Abbildung modifiziert nach Siol *et al.* (2011).

Deren nicht-autonome Derivate, die TRE5-A.2-Retrotransposons, sind durch eine große Deletion im ORF2 gekennzeichnet (Marschalek *et al.*, 1992). Eine Mobilisierung dieser Retrotransposons im Genom erfolgt wahrscheinlich *in trans* durch die ORF2-Proteine,

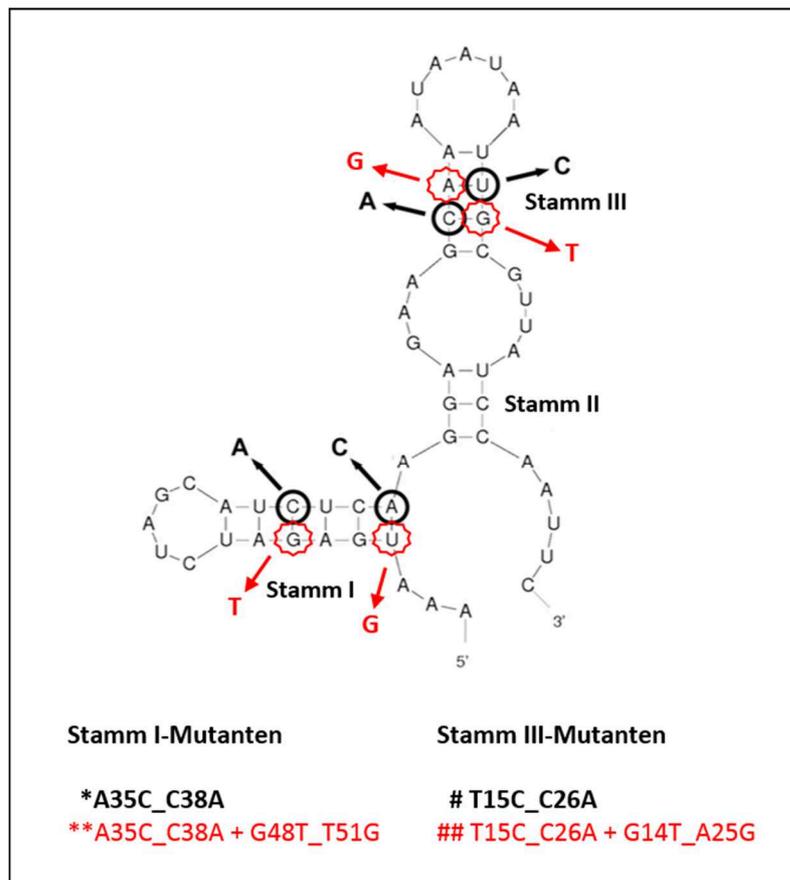
welche von dem funktionell autonomen Retrotransposon TRE5-A.1 produziert werden (Beck *et al.*, 2002; Siol *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein Retrotranspositionssystem mit artifiziellen, genetisch markierten nicht-autonomen TRE5-A-Retrotransposons entwickelt (Siol *et al.*, 2011; Abb. 3.2 B). Die artifiziellen Retrotransposons (TRE5-A<sup>BSR</sup>) bestehen neben dem ORF1 aus dem A- und C-Modul und enthalten oberhalb des C-Moduls einen Blasticidin-Resistenzmarker (*mbsrl*) in reverser Richtung zur Transkriptionsrichtung des ORF1. Innerhalb des *mbsrl*-Gens befindet sich ein Intron in der gleichen Orientierung des Retrotransposons (Abb. 3.2 B). Das *mbsrl*-Gen kann somit nicht funktionell gespleißt und exprimiert werden. Bei einer Transkription des artifiziellen Retrotransposons wird das Intron herausgespleißt, so dass nach Integration des genetisch markierten Retrotransposons in das Genom der Wirtszelle das *mbsrl*-Gen wieder funktionell exprimiert werden kann. Dadurch entstehen Blasticidin-resistente Klone. Zur Steigerung der Retrotranspositionsfrequenz der nicht-autonomen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons wurde der interne Promotor (A-Modul) gegen den stärkeren Aktin-6-Promotor von *D. discoideum* ausgetauscht (Siol *et al.*, 2011).

Ein indirekter Nachweis der Retrotransposition kann mittels einer PCR an genomischer DNA der G418- und Blasticidin-resistenten Klone erfolgen. Das Produkt der Oligonukleotide bsr-02/ bsr-06 (Abb. 3.2 B) ist bei funktionell gespleißten artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup>, wie sie bei Blasticidin-resistenten Klonen vorkommen sollten, um 80 Basenpaare kleiner als bei nicht gespleißten artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup> (G418-resistente Klone) (siehe Abb. 3.4 C; Siol *et al.*, 2011).

### **3.1.1. Untersuchungen zum Einfluss der C-Modul-Struktur von TRE5-A auf die Retrotransposition**

Vorangegangene Arbeiten zeigten die essentielle Notwendigkeit des C-Moduls für die Retrotransposition des artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons (Siol *et al.*, 2011). Ein Austausch des C-Moduls gegen den Aktin-8-Terminator von *D. discoideum* führt zum vollständigen Verlust der Retrotransposition (Siol *et al.*, 2011). Die RNA des C-Moduls bildet nach Vorhersagen des Programmes *mfold* eine spezielle räumliche Struktur aus (Abb. 3.3), welche wahrscheinlich essentiell für die Retrotransposition ist.

Punktmutationen in der Sequenz des Stammes I (\* A35C\_C38A) und des Stammes III (# T15C\_C26A) der C-Modul-RNA, die wahrscheinlich eine Strukturänderung der RNA bewirken, führten zum Verlust der Retrotransposition von TRE5-A<sup>BSR</sup>. Die Transkription der artifiziiellen TRE5-A<sup>BSR</sup> C-Modul-Mutanten bleibt dabei erhalten (Siol *et al.*, 2011; siehe auch Abb. 3.4 D). Allerdings ist nicht bekannt, ob nur die Gesamtstruktur des C-Moduls einen Einfluss auf die Retrotransposition hat oder ob die Retrotransposition auch durch einzelne Basenaustausche ohne Strukturänderung beeinflusst werden kann.



**Abbildung 3.3. Darstellung der räumlichen RNA-Struktur des C-Moduls von TRE5-A.**

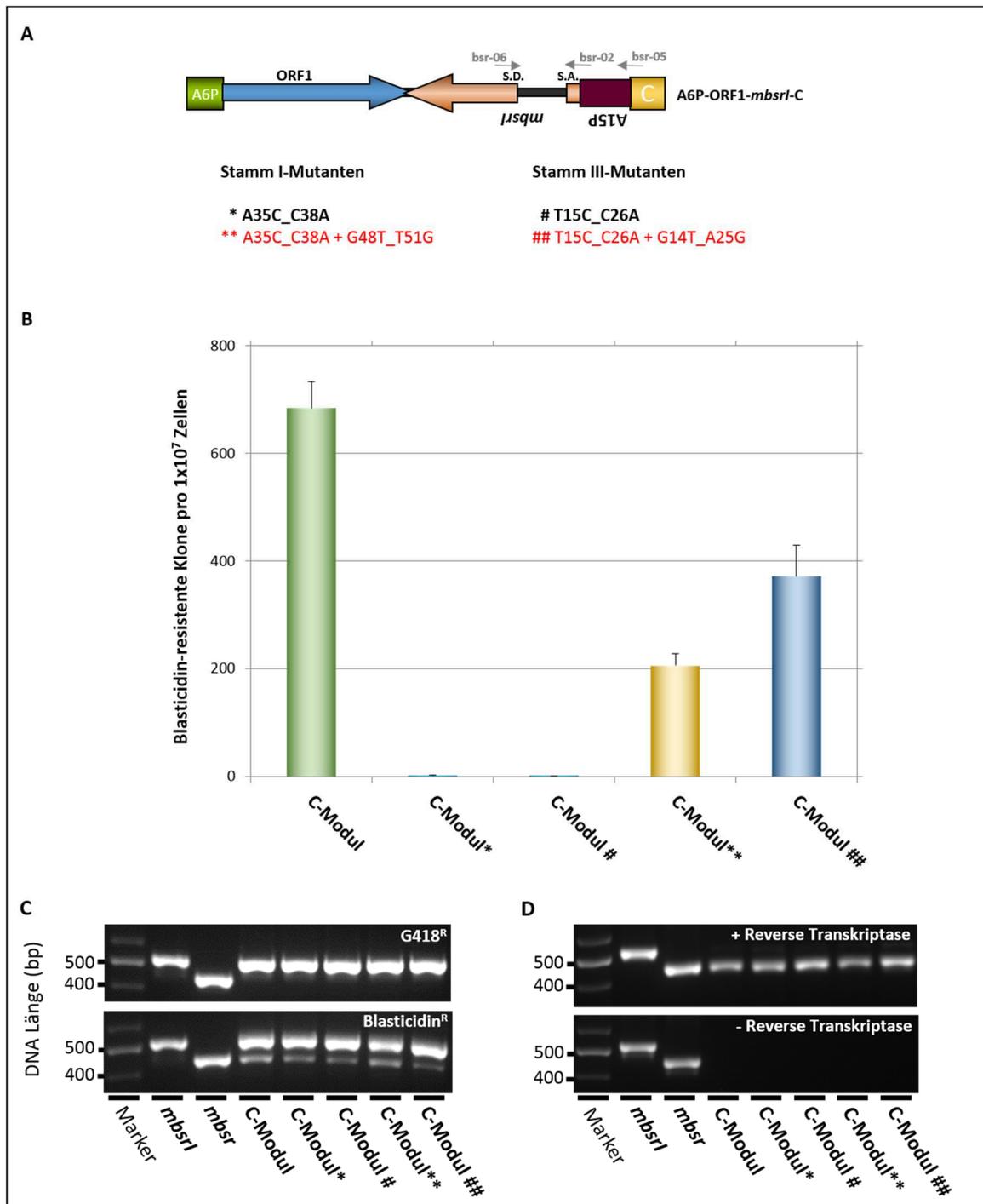
Strukturvorhersage des Programmes *mfold* (Version 2.3; 22°C) für die RNA des C-Moduls von TRE5-A und Darstellung der früher untersuchten (schwarz) bzw. in dieser Arbeit zu untersuchenden (rot) Basenaustausche. A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; U: Uracil. Abbildung modifiziert nach Siol *et al.* (2011).

Um den Einfluss der RNA-Struktur des C-Moduls auf die Retrotransposition von TRE5-A<sup>BSR</sup> zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den bereits vorliegenden Punktmutationen zwei weitere Mutationen in der Sequenz des Stammes I und des Stammes III der RNA-Struktur

des C-Moduls eingefügt. Laut Strukturvorhersagen sollte dies zu einer Wiederherstellung der räumlichen Struktur der RNA führen (Abb. 3.3 rot). Dazu wurden zwei C-Modul-Sequenzen synthetisiert, die nun je RNA-Stamm vier Basenaustausche enthielten (Stamm I \*\* A35C\_C38A + G48T\_T51G; Stamm III ## T15C\_C26A + G14T\_A25G). Diese wurden gegen das natürliche C-Modul des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons auf dem Plasmid ausgetauscht. Die Plasmide des artifiziellen *mbsrl*-Gen-markierten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons und dessen C-Modul-Mutanten (\* A35C\_C38A und # T15C\_C26A) lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor.

Sowohl die beiden neu generierten Plasmide mit TRE5-A<sup>BSR</sup>-Mutanten (\*\* und ##), als auch die Plasmide mit den initialen C-Modul-Mutanten (\* A35C\_C38A und # T15C\_C26A) und das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Plasmid mit dem natürlichen C-Modul wurden jeweils in den Stamm AX2 transformiert. Dies erfolgte jeweils in Cotransformation mit dem Plasmid pISAR (enthält G418-Resistenzgen). Anschließend wurde mit G418-resistenten Zellpopulationen das Retrotranspositionsexperiment durchgeführt. Dazu wurde mittels *Real-Time*-PCR sichergestellt, dass die Zellen eine ähnliche Anzahl an Kopien des *mbsrl*-Gens enthielten (Daten nicht gezeigt). Die Retrotranspositionsaktivität wurde durch die Anzahl der Blasticidin-resistenten Klone pro  $1 \times 10^7$  Zellen bestimmt.

Die Analyse der Retrotransposition zeigte, dass die neu eingeführten Punktmutationen, die laut Vorhersage die ursprüngliche räumliche RNA-Struktur des C-Moduls wieder herstellen, zu einer Verbesserung der Retrotranspositionsfrequenz führten (Abb. 3.4 B). So konnte durch die C-Modul-Mutante\*\* (A35C\_C38A + G48T\_T51G) im Stamm I die Retrotransposition auf ca. 35 Prozent des Niveaus des natürlichen C-Moduls gesteigert werden (Abb. 3.4 B, gelber Balken). Die C-Modul-Mutante ## (T15C\_C26A + G14T\_A25G) im Stamm III führte sogar zu einer Erhöhung der Retrotransposition auf ca. 50 Prozent (Abb. 3.4 B, blauer Balken). Eine Retrotransposition der initialen C-Modul-Mutanten (\* und #) konnte in Übereinstimmung zu Siol *et al.* (2011) nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.4. Analyse der Retrotransposition und Transkription der C-Modul-Mutanten von TRE5-A<sup>BSR</sup>.**  
 (A) Schematische Darstellung des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons und der C-Modul Punktmutationen. (B) Analyse der Retrotransposition der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Mutanten im Stamm AX2 mit Angabe der Standardabweichung (n=10). (C) Gelelektrophoretische Analyse der Retrotransposition der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Mutanten anhand von genomischer DNA. (D) Gelelektrophoretische Analyse der Transkription anhand von spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid BSR-05). Die Kontrollen *mbsr1* (521 bp) und *mbsr* (441 bp) zeigen ungespleißten bzw. gespleißten Blastidicin-Resistenzmarker (Oligonukleotide bsr-02/bsr-06). bp: Basenpaare. A6P: Aktin-6-Promotor; ORF1: offener Leserahmen 1; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: splice donor-site; S.A.: splice-acceptor-site; C: C-Modul von TRE5-A; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin.

Um die Ergebnisse des Retrotranspositionsexperimentes zu verifizieren, wurde die Retrotransposition auf DNA-Ebene analysiert. Dies erfolgte mittels PCR an genomischer DNA von Blasticidin-resistenten Zellen im Vergleich zu G418-resistenten Zellen. Für alle verwendeten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons konnte die Retrotransposition (gespleißtes *mbsrl*-Gen, 441 bp) an genomischer DNA der Blasticidin-resistenten Klone nachgewiesen werden (Abb. 3.4 C). Des Weiteren wurde die Transkription der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons an spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid BSR-05) mittels PCR untersucht. Diese Analyse zeigte, dass bei allen artifiziellen Retrotransposons das *mbsrl*-Gen transkribiert und funktionell gespleißt wurde (441 bp; Abb. 3.4 D). Somit haben die zusätzlich eingebrachten Mutationen im C-Modul, ebenso wie in Siol *et al.* (2011), keinen Einfluss auf die Transkription der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Wiederherstellung der räumlichen RNA-Struktur des C-Moduls durch gezielte Punktmutationen auch zu einer Wiederherstellung der Retrotransposition führt, wenn auch nicht auf das gleiche Maß wie bei dem natürlichen C-Modul. Dies lässt vermuten, dass nicht nur die sekundäre Struktur des C-Moduls ein entscheidender Faktor für die Retrotransposition von TRE5-A ist, sondern auch die Art und Abfolge der einzelnen Basen.

### **3.1.2. Untersuchungen zur CbfA-abhängigen Retrotransposition von TRE5-A**

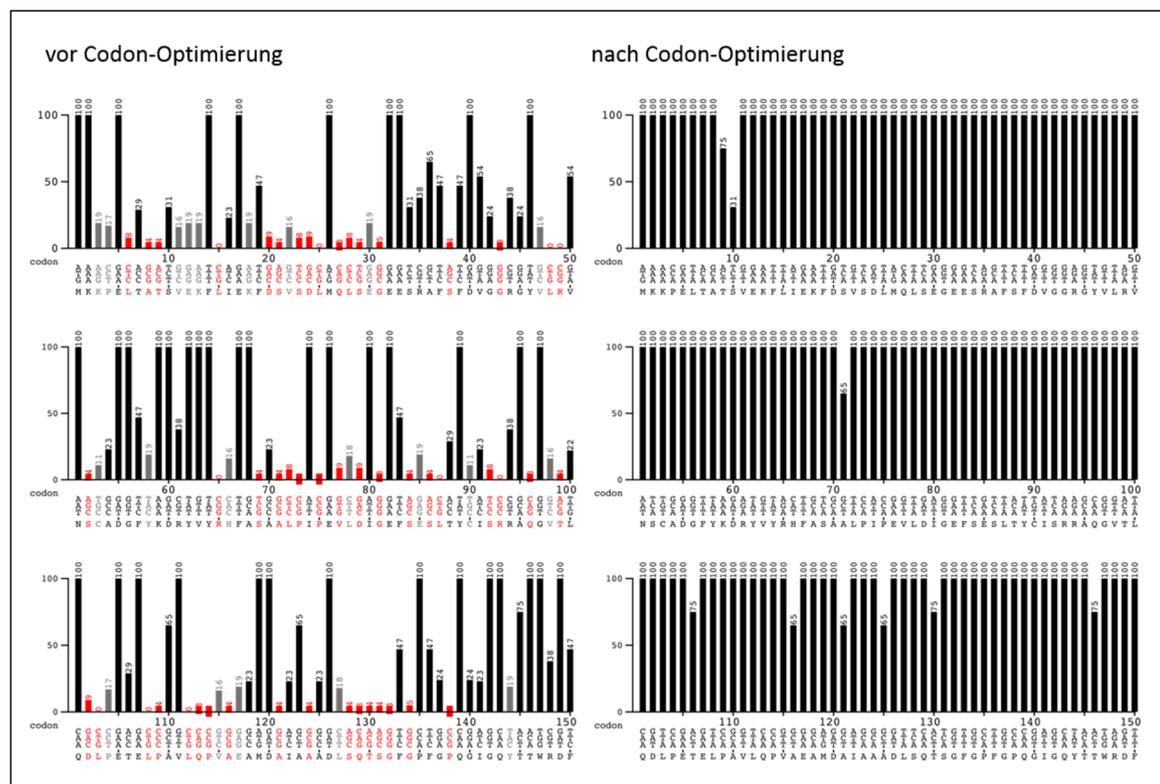
Aufgrund seiner Bindung an das C-Modul von TRE5-A wurde der C-Modul-bindende Faktor CbfA identifiziert (Geier *et al.*, 1996; Horn *et al.*, 1999). Um Untersuchungen an CbfA durchführen zu können, wurde der CbfA-Suppressionsstamm JH.D aus dem Stamm AX2 entwickelt (Winckler *et al.*, 2001). JH.D enthält ein *cbfA*-Gen mit einem *amber*-Stopp-Codon (UAG) und ein *amber*-Suppressor-tRNA-Gen (*glu(su)*), sowie ein Blasticidin-Resistenzgen, welche in das *cbfA*-Gen des Stammes AX2 eingeführt wurden. Dadurch wurde ein Großteil des ursprünglichen *cbfA*-Gens in 3'-Richtung verschoben. Zu ca. 80-95 Prozent entsteht ein C-terminal verkürztes Protein, da die Translation meist am *amber*-Stopp-Codon abbricht. Zu 5-20 Prozent kommt es zur Erkennung des *amber*-Stopp-Codons durch die *amber*-Suppressor-tRNA und dadurch zum Einbau von Glutaminsäure

und somit zur vollständigen Bildung von CbfA (Winckler *et al.*, 2001). Die Zellen von JH.D sind im Vergleich zu AX2 größer, zeigen eine verlangsamte Phagozytose- und Wachstumsrate (Winckler *et al.*, 2001) und weisen fast keine multizelluläre Entwicklung auf (Beck *et al.*, 2002). Sowohl für CbfA, als auch für dessen C-terminale-Domäne (CTD) konnte eine genregulatorische Funktion nachgewiesen werden (Lucas *et al.*, 2009), CbfA hat einen Einfluss auf die Retrotransposition von endogenen TRE5-A-Retrotransposons. Der Stamm JH.D weist eine Reduktion der Transkriptmenge (Plus- und Minusstrang-RNA) der endogenen TRE5-A um 90 Prozent, sowie eine reduzierte Retrotranspositionsfrequenz der endogenen TRE5-A auf (Beck *et al.*, 2002; Bilzer *et al.*, 2011). Beides lässt sich durch eine Komplementation mit CbfA in JH.D wieder erhöhen (Beck *et al.*, 2002; Bilzer *et al.*, 2011). Eine Komplementation mit der CTD von CbfA alleine führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Transkriptmenge der endogenen TRE5-A, aber überraschenderweise nicht zu einer Erhöhung der Retrotranspositionsfrequenz (Bilzer *et al.*, 2011). Einen Einfluss auf die Promotoraktivität des A- und C-Moduls von TRE5-A hat CbfA wahrscheinlich nicht (Bilzer *et al.*, 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun der Einfluss von CbfA auf die Retrotransposition der bereits beschriebenen artifiziellen nicht-autonomen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons von TRE5-A untersucht werden, um mögliche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zu endogenen TRE5-A-Retrotransposons herauszufinden. Das bereits etablierte Retrotranspositionssystem basiert jedoch auf der Entwicklung einer Resistenz gegen Blasticidin. Da die CbfA-Mutante JH.D bereits eine Blasticidin-Resistenz aufweist, kann dieses System in diesem Stamm so nicht angewendet werden. Dazu sollte der Blasticidin-Resistenzmarker (*mbsrl*) in den TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons gegen einen geeigneten anderen Selektionsmarker ausgetauscht werden. Hygromycin B ist neben Blasticidin S und G418 als weiteres Antibiotikum für die Selektion von *D. discoideum* geeignet (Egelhoff *et al.*, 1989), so dass ein genetisch markiertes TRE5-A<sup>HYG</sup> durch Konstruktion eines Hygromycin-Resistenzmarkers (*mhygl*) entwickelt werden sollte.

### 3.1.2.1. Etablierung eines mit einer Hygromycin-Resistenz markierten TRE5-A-Retrotransposons

Eine geringe Anzahl an chromosomal integrierten Kopien des Hygromycin-Resistenzgens (Hygromycin B-Phosphotransferase) aus *E. coli* führt nicht zu einer konstanten Resistenz von *D. discoideum* gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B (Egelhoff *et al.*, 1989). Auch die Nutzung von extrachromosomalen Plasmiden für die Einbringung des Gens in hohen Kopienzahlen in die Zelle führt nur zu unzureichenden Ergebnissen (Betapudi *et al.*, 2004). Um die Expression der Hygromycin B-Phosphotransferase in *D. discoideum* zu optimieren, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine Einzelkopie des Gens eine Resistenz gegen Hygromycin vermitteln kann, wurde das Gen aus *E. coli* (Gritz & Davies, 1983) im Codongebrauch an *D. discoideum* angepasst (Abb. 3.5).



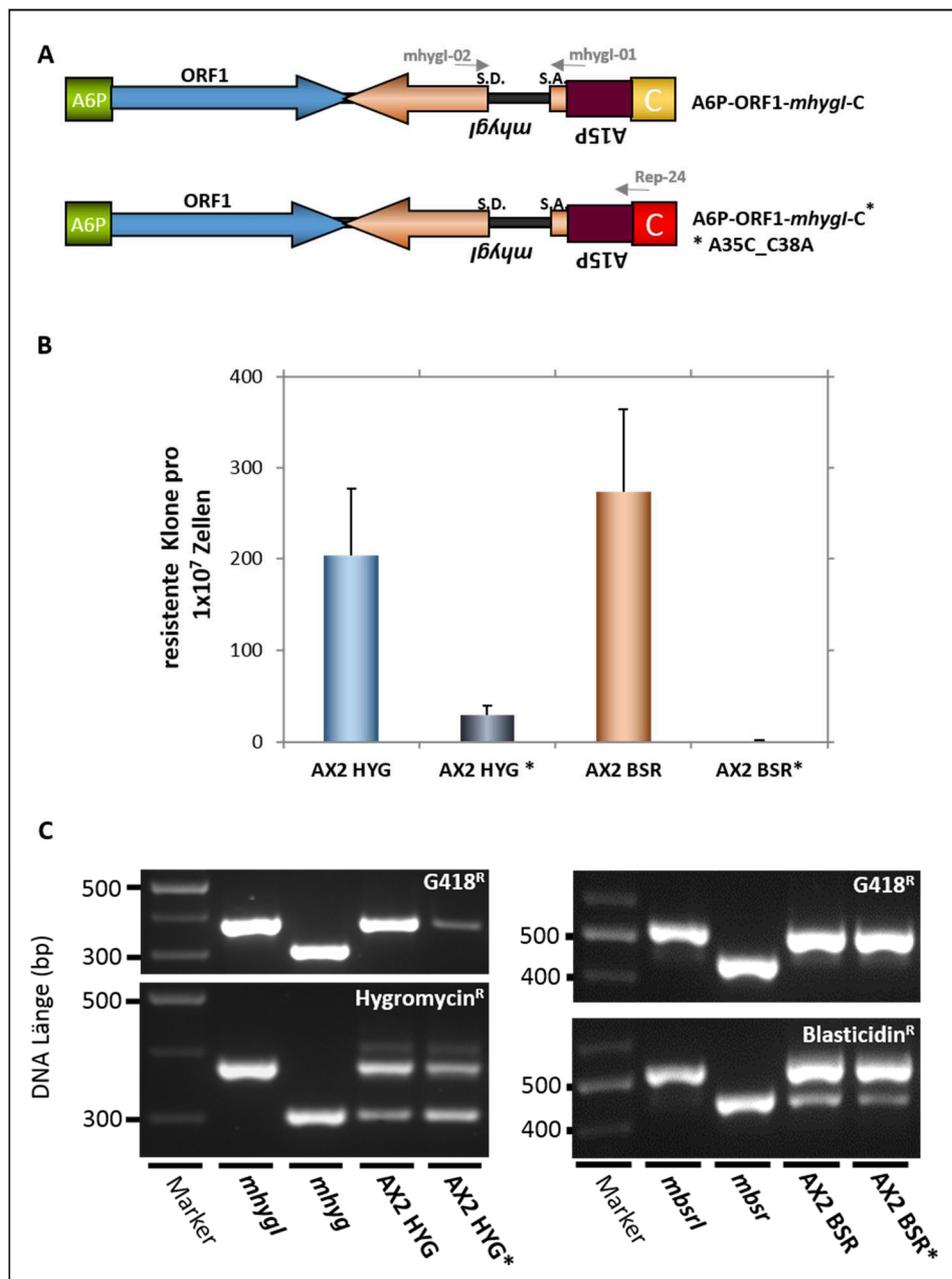
**Abbildung 3.5. Vergleich des Codongebrauches des Gens der Hygromycin B-Phosphotransferase in *D. discoideum* vor und nach der Codon-Optimierung.**

Darstellung eines Ausschnittes (150 Aminosäuren) des Codongebrauches des Gens der Hygromycin B-Phosphotransferase in *D. discoideum* vor und nach der Optimierung der originalen Sequenz aus *E. coli*.

Dazu wurden 319 von 1026 Basen (31 %) ausgetauscht, ohne dass die Aminosäuresequenz der Hygromycin B-Phosphotransferase verändert wurde. Der so synthetisierte Hygromycin-Resistenzmarker (*mhygl*) wurde zusammen mit dem Aktin-15-Promotor und einem reversen Intron (analog zum Blasticidin-Resistenzmarker *mbsrl*) an Stelle des Blasticidin-Resistenzmarkers in das Plasmid mit dem artifiziellen TRE5-A-Retrotransposon kloniert. Als Negativkontrolle wurde das artifizielle TRE5-A-Retrotransposon mit der \*A35C\_C38A-Mutation im C-Modul mit dem Hygromycin-Resistenzmarker ausgestattet (siehe Abschnitt 3.1.1 und Abb. 3.6 A). Diese C-Modul-Mutante von TRE5-A<sup>BSR</sup> weist eine nahezu vollständige Elimination der Retrotransposition von TRE5-A<sup>BSR</sup> im Stamm AX2 auf (Abb. 3.4 B; Siol *et al.*, 2011).

In einem ersten Schritt wurde die Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Vergleich zu den TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons im Stamm AX2 untersucht. Hierfür wurden die Retrotransposon-Plasmide jeweils mit dem Plasmid pISAR cotransformiert. Für das Retrotranspositionsexperiment wurden G418-resistente Zell-Populationen mit einer ähnlichen Anzahl an Kopien des *mbsrl*- bzw. *mhygl*-Gens im Genom verwendet. Die Analyse der Kopienzahl des *mbsrl*- bzw. *mhygl*-Gens erfolgte erneut durch *Real-Time*-PCR (Daten nicht gezeigt). Die Retrotranspositionsaktivität wurde durch die Anzahl der Blasticidin- bzw. Hygromycin-resistenten Klone pro  $1 \times 10^7$  Zellen ermittelt.

Die vergleichende Analyse zeigte, dass sich die TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons ähnlich zu den TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons im Stamm AX2 verhalten (Abb. 3.6 B). Bei beiden artifiziellen Retrotransposons findet in ähnlicher Häufigkeit Retrotransposition statt und diese lässt sich durch die \*A35C\_C38A-Mutation im C-Modul der artifiziellen TRE5-A stark reduzieren. Diese Daten zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Retrotranspositionsfrequenz der artifiziellen TRE5-A-Retrotransposons gibt, unabhängig davon ob die artifiziellen Retrotransposons mit einem Blasticidin- oder einem Hygromycin-Resistenzmarker ausgestattet sind.



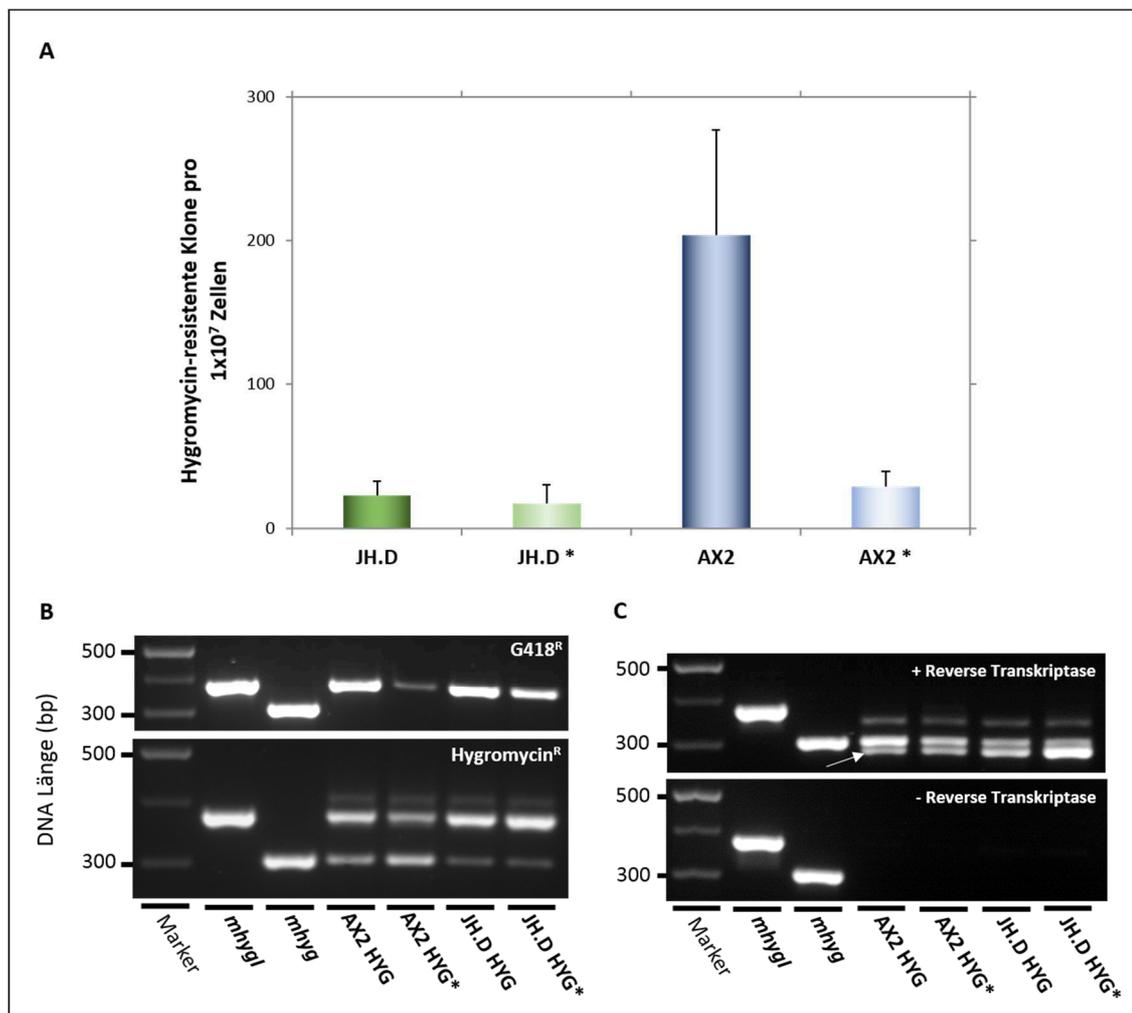
**Abbildung 3.6. Vergleich der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A<sup>BSR</sup> und TRE5-A<sup>HYG</sup>.**

(A) Schematische Darstellung der mit dem Hygromycin-Resistenzmarker (*mhygl*) markierten TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons. (B) Retrotranspositionsvergleich der TRE5-A<sup>HYG</sup>- und TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons im Stamm AX2 unter Angabe der Standardabweichung (n=10). (C) Gelelektrophoretische Analyse der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>- und TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons anhand von genomischer DNA. Die Kontrollen *mbsrI* (521 bp) und *mbsr* (441 bp) zeigen ungespleißten bzw. gespleißten Blasticidin-Resistenzmarker (Oligonukleotide bsr-02/ bsr-06). Die Kontrollen *mhygl* (378 bp) und *mhyg* (298 bp) zeigen ungespleißten bzw. gespleißten Hygromycin-Resistenzmarker (*mhygl*-01/ -02: Oligonukleotide). \* Mutation A35C\_C38A im C-Modul; HYG: Hygromycin; BSR: Blasticidin; A6P: Aktin-6-Promotor; ORF1: offener Leserahmen 1; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: *splice donor-site*; S.A.: *splice-acceptor-site*; C: C-Modul von TRE5-A; A: Adenin; C: Cytosin.

Um diese Daten zu verifizieren, wurde zusätzlich die Retrotransposition anhand von genomischer DNA der TRE5-A<sup>BSR/HYG</sup>-Retrotransposons bestimmt. Hierzu wurde genomische DNA von G418-, sowie von Blasticidin S- und Hygromycin B-resistenten Zellen isoliert und diese per PCR auf Retrotransposition überprüft. Die Oligonukleotide für den Hygromycin-Resistenzmarker liegen wie für den Blasticidin-Resistenzmarker oberhalb und unterhalb vom Intron (Abb. 3.6 A). Im Falle einer Retrotransposition wird das Intron herausgespleißt, weshalb Hygromycin-resistente Klone ein kleineres PCR-Produkt (ohne Intron) aufweisen. Von beiden markierten TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons konnte korrespondierend zu den TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons im Stamm AX2 Retrotransposition anhand des gespleißten *mhygl*-Gens (298 bp) bzw. des gespleißeten *mbsrl*-Gens (441 bp) nachgewiesen werden (Abb. 3.6 C). Dies zeigt, dass auch die artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons mobilisiert werden konnten.

Um die obigen Daten zu bekräftigen, wurde im Folgenden die Transkription der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Stamm AX2 untersucht. Die Überprüfung der Transkription des *mhygl*-Gens erfolgte mittels PCR anhand von spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-RNA (Oligonukleotid Rep-24). Die Analyse zeigte eindeutig das PCR-Produkt des *mhygl*-Gens ohne Intron (298 bp; Abb. 3.7 C). Dies deutet darauf hin, dass der Hygromycin-Resistenzmarker und somit das artifizielle Retrotransposon transkribiert und gespleißt wird. Des Weiteren tritt bei der Analyse der Transkription eine zusätzliche kleinere Bande (ca. 280 bp, Pfeil in Abb. 3.7 C) auf. Deren Ursache konnte bis zum Ende dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Da diese Bande jedoch nicht immer auftrat, könnte es sich um ein Artefakt der PCR handeln.

Die Daten zeigen, dass die nicht-autonomen artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons, vergleichbar zu den etablierten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons, nach erfolgreicher Transkription in das Genom integrieren. Die Retrotranspositionsfrequenzen beider Retrotransposons sind ebenfalls ähnlich. Somit lassen sich mit beiden Resistenzmarkern vergleichbare Ergebnisse erzielen, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons für die Untersuchungen im Stamm JH.D verwendet werden können.



**Abbildung 3.7. Vergleich der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A<sup>HYG</sup> in den Stämmen AX2 und JH.D.** (A) Retrotranspositionsvergleich der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in den Stämmen AX2 und JH.D unter Angabe der Standardabweichung (n=10). (B) Gelelektrophoretische Analyse der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Mutanten anhand von genomischer DNA. (C) Gelelektrophoretische Analyse der Transkription anhand von spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid Rep-24). Die Kontrollen *mhygl* (378 bp) und *mhyg* (298 bp) zeigen ungespleißten bzw. gespleißten Hygromycin-Resistenzmarker \* Mutation A35C\_C38A im C-Modul; HYG: A6P-ORF1-*mhygl*-C; HYG\*: A6P-ORF1-*mhygl*-C\*; bp: Basenpaare.

Mit den neu etablierten artifizialen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons sollte nun untersucht werden, ob deren Retrotransposition, ebenso wie bei den endogenen TRE5-A-Retrotransposons (Bilzer *et al.*, 2011), im Stamm JH.D reduziert ist. Dazu wurden die artifizialen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons jeweils zusammen mit dem Plasmid pISAR in die Stämme AX2 und JH.D cotransformiert. Für das Retrotranspositionsexperiment wurden G418-resistente Zell-Populationen mit einer ähnlichen Anzahl an Kopien des *mhygl*-Gens verwendet. Die Analyse der Kopienanzahl des *mhygl*-Gens erfolgte mittels *Real-Time*-PCR (Daten nicht gezeigt). Die Retrotranspositionsaktivität wurde durch die Anzahl der

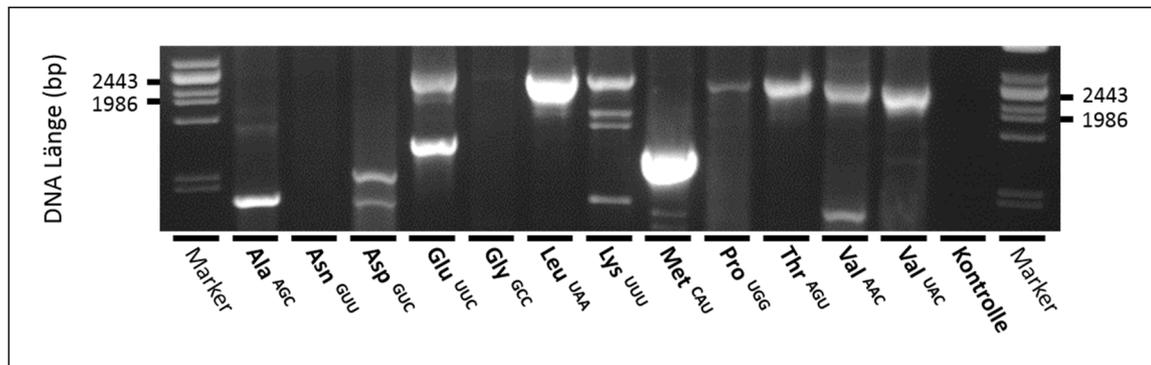
Hygromycin-resistenten Klone pro  $1 \times 10^7$  Zellen ermittelt. Die Untersuchung zeigte, dass die Retrotranspositionsfrequenz der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Stamm JH.D im Vergleich zu AX2 um das zehnfache reduziert ist (Abb. 3.7 A, dunkelgrüner Balken). Die Retrotransposition der Kontrollen mit der C-Modul-Mutation\* zeigt in beiden Stämmen keine Unterschiede und ist stark reduziert (Abb. 3.7 A).

Die Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Stamm JH.D wurde ebenfalls an genomischer DNA mittels PCR nachgewiesen und zeigt, dass diese nicht komplett zum Erliegen kommt. Hier ist im Vergleich zum Stamm AX2 kein Unterschied ersichtlich (Abb. 3.7 B). Diese Ergebnisse unterstützen die Daten aus Bilzer *et al.* (2011) hinsichtlich der reduzierten Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in der CbfA-Mutante JH.D.

In einem weiteren Schritt wurde die Transkription der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Stamm JH.D analysiert. Dies erfolgte mittels PCR an spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid Rep-24). Die Transkription zeigt keinen Unterschied zwischen den Stämmen AX2 und JH.D (Abb. 3.7 C). Dies deutet darauf hin, dass die artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons unabhängig von CbfA transkribiert werden. Eine Reduktion der Transkription, wie für endogene TRE5-A beschrieben (Bilzer *et al.*, 2011), konnte somit nicht gezeigt werden.

Um den Integrationsort der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Genom von AX2 zu lokalisieren, wurde dieser vergleichend zu den artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons (Siol *et al.*, 2011) ermittelt. Dies erfolgte mittels PCR an genomischer DNA von Hygromycin-resistenten Transformanten mit einem tRNA-Gen-spezifischen Oligonukleotid und dem Oligonukleotid mhygl-01, das komplementär am 5'-Ende des *mhygl*-Gens der integrierten TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons bindet. Da die einzelnen tRNA-Gene mit unterschiedlicher Häufigkeit als Integrationsziele „ausgewählt“ werden, konnte nicht für alle tRNA-Gen-Familien ein PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Als Vertreter für die unterschiedlichen tRNA-Gen-Familien wurden beispielsweise Thr<sup>AGU</sup> (Threonin) und Leu<sup>UAA</sup> (Leucin) ausgewählt. Das nach erfolgter Integration der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons erwartete PCR-Produkt (ca. 2.300 bp, Abb. 3.8) wurde aufgereinigt und sequenziert, um dessen Identität nachzuweisen und den Integrationsort genau definieren zu können. Die erhaltenen kleineren PCR-Produkte deuten auf am 5'-Ende trunkierte

TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons hin. Dies kann bei Non-LTR-Retrotransposons oft beobachtet werden, da sie meist nicht komplett revers transkribiert werden (Szak *et al.*, 2002).



**Abbildung 3.8. Lokalisation von mobilisierten TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons an tRNA-Genen.**

Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte (ca. 2.300 bp) des Oligonukleotids mhygl-01 und eines spezifischen tRNA-Gen Oligonukleotids an mit TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons transformierter genomischer AX2-DNA. bp: Basenpaare.

In Übereinstimmung zu den artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons konnte die Lokalisation einiger TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons an tRNA-Genen im Genom von transformierten AX2-Zellen nachgewiesen werden. Die Sequenzierung ermittelte eine Integration von TRE5-A<sup>HYG</sup> am tRNA-Gen Thr<sup>AGU</sup> auf Chromosom 1 mit einem Abstand von 49 Basenpaaren zum tRNA-Gen. Darüber hinaus konnte eine Integration von TRE5-A<sup>HYG</sup> am tRNA-Gen Leu<sup>UAA</sup> auf Chromosom 2 mit einem Abstand von 30 Basenpaaren lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt). Der Abstand von 49 Basenpaaren von TRE5-A<sup>HYG</sup> zum tRNA-Gen stimmt mit Literaturangaben überein (Beck *et al.*, 2002). Der Integrationsabstand von 30 Basenpaaren von TRE5-A<sup>HYG</sup> zum tRNA-Gen ist aber auch nicht ungewöhnlich und tritt als Folge von Deletionen der Ziel-Sequenz am 5'-Ende von TRE5-A auf (Beck *et al.*, 2002; Siol *et al.*, 2011).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es möglich war das Retrotranspositionssystem mit artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons zu etablieren. Es konnte gezeigt werden, dass Hygromycin B, nach Anpassung des Codongebrauches der Hygromycin B-Phosphotransferase, als zuverlässiges Antibiotikum für *D. discoideum* eingesetzt werden kann. Die artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons verhalten sich hinsichtlich der Retrotransposition wie TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons und eignen sich somit für Retrotranspositionsexperimente im Stamm JH.D. Damit konnte zum ersten Mal eine

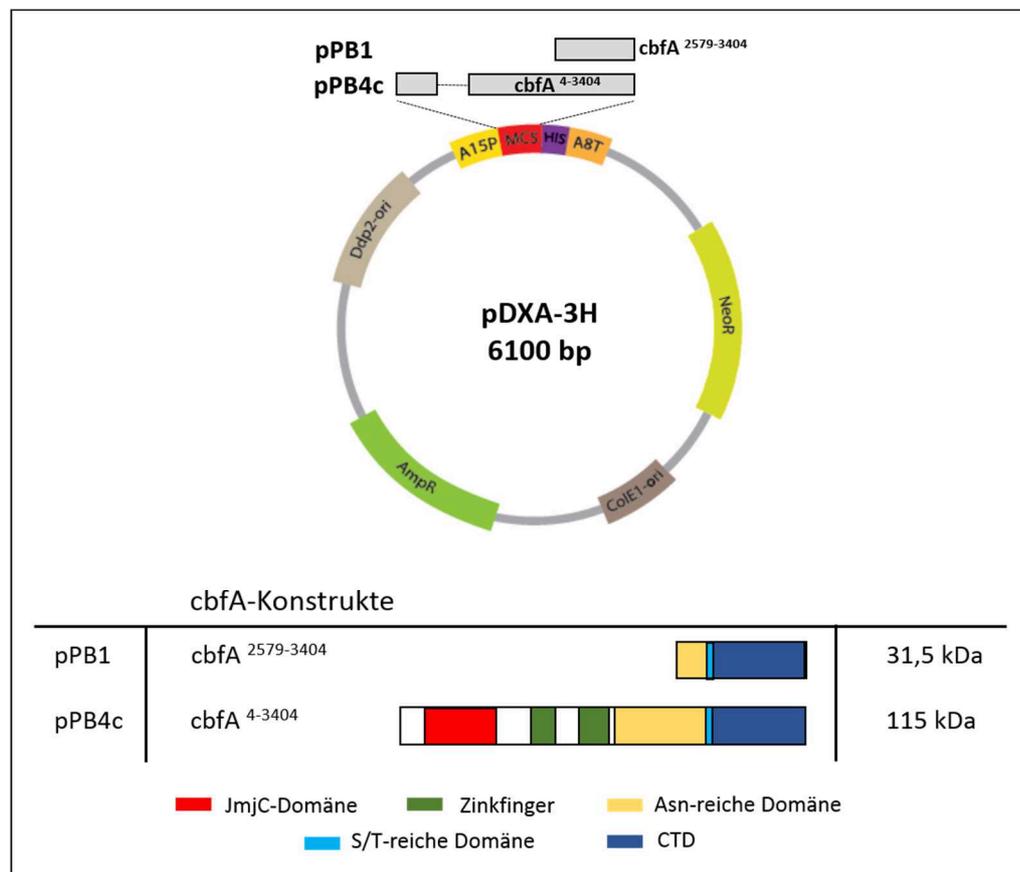
Retrotransposition von artifiziellen nicht-autonomen Retrotransposons in JH.D nachgewiesen werden. Hinsichtlich der verringerten Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A im Stamm JH.D konnten frühere Ergebnisse von endogenen TRE5-A (Bilzer *et al.*, 2011) mit diesen artifiziellen nicht-autonomen Retrotransposon bekräftigt werden. Allerdings ist die Transkription der artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup> von CbfA unabhängig und konnte so frühere Daten nicht bestätigen.

### **3.1.2.2. Die TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposition im Stamm JH.D ist nicht durch CbfA komplementierbar**

Nachdem sichergestellt wurde, dass TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons mobilisierbar sind, sollte im Folgenden die Abhängigkeit der Retrotransposition von CbfA im Stamm JH.D untersucht werden. Da aus früheren Studien hervorging, dass nicht nur CbfA eine entscheidende Rolle bei der Genregulation spielt, sondern auch dessen CTD regulatorische Funktion besitzt (Lucas *et al.*, 2009), wurden im Stamm JH.D vollständiges CbfA sowie dessen CTD exprimiert. Hierfür wurde zunächst das Expressionsplasmid pDXA-3H (ohne CbfA, Negativkontrolle), welches bei erfolgreicher Transformation G418-Resistenz vermittelt, oder die daraus abgeleiteten Plasmide pPB1 (mit CTD, Aminosäuren 724-998) oder pPB4c (mit CbfA, Aminosäuren 2-998) mit dem TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposon-Plasmid (A6P-ORF1-*mhygl*-C) in den Stamm JH.D cotransformiert (Abb. 3.9). Anschließend wurde an G418-resistenten Zell-Populationen die Expression von CbfA (115 kDa) oder dessen CTD (31,5 kDa) mittels *Western Blot* überprüft. Im untransformierten Stamm AX2 und in CbfA-komplementierten JH.D-Transformanten (pPB4c) konnte für beide Proteine die Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.10 A). Im untransformierten Stamm JH.D und den CTD-komplementierten JH.D-Transformanten (pPB1) ließ sich nur eine geringe Menge an CbfA nachweisen. Dagegen wird die CTD im Vergleich zum kompletten CbfA in den CTD-komplementierten JH.D-Transformanten (pPB1) deutlich stärker exprimiert (Abb. 3.10 A). Diese Daten zeigen, dass CbfA und dessen CTD in den komplementierten JH.D-Transformanten exprimiert werden.

Um zu überprüfen, ob die multizelluläre Entwicklung von JH.D durch Komplementation mit CbfA wieder regeneriert werden kann, wurden die komplementierten Stämme mittels

Phosphat-Agarplatten auf ihre Fähigkeit zur Durchführung des Entwicklungszyklusses überprüft. Die mit CbfA komplementierten JH.D-Zellen weisen eine multizelluläre Entwicklung auf (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass CbfA exprimiert wird und funktionell aktiv ist.



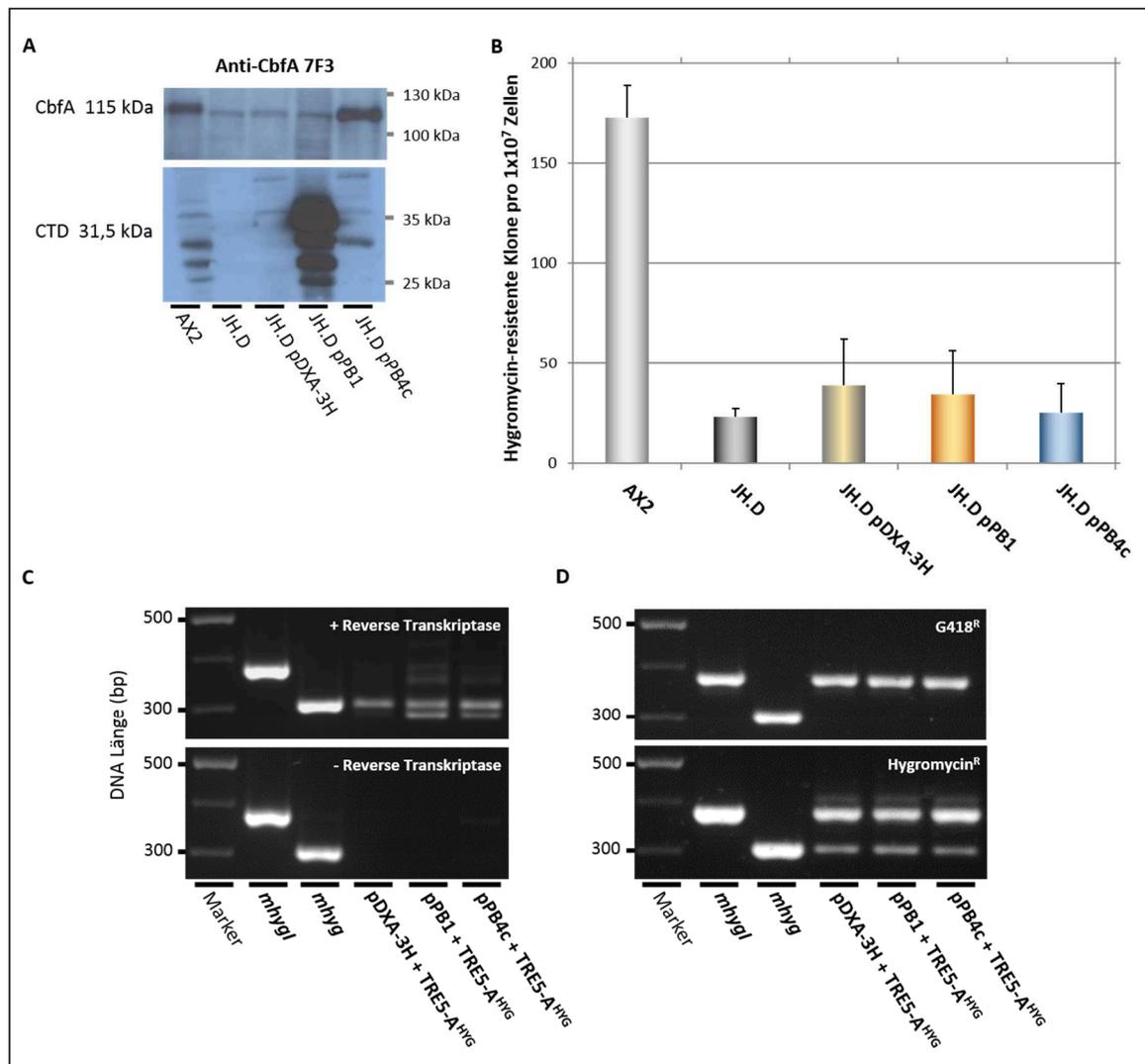
**Abbildung 3.9. Übersicht der zur Komplementation von CbfA und dessen CTD in JH.D verwendeten Plasmide.**

Die Expressionsplasmide pPB1 und pPB4c wurden durch Klonierung der CbfA-Konstrukte AS 724-998 und AS 2-998 in das Plasmid pDXA-3H hergestellt. Das Expressionsplasmid pDXA-3H ohne CbfA bzw. CTD diente als Negativkontrolle. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; A15P: Aktin-15-Promotor; A8T: Aktin-8-Terminator; MCS: *multiple cloning site*; His: HIS-Tag; NeoR: Neomycin-Resistenzgen (G418); ColE1-ori: Replikationsursprung für *E. coli*; Ddp2-ori: Replikationsursprung für *D. discoideum*; JmjC: Jumonji-Domäne; S/T: Serin und Threonin; CTD: C-terminale-Domäne. Abbildung modifiziert nach Dissertation A. Bilzer (2011).

Für den Zweck die Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in den komplementierten Stämmen mit den natürlichen JH.D- und AX2-Stämmen zu vergleichen, wurde in einem weiteren Schritt das Retrotranspositionsexperiment mit G418-resistenten Zell-Populationen durchgeführt. Bei diesen wurde wiederum mittels *Real-Time-PCR*

sichergestellt, dass sie ähnliche Anzahlen an *mhygl*-Gen Kopien enthielten (Daten nicht gezeigt). Die Retrotranspositionsfrequenz wurde durch die Anzahl der Hygromycin-resistenten Klone pro  $1 \times 10^7$  Zellen ermittelt. Die Auswertung des Retrotranspositionsexperimentes ergab, dass die Retrotranspositionsfrequenz der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im natürlichen Stamm JH.D und in der JH.D-Kontroll-Transformante (pDXA-3H) im Vergleich zum natürlichen Stamm AX2 wie erwartet stark verringert ist (Abb. 3.10 B). Somit wurden Ergebnisse aus Bilzer et al. (2011), in denen eine CbfA-abhängige Retrotransposition der endogenen TRE5-A-Population gezeigt wurde, mit den genetisch markierten Retrotransposons bestätigt. Überraschenderweise konnte die reduzierte Retrotransposition in den JH.D-Zellen weder durch Expression des vollständigen CbfA (Abb. 3.10 B, blauer Balken), noch durch Expression der CTD von CbfA (Abb. 3.10 B, orangener Balken) komplementiert werden. Hinsichtlich der Komplementation durch CbfA steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den Daten aus Bilzer et al. (2011).

Um die Resultate des Retrotranspositionsexperimentes zu verifizieren wurde eine PCR an genomischer DNA der Transformanten durchgeführt. In den Hygromycin-resistenten Klonen aller JH.D-Transformanten war eine Mobilisierung der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons (298 bp) nachweisbar (Abb. 3.10 D). Da die Retrotranspositionsfrequenz des natürlichen JH.D-Stammes der Retrotranspositionsfrequenz der JH.D-Transformanten entspricht, handelt es sich hier offensichtlich um die in JH.D residuale Aktivität der artifiziellen Retrotransposons (Abb. 3.10 B), die durch Expression von CbfA nicht gesteigert werden konnte. Um nachzuweisen, dass die fehlende Komplementation der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons kein Artefakt einer fehlenden Transkription der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons ist, wurde deren Transkription mittels einer PCR überprüft. Dazu wurde spezifisch erzeugte cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid Rep-24) der Komplementations-Transformanten analysiert. Damit konnte in allen Transformanten die Transkription der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons nachgewiesen werden (298 bp, Abb. 3.10 C). Mittels dieser Daten kann eine mangelnde Transkription der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons als Ursache für die fehlende Komplementation der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons durch CbfA ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.10. Untersuchung der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposition in Abhängigkeit von CbfA.**

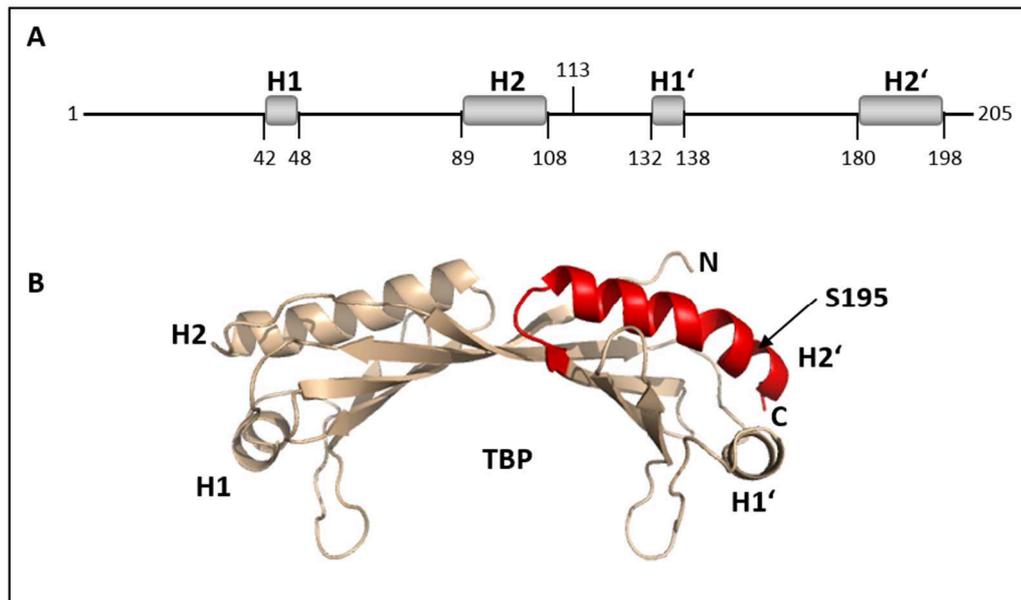
(A) Nachweis der Expression von CbfA (oben, 115 kDa) bzw. der CTD von CbfA (unten, 31,5 kDa) in den TRE5-A<sup>HYG</sup>-Komplementations-Transformanten im Vergleich zu AX2 und JH.D. *Western Blot* mit Anti-CbfA 7F3 Antikörper. (B) Auswertung der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Komplementations-Transformanten pro  $1 \times 10^7$  Zellen unter Angabe der Standardabweichung ( $n=6$ ) (C) Gelelektrophoretische Analyse der Transkription an spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid Rep-24). (D) Gelelektrophoretische Analyse der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons an genomischer DNA in den Komplementations-Transformanten. Die Kontrollen *mhyg1* (378 bp) und *mhyg* (298 bp) zeigen ungespleißten und gespleißten Hygromycin-Resistenzmarker (Oligonukleotide *mhyg1*-01/ *mhyg1*-02). pDXA-3H, pPB1, pPB4c: Komplementationsplasmide; bp: Basenpaare.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Retrotransposition der artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in Übereinstimmung zu Bilzer *et al.* (2011) von CbfA abhängig ist aber in JH.D nicht durch CbfA oder dessen CTD komplementiert werden kann. Die Transkription der artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons ist von CbfA unabhängig. Die

Ergebnisse stehen so größtenteils im Widerspruch zu den Daten von Bilzer *et al.* (2011), mit denen eine Komplementation der Retrotransposition endogener TRE5-A mit Gesamt-CbfA (aber nicht durch dessen CTD) und eine CbfA abhängige Transkription gezeigt werden konnte.

### **3.1.3. Untersuchung der Bedeutung der Protein-Interaktion des ORF1-Proteins von TRE5-A mit dem TBP-Protein von TFIIIB für die Retrotransposition**

Das TBP-Protein von *D. discoideum* besteht aus 205 Aminosäuren und hat eine Größe von 22,8 kDa. Es ist ein Bestandteil von TFIIIB und aller RNA-Polymerase-Komplexe (Chung *et al.*, 2007). Das Retrotransposon TRE5-A integriert spezifisch oberhalb von tRNA-Genen. Dies beruht wahrscheinlich auf einer Interaktion des eigenen ORF1-Proteins mit dem TBP-Protein von TFIIIB (Siol *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Protein-Interaktion findet wahrscheinlich der Präintegrationskomplex von TRE5-A seinen Integrationsort in der genomischen DNA. Für diese Protein-Interaktion ist die Helix 2' des TBP-Proteins von enormer Bedeutung (Abb. 3.11). Das lässt sich dadurch zeigen, dass durch einen Aminosäureaustausch in der Helix 2' an Position 195 von Serin zu Lysin (S195K) die Interaktion vollständig inhibiert wird (Chung *et al.*, 2007). Die Aminosäure 333 (Lysin) des humanen TBP entspricht der Aminosäure 195 (Serin) des TBP von *D. discoideum* und ist der bedeutendste Unterschied in der Helix H2' des TBP-Proteins der beiden Organismen. Diese Daten basieren allerdings bisher nur auf *in vitro*-Untersuchungen (Bakterien-Zweihybrid-System, *Pulldowns*). Daher sollte die Bedeutung der Protein-Interaktion zwischen TBP und ORF1 für die Erkennung des Integrationsortes von TRE5-A und damit auch für die Retrotransposition *in vivo* untersucht werden.



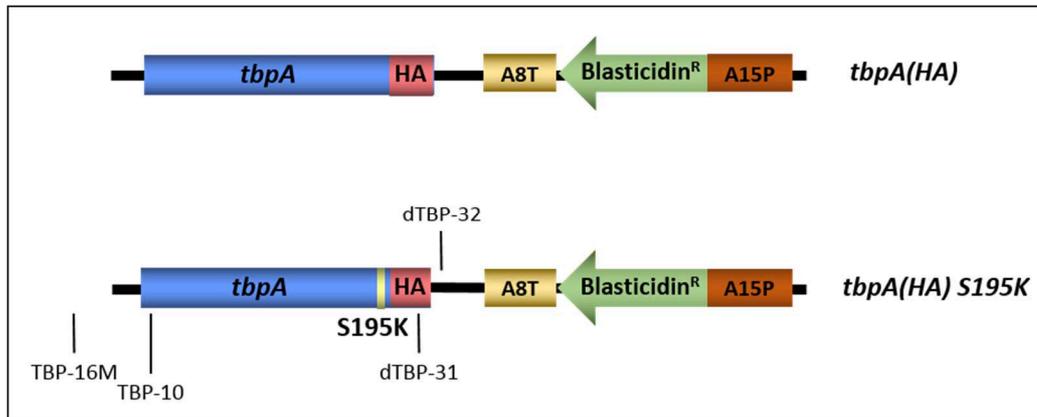
**Abbildung 3.11. Proteinstruktur von TBP aus *D. discoideum*.**

(A) Darstellung der Aminosäurepositionen der  $\alpha$ -Helices H1, H2, H1' und H2' des TBP-Proteins. (B) Homologiemodell des TBP-Proteins von *D. discoideum* unter Angabe der  $\alpha$ -Helices und des N- bzw. C-Terminus. Die Aminosäure 195 in Helix H2' ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Chung *et al.* (2007).

### 3.1.3.1. Herstellung und Charakterisierung von TBP-*knock-in*-Stämmen

Um die Bedeutung der Protein-Interaktion zwischen TBP und ORF1 *in vivo* zu untersuchen, sollten zunächst TBP-*knock-in*-Mutanten generiert werden. Da TFIIIB Teil der RNA-Polymerase-Komplexe ist und ein homozygoter *knock-out* der Untereinheit TBP letal ist (Martianov *et al.*, 2002), sollte ein *knock-in* des *tbpA*-Gens (dictyBase accession number DDB0185066) im haploiden Genom von *D. discoideum* erfolgen. Hierzu wurde das *tbpA*-Gen (Abb. 3.12) aus genomischer DNA amplifiziert und kloniert. Der HA-Tag und die Mutation S195K wurden danach mittels Einzelstrang-Mutagenese eingebracht. Der HA-Tag dient der Unterscheidung des *tbpA-knock-in*-Gens von dem endogenen *tbpA*-Gen. Die so entstandenen *tbpA(HA)*-Konstrukte wurden in den *Dictyostelium*-Expressionsvektor pKOSG-IBA-dicty1 kloniert (StarGate-System, IBA), welcher ein Blastocidin-Resistenzgen aufweist (Abb. 3.12). Diese *knock-in*-Plasmide wurden in den *D. discoideum*-Stamm DH1 transformiert um TBP(HA)- und TBP(HA) S195K-Stämme zu generieren. Die erhaltenen Blastocidin-resistenten Klone wurden hinsichtlich des *knock-in* von TBP(HA) getestet.

Zuerst wurde an genomischer DNA eine PCR mit den Oligonukleotiden TBP-16M und dTBP-31 durchgeführt. TBP-16M bindet am genomischen Promotor des *tbpA*-Gens während dTBP-31 spezifisch an der Sequenz des HA-Tags bindet (Abb. 3.12).

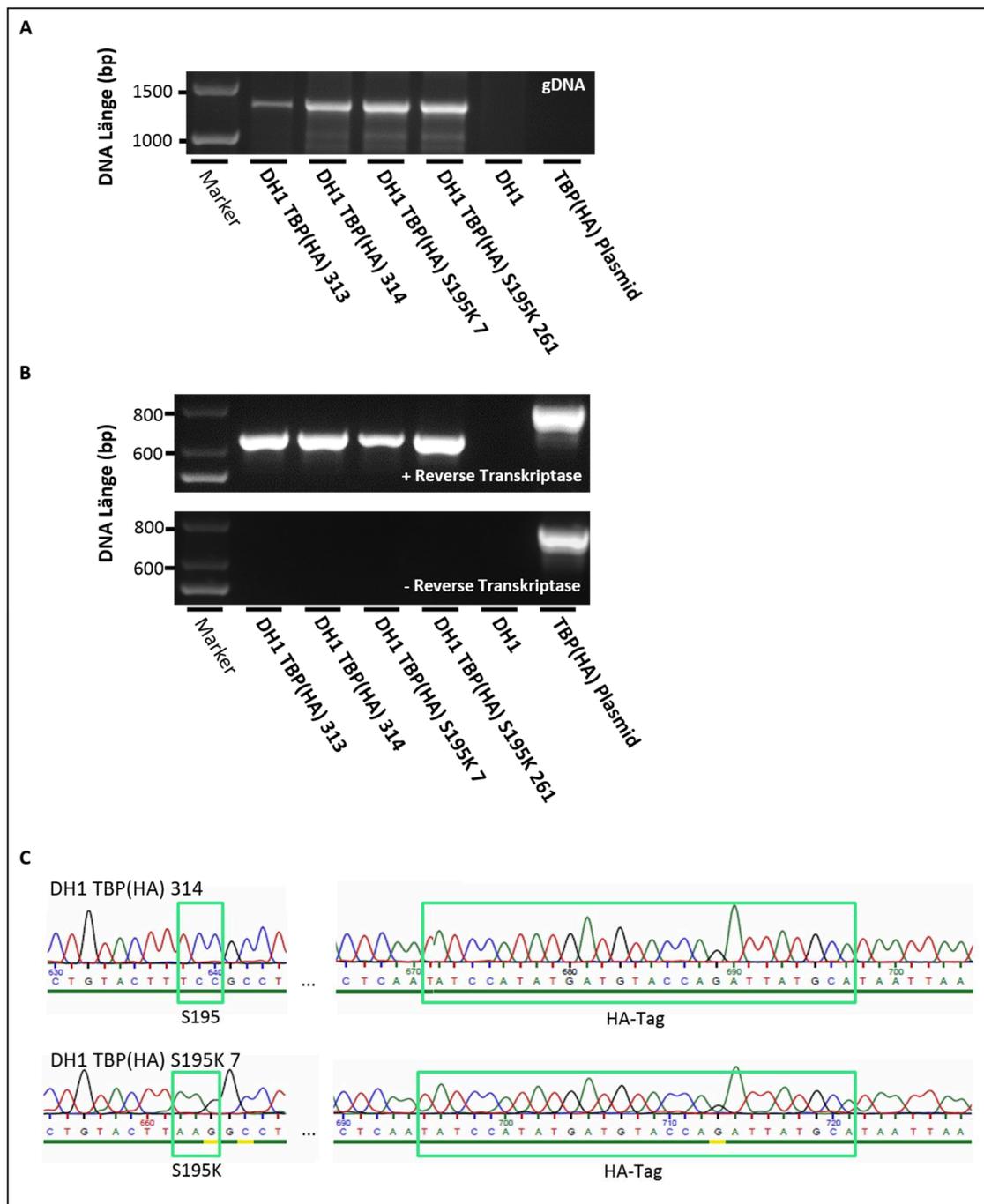


**Abbildung 3.12. Übersicht der *tbpA(HA)*-Konstrukte.**

Dargestellt sind die *tbpA(HA)*-Konstrukte für den *knock-in* mit natürlichem *tbpA*-Gen (oben) und mit zusätzlicher S195K-Mutation (unten). Zusätzlich sind die Bindestellen der für die PCRs verwendeten Oligonukleotide TBP-16M, TBP-10 und dTBP-31 angegeben. TBP-16M bindet in der Promotor-Region des *tbpA*-Gens im Genom und ist deshalb außerhalb des *tbpA(HA)*-Konstruktes dargestellt. HA: HA-Tag; A15P: Aktin-15-Promotor; A8T: Aktin-8-Terminator; <sup>R</sup>: Resistenz-Gen; S: Serin; K: Lysin.

Als Kontrolle diente genomische DNA von DH1-Zellen, sowie Plasmid-DNA von dem Expressionsplasmid pKOSG-IBA-dicty1-TBP(HA). Bei diesen sollte kein PCR-Produkt nachweisbar sein, da nur eines der beiden Oligonukleotide bindet. Mit Hilfe der beschriebenen PCR konnte das zu erwartende Produkt von 1.263 Basenpaaren und somit ein erfolgreicher *knock-in* des *tbpA*-Gens nachgewiesen werden (Abb. 3.13 A).

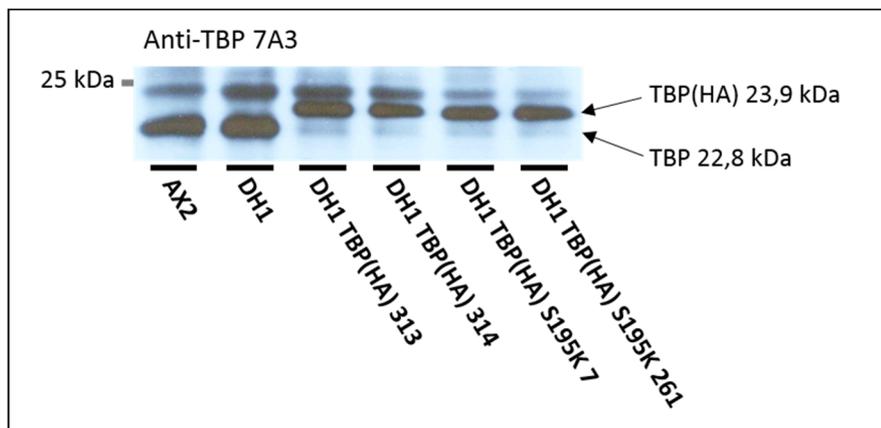
Um die Transkription von *tbpA(HA)* bzw. *tbpA(HA) S195K* zu verifizieren, wurde zelluläre RNA isoliert und diese mit einem oligo (dT)18-Oligonukleotid in cDNA umgewandelt. An der cDNA wurde mit den Oligonukleotiden TBP-10 und dTBP-31 die Transkription des *tbpA*-Gens untersucht. Als Kontrolle für die Spezifität der Oligonukleotide wurde cDNA von DH1-Zellen und die Plasmid-DNA von dem Plasmid pKOSG-IBA-dicty1-TBP(HA) verwendet. Da dTBP-31 nicht im Genom von DH1 bindet, sollte kein Produkt entstehen. Bei dem Plasmid pKOSG-IBA-dicty1-TBP(HA) sollte ein größeres PCR-Produkt als bei der cDNA der DH1-Transformanten entstehen, da es das genomische *tbpA*-Gen einschließlich Introns enthält. Mit Hilfe dieser Analyse konnte ein ca. 630 Basenpaare großes Produkt



**Abbildung 3.13. Charakterisierung der TBP(HA)-knock-in-Mutanten.**

(A) Gelelektrophoretische Analyse der PCR an genomischer DNA der *knock-in*-Mutanten. PCR-Produkt TBP-16M / dTBP-31; 1.263 bp. (B) Gelelektrophoretische Untersuchung der Transkription des *tbpA(HA)*-Gens mittels PCR an cDNA. PCR-Produkt TBP-10 / dTBP-31; 630 bp. Negativkontrolle: Plasmid-DNA von pKOSG-IBA-dicty1-TBP(HA) und cDNA vom Stamm DH1. (C) Sequenzausschnitte des PCR-Produktes TBP-10 / dTBP-32 anhand von je einem Klon pro *knock-in*. Darstellung des HA-Tags und Unterscheidung der Basensequenz hinsichtlich der S195K-Mutation. bp: Basenpaare; S: Serin; K: Lysin.

nachgewiesen werden, was der erwarteten Größe der *tbpA(HA)*- und *tbpA(HA) S195K*-Gene entspricht (Abb. 3.13 B). Diese Daten zeigen, dass die eingebrachten *tbpA(HA)*- und *tbpA(HA) S195K*-Gene in den *knock-in*-Klonen transkribiert werden. Für die anschließende Identitätsprüfung der Sequenz, wurde eine weitere PCR mit den Oligonukleotiden TBP-10 und dTBP-32 an cDNA durchgeführt (Abb. 3.12). Anhand der Sequenzen dieser PCR-Produkte konnten positive Klone (mit *HA-Tag* und *S195K-Mutation*) nachgewiesen werden. Als Beispiel sind Sequenzausschnitte von je einem Klon in Abb. 3.13 C dargestellt. In einem weiteren Schritt sollte die Expression des TBP(HA)-Proteins in den positiv getesteten Klonen verifiziert werden. Hierzu wurden Zellpellets lysiert und ein *Western Blot* durchgeführt. Dafür wurde der monoklonale Antikörper TBP 7A3 (gerichtet gegen TBP aus *D. discoideum*) verwendet. Damit konnte in den *knock-in*-Klonen eindeutig die Expression des TBP(HA)-Proteins (23,9 kDa) nachgewiesen werden, während in den Stämmen AX2 und DH1 eindeutig natives TBP (22,8 kDa) nachweisbar war (Abb. 3.14). Diese Daten zeigen, dass die Proteine von TBP(HA) und TBP(HA) S195K in den *knock-in*-Klonen exprimiert werden.



**Abbildung 3.14. Expression der TBP(HA)-*knock-in*-Mutanten.**

Darstellung der TBP- bzw. TBP(HA)-Expression in den *knock-in*-Mutanten und Kontrollen mittels *Western Blot*. Antikörper: Anti-TBP 7A3. Protein ohne *HA-Tag* 22,8 kDa. Protein mit *HA-Tag* 23,9 kDa.

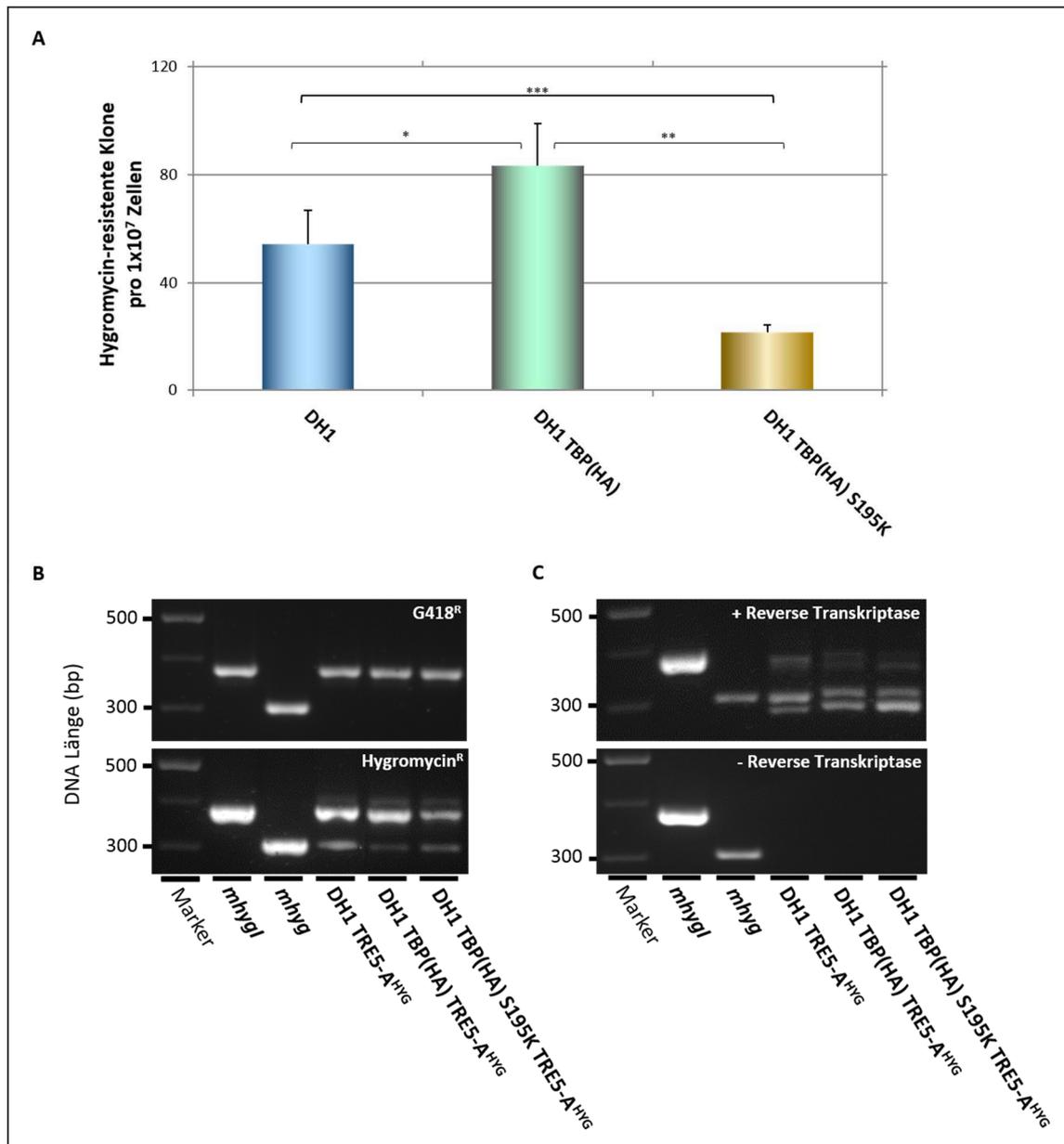
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es gelungen ist, TBP(HA)- und TBP(HA) S195K-Stämme über einen *knock-in* zu generieren. Somit konnte ein *in vivo*-Testsystem für die Untersuchung der Bedeutung der ORF1-TBP-Protein-Interaktion für die Retrotransposition von TRE5-A entwickelt werden.

### 3.1.3.2. Retrotransposition von TRE5-A<sup>HYG</sup> in TBP(HA)-*knock-in*-Mutanten

Die erfolgreich etablierten *knock-in*-Mutanten wurden im Folgenden für *in vivo*-Untersuchungen genutzt, um die Bedeutung der ORF1-TBP-Protein-Interaktion für die Retrotransposition von TRE5-A zu analysieren. Für die *in vivo*-Experimente wurden TBP (HA)- und TBP(HA) S195K-Mutanten gleichzeitig mit dem Plasmid pISAR (enthält G418-Resistenzgen) und dem Plasmid des artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons (A6P-ORF1-*mhygl*-C) transformiert. Als Vergleich diente der mit dem TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposon und pISAR transformierte Stamm DH1.

Für die Retrotranspositionsexperimente wurden G418-resistente Zell-Populationen mit annähernd gleicher Kopienzahl des Hygromycin-Resistenzmarkers verwendet. Dies wurde mittels *Real-Time*-PCR sichergestellt (Daten nicht gezeigt). Die Retrotransposition wurde anhand der Hygromycin-resistenten Klone pro  $1 \times 10^7$  Zellen ermittelt. Die Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons ließ sich erfolgreich in den *knock-in*-Mutanten nachweisen (Abb. 3.15). Interessanterweise ist die Retrotranspositionsfrequenz in der TBP(HA)-Mutante von DH1 (grüner Balken) etwas höher als im Stamm DH1 (Abb. 3.15 A, blauer Balken). Der Effekt ist statistisch signifikant ( $p=0,005$ ), aber derzeit nicht erklärbar. Die Retrotransposition in der TBP(HA) S195K-Mutante (Abb. 3.15 A, gelber Balken) ist im Vergleich zur TBP(HA)-Mutante (grüner Balken) signifikant um 75 Prozent verringert. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in Abhängigkeit von TBP stattfindet und dass die Retrotransposition durch die ORF1-TBP-Protein-Interaktion beeinflusst wird.

Im Weiteren wurde die Retrotransposition mittels PCR an genomischer DNA der G418-resistenten Zellen im Vergleich zu den Hygromycin-resistenten Zellen untersucht. Durch das PCR-Produkt des gespleißten Hygromycin-Resistenzmarkers (298 bp) konnte die Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons ebenfalls an genomischer DNA in den TBP(HA)- und TBP(HA) S195K-Mutanten nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B). Zusätzlich wurde die Transkription des *mhygl*-Gens der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons mittels PCR an spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid Rep-24) in den TBP(HA)-Mutanten überprüft. Diese Analyse zeigte, dass die TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in den TBP(HA)- und TBP(HA) S195K-Mutanten transkribiert und gespleißt werden (298 bp, Abb. 3.15 C).



**Abbildung 3.15. Untersuchung der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposition im Wildtyp und in TBP(HA)- und TBP(HA) S195K-Mutanten von DH1.**

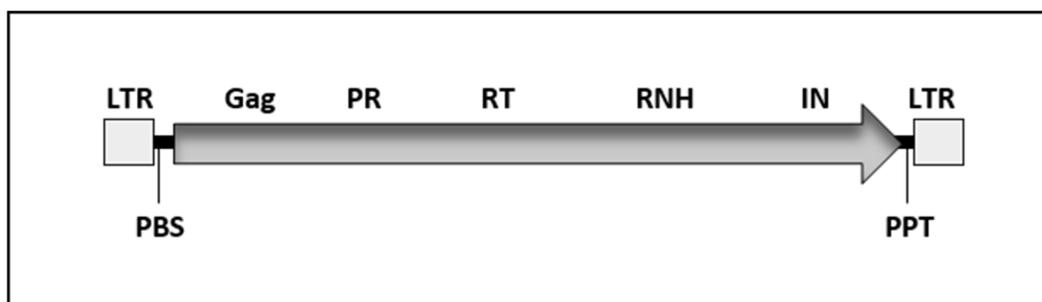
(A) Analyse der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in TBP(HA)-Mutanten von DH1 unter Angabe der Standardabweichung (n=10). Zweistichproben t-Test: \* p=0,005; \*\* p<0,001; \*\*\* p=0,0015. (B) Gelelektrophoretische Analyse der Retrotransposition der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in TBP(HA)-Mutanten von DH1 anhand von genomischer DNA. (C) Gelelektrophoretische Analyse der Transkription der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons anhand von spezifisch erzeugter cDNA der Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid Rep-24). Die Kontrollen *mhygl* (378 bp) und *mhyg* (298 bp) zeigen ungespleißten und gespleißten Hygromycin-Resistenzmarker (Oligonukleotide *mhygl*-01/ *mhygl*-02). bp: Basenpaare; S: Serin; K: Lysin.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Interaktion zwischen ORF1 von TRE5-A und dem TBP-Protein einen großen Einfluss auf die Retrotransposition von TRE5-A *in vivo* ausübt, da die Retrotransposition über die Mutation S195K im TBP-Protein stark verringert wird. Diese Daten unterstützen somit die Ergebnisse zur ORF1-TBP-Protein-Interaktion von Chung *et al.* (2007). Damit kann geschlossen werden, dass die ORF1-TBP-Interaktion wichtig für die Erkennung des Integrationsortes von TRE5-A oberhalb von tRNA-Genen ist.

## 3.2. Untersuchungen zum Integrationsmechanismus des Retrotransposons DGLT-A

### 3.2.1. Strukturelle Analyse des Retrotransposons DGLT-A

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das ebenfalls oberhalb von tRNA-Genen integrierende Retrotransposon DGLT-A hinsichtlich seiner Struktur und seines Integrationsmechanismus untersucht werden. Da über das LTR-Retrotransposon DGLT-A von *D. discoideum* bis jetzt wenig bekannt ist, wurde dieses zunächst anhand seiner DNA-Sequenz untersucht und dessen Struktur charakterisiert. Hierfür wurde die Konsensus-Sequenz von DGLT-A (dictyBase AF298204; Glöckner *et al.*, 2001), welche aus Genomprojektdaten erstellt wurde, mit anderen gut beschriebenen LTR-Retrotransposon verglichen. Das Retrotransposon DGLT-A besteht im Gegensatz zu anderen LTR-Retrotransposons aus nur einem ORF, der von zwei LTRs flankiert wird (Abb. 3.16; Glöckner *et al.*, 2001). Die LTRs von DGLT-A treten im Genom von *D. discoideum* auch einzeln auf (Solo-LTRs) und sind das Ergebnis von Rekombinationsereignissen. Diese Solo-LTRs wurden ursprünglich als repetitive Elemente definiert, als sogenannte *Hind3-repeats*, bevor sie durch das *D. discoideum*-Genomprojekt dem DGLT-A-Retrotransposon zugeordnet wurden (Hofmann *et al.*, 1991; Glöckner *et al.*, 2001).



**Abbildung 3.16. Struktur des LTR-Retrotransposons DGLT-A.**

Darstellung der Struktur von DGLT-A. Der ORF (1.437 Aminosäuren) codiert für 5 Proteine und wird von den LTRs flankiert. Ebenso sind die mögliche tRNA-Primer-Bindestelle (PBS), sowie die Polypurin-Bindestelle (PPT) dargestellt. LTR: *long terminal repeat*; Gag: *group-specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase. Abbildung modifiziert nach Winckler *et al.* (2003).

Die Sequenzen des vorderen und hinteren LTRs sind identisch und haben die gleiche Orientierung. Die durchschnittlich 268 Basenpaare langen LTRs (Glöckner *et al.*, 2001) beginnen und enden mit der Sequenz 5'-TGTAATAAAG...CTTTATTACA-3', welche dem für Retrotransposons typischen 5'-TG...3'-CA Motiv entspricht (Abb. 3.17, gelb; Boeke & Chapmann, 1991). Neben dieser Sequenzwiederholung tritt innerhalb des LTRs eine invertierte Sequenzwiederholung auf (AGTTGACA; Abb. 3.17, rot). Weiterhin kann eine mögliche TATA-Box (U3-Region; TATAAATA; Abb. 3.17, blau), sowie eine Polyadenylierungssequenz (R-Region; AATAAA; Abb. 3.17, grün) identifiziert werden. Die mRNA von DGLT-A würde demnach, entsprechend zu anderen LTR-Retrotransposons (Sandmeyer & Clemens, 2010), von R-U5 bis U3-R reichen. Der LTR von DGLT-A kann somit in die für Retrotransposons typische U3-R-U5-Struktur eingeteilt werden.

```

TGTAATAAAGTTACTCTATAAAAATTAATAGATATTAATATGCATATTAC
ATTACTAATTATAGTTGACACACATTTAAATAATATAATAATAATAATAA
TAATACGTCAACTCATATAAATAATATAAATACTAAAGAATAATTTTA
TAAACAATATTGAATATTATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AAAGTATTATTCAATTATATAATTATTAATTATATATATTTATAAAGCTA
ACAAGCTTTATTACA

```

**Abbildung 3.17. DNA-Motive innerhalb der LTR-Sequenz des Retrotransposons DGLT-A.**

Darstellung der vermeintlichen DNA-Motive im LTR des Retrotransposons DGLT-A anhand der Basensequenz. Gelb: endständiges invertiertes Sequenzmotiv 5'-TG...3'-CA; rot: interne invertierte Sequenzwiederholung; blau: TATA-Box; grün: Polyadenylierungssequenz.

Im Anschluss an den 5'-LTR befindet sich eine 192 Basenpaare lange untranslatierte Region. Diese enthält die mögliche tRNA-Primer-Bindestelle (ca. 18 bp), welche gewöhnlich den Beginn der Reversen Transkription der *minus-strand strong-stop*-DNA darstellt (Abb. 3.16). Diese tRNA-Primer-Bindestelle beginnt mit dem für Primer-Bindestellen typischen Trinukleotid TGG (Neuveglise *et al.*, 2002). Eine Zuordnung der tRNA-Primer-Bindestelle zu einem tRNA-Gen war leider nicht möglich. Korrespondierend zu anderen Retrotransposons befindet sich oberhalb des 3'-LTRs von DGLT-A eine Polypurin-Bindestelle, welche als Start für die Reverse Transkription der *plus-strand strong-stop*-DNA dient. Diese überlappt mit dem 3'-Ende des ORFs, endet zwei Basenpaare vor dem Beginn des 3'-LTRs und hat die Sequenz TAAAAGGGGGGA (Stopp-Codon des ORFs unterstrichen).

Der einzige ORF von DGLT-A besteht wahrscheinlich aus einem *gag*- und einem *pol*-Teil und codiert für 1.437 Aminosäuren. Der *gag*-Teil des ORFs enthält eine N-terminal der Protease-Domäne gelegene Region. Diese weist zwar keine Ähnlichkeit zu anderen Retrotransposons bzw. Retroviren auf, kann aber aufgrund ihrer Position im Retrotransposon und dem Vorkommen eines Zinkfinger-ähnlichen Motivs (CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>HX<sub>4</sub>C; Narayanan *et al.*, 2006) als Retrovirus-ähnliche *Gag*-Domäne bezeichnet werden (Abb. 3.18, orange).

```

MSNNENVIFSGDGKGLSFRKFKHLLLLIHGEEISKADIIRKLRNNALEYA
ATLDTDLTAMEIIEDLKDADFIDGSDDDLSDLTKLGEYKYNTLDILVGKFL
SKCSAVDISEKFKIQLFYSAVGIELGIEITKCAPKSLKRAIDIAKSCEDG GAG
SIRMRGRSMYTGQLVAKTLQEFGTQKYLGS GSGYTTSPQYVTSQTEQSTE
TEVLATPIYKNQTYSPPPSPYKAPQNQVNSITKFCCKYCKKKGHVIQECWS
KDKKNYNENKQSYNNHSTNAITMVNDKTINSIGTDSMNAALLINDKNVR
RLVDTGSSSLTIWESIAKKLNLKVEGKSFSVNSASNEIKIVGSCDTIIK PR
LGKASAKGNVNIVKDNDTSIDCIFGVDTLIGLKLIIDCKEMIIKNLEFNV
GTRLITRETKPIVCKIDLNILEKVSKPMAELLIKNEEIFETKLSKPGSLI
DVEHSIKLTDENSVYTPPYKTPADKEFIEEYIKDALDKGIEKSDSSQ
YGSPIVLSRKNDKIRFCVNYKKLNDLTIKDRYPLPLISDCWYYLKDAKVF
SKIDLTSGYYQIKMKEEDKDKTTFVSHMGQFRYVVMPFGLCNAPATFQRY RT
MNELLKDELRSNIGFIDDCIIYSKNNEYHIEHVKLLFEKFKEKGALQI
TKCEFEKEEIKFLGYIVSKNGITYDSSKFNELLKTPPPSNQKELMKLLGT
VNYFRTFIKNFTHLTSSFYPLLKGVNFKWTDELENDRVKLFTTLAQTNL
LSFPQDTDDNVIETDASIIGIGGVMIQNGKPVSYYSRTLNNAEKNYSVTE
RECLAIIESIKYFKSYINGRKVKIITDHQPLKYLLTGKFTDRITRWTVLL RNH
QEYNYEIIYRPGKENFLADALSRCPDRDQQPIDCDIPEKIFTITHYPVAS
PSTTILPRVLPSRSNQTSNVSPATTIQPPNSSSSNQSSNIPPTTNQSSNI
TNQPINTSSMNLNQSLNPPSLITNQATTARLLNSVPISINNDNINTTIP
QFTQESIRKELEKENYRAMYKLEETRLPDNAQAARRILLESEFYSMIN
GFLCHGLKHTLSSKKSHFKHLQIVVPKTMTKWIMEIFHDSPLTGGHFGLL
KTVAKIKERFYWIGMIKDIKEFIDKCTTCLQIKRKYGPKEGLLIPIEIEP
EPFNTIGIDFIGPITKDNAQVYLLVMDYFTKWPEVFFTLDMEGETVAQL
LLYEIYTRYGVPKKLVSDRGKNFLSNVVSGVNKLFGVHKLTTTAYHPQCD IN
GQTENFNNTLIKMLKAFIGNELYGNWGELLRCVLYSRITPHVSTGFSPF
FLIFNRQPTLPLDTTLNVNFYSNSLRLDFADNYAQSVNNNLKRAFWFTKN
NHNRPTNIQTGDFVYLHTPYSQTSIGPKKFYKPWRGPFKIQEKVSDVTFK
LDMGNLRDHKVVNIERLKKIFN

```

**Abbildung 3.18. Domänen und DNA-Motive innerhalb der ORF-Sequenz des Retrotransposons DGLT-A.**

Darstellung der möglichen DGLT-A-Domänen und DNA-Motive anhand der Aminosäuresequenz. Orange: *Gag*-ähnliche Domäne (GAG) mit dem Zinkfinger-ähnlichen Motiv CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>HX<sub>4</sub>C (schwarz). Grün: Protease-Domäne (PR) mit DTGS-Motiv (Asp-Thr/Gly-Ser; schwarz). Blau: Reverse Transkriptase-Domäne (RT). Violett: Ribonuklease H-Domäne (RNH). Gelb: Integrase-Domäne (IN) mit den HX<sub>3-7</sub>HX<sub>23-32</sub>-CX<sub>2</sub>C-, DD(35)E- und GPY/F-Motiven (schwarz).

Der *pol*-Teil des ORFs enthält eine Protease- (Aminosäuren 287-384), Reverse Transkriptase- (Aminosäuren 492-716), Ribonuklease H- (Aminosäuren 766-881) und Integrase-Domäne (Aminosäuren 1089-1416). Die Abfolge der Domänen und die Aminosäuresequenz der Reversen Transkriptase sind typisch für die Gruppe der Ty3/*gypsy*-ähnlichen Retrotransposons (Eickbush, 1994; Winckler *et al.*, 2002). Innerhalb der Protease-Domäne (Abb. 3.18, grün) befindet sich ein DTGS-Motiv (Asp-Thr/ Gly-Ser) mit einem katalytischen Aspartat, welches ein Merkmal von retroviralen Pepsin-ähnlichen Aspartatproteasen ist (Davies, 1990; Simoes *et al.*, 2011). Innerhalb der Reversen Transkriptase-Domäne kommen, wie es auch für andere Reverse Transkriptase-Gene beschrieben wurde (Gladyshev & Arkhipova, 2011; Seckler *et al.*, 2011), konservierte RT-Motive (RT1-RT7) und eine *thumb*-Domäne vor. Diese dienen zur Bindung der *Primer*- und *Template*-Substrate (Gladyshev & Arkhipova, 2011; Seckler *et al.*, 2011). Ein Zinkfinger-ähnliches Motiv (HX<sub>3-7</sub>HX<sub>23-32</sub>-CX<sub>2</sub>C) befindet sich in der Integrase-Domäne, neben einer katalytischen DD(35)E-Domäne und einem GPY/F-Motiv (Abb. 3.18, gelb). Diese Motive sind wichtige Merkmale der Integrase von Retrotransposons und Retroviren (Johnson *et al.*, 1986; Khan *et al.*, 1991; Malik & Eickbush, 1999).

### **3.2.2. Analyse der endogenen DGLT-A-Retrotransposon-Population im Genom von *D. discoideum***

In einem weiteren Schritt sollte die Population des LTR-Retrotransposons DGLT-A hinsichtlich ihrer Größe und Zusammensetzung charakterisiert und die Integrationsorte im Genom von *D. discoideum* lokalisiert werden. Dazu wurden die Daten des Genomprojektes von *D. discoideum* (Eichinger *et al.*, 2005) verwendet, in welchem der *D. discoideum*-Stamm AX4 sequenziert wurde. Dieser wurde aus dem gleichen Stamm (NC4) wie der in dieser Arbeit verwendete Stamm AX2 entwickelt (Watts & Ashworth, 1970; Knecht *et al.*, 1986). Um die DGLT-A-Retrotransposons im Genom ausfindig zu machen, wurde die Konsensus-Sequenz von DGLT-A verwendet (dictyBase AF298204, Glöckner *et al.*, 2001). Da das DGLT-A-Retrotransposon aus einem ORF besteht, der von LTRs flankiert wird (Glöckner *et al.*, 2001), wurde das Genom von *D. discoideum* nach

codierenden DGLT-A-Retrotransposons sowie nach dessen Solo-LTR, dem *Hind3-repeat*, untersucht.

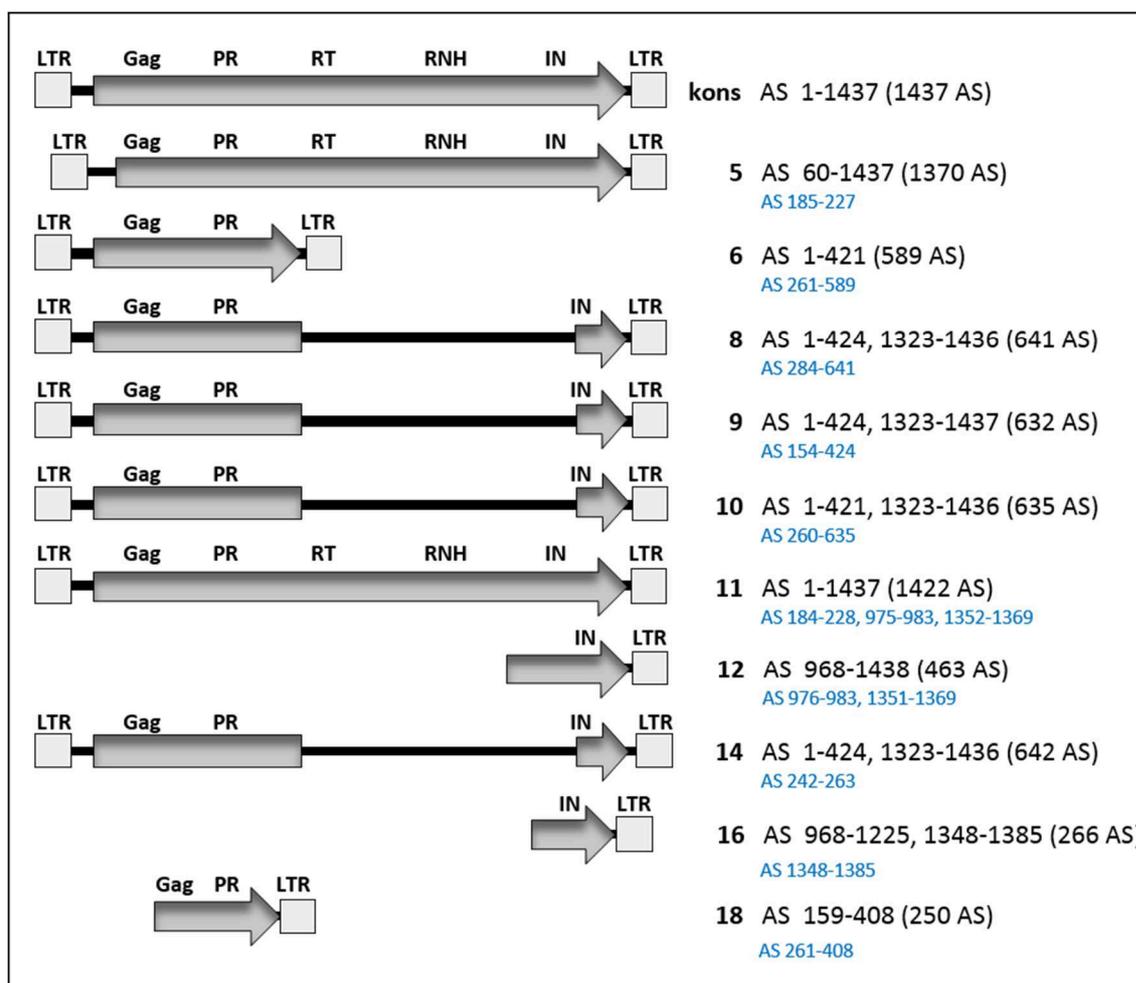
Insgesamt ließen sich 22 Integrationsorte des Retrotransposons DGLT-A lokalisieren (10 DGLT-A, 12 Solo-LTR). Das steht im Gegensatz zu Glöckner *et al.* (2001), wo 5 DGLT-A und 15 Solo-LTRs gefunden wurden. Die Integrationsorte sind auf alle Chromosomen verteilt (Tab. 3.1). Zunächst zeigte eine globale Analyse der Integrationsorte, dass von Integration 4 eine Kopie (Integration 7) auf Chromosom 2 existiert, die aufgrund einer Duplikation auf demselben Chromosom im Stamm AX4 entstanden ist (Eichinger *et al.*, 2005). Fast allen Integrationen konnte ein tRNA-Gen zugeordnet werden. Lediglich Integration 16 ließ sich aufgrund einer Datenlücke keinem tRNA-Gen zuordnen. Die Abstände zum tRNA-Gen entsprechen den zu erwartenden 10-30 Basenpaaren. Nur bei Integration 18 konnte der Abstand zum tRNA-Gen nicht genau zugeordnet werden, da sich hier ebenfalls eine Lücke unbekannter Länge in den Sequenzierungsdaten befindet. In einem weiteren Schritt wurden die Integrationen hinsichtlich ihrer Länge und Sequenz untersucht. Alle identifizierten DGLT-A-Retrotransposons zeichnen sich durch Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz bzw. der Länge des ORFs aus. So sind bei allen Integrationen Substitutionen, Deletionen oder Insertionen von Aminosäuren im Vergleich zur Konsensus-Sequenz zu finden (Abb. 3.19, blaue Schrift). Ein Vergleich der Länge der Aminosäuresequenz der jeweiligen ORFs der DGLT-A-Integrationen mit der Konsensus-Sequenz ergab, dass der ORF von 5 DGLT-As am C-Terminus um etwa die Hälfte verkürzt ist und 3 Integrationen (12, 16, 18) nur aus einem kleinen Teil des ORFs bestehen (Abb. 3.19). Interessanterweise gleichen sich die DGLT-A-Retrotransposons, deren ORF 3' verkürzt ist, in ihrer Länge, was auf eine Amplifikation dieser nicht-autonomen Derivate durch Retrotransposition hindeutet. Diese kurzen DGLT-A sind ab der Aminosäure 421-424 verkürzt und besitzen daran anschließend teilweise noch Anteile der Integrase-Domäne. Im Vergleich zum Konsensus ist DGLT-A 5 am N-Terminus 60 Aminosäuren kürzer. Von allen Integrationen weisen die Integrationen 5 und 11 die geringsten Unterschiede zur Konsensus-Sequenz auf.

**Tabelle 3.1. Untersuchung der Integrationsorte der endogenen DGLT-A-Retrotransposons in *D. discoideum*.**

Übersicht und strukturelle Eigenschaften der einzelnen Integrationsorte von DGLT-A und Solo-LTR (hier als H3R bezeichnet) auf den Chromosomen mit ihren zugehörigen Koordinaten. Zusätzlich sind die TRE-Integrationen in der Umgebung des tRNA-Gens, sowie die Reihenfolge der Integrationen der transposable Elemente angegeben. (+): Orientierung 5'-3'; (-): Orientierung 3'-5'; graue Schrift: Duplikation auf Chromosom 2; bp: Basenpaare; TSD: *target site duplication*, Zielsequenz-Verdopplung.

Integration	Chromosom	Solo-LTR DGLT-A	Position von von (bp)	DGLT-A/ LTR bis (bp)	Länge (bp)	TSD	Abstand zum tRNA-Gen (bp)	tRNA- Gen	Position des tRNA-Gens von (bp)	bis (bp)	TRE	Reihenfolge der Integrationen
1	1	H3R (+)	2.370.212	2.370.481	270	TTTA	13	Gln (-)	2.370.197	2.370.125	TRE3-B (-)	1. DGLT-A
2	1	H3R (+)	2.855.340	2.855.357	18	CTAA	14	Gln (-)	2.855.324	2.855.252	TRE5-A.2 (+)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
3	1	H3R (+)	3.256.893	3.256.911	18	TTTT	14	Ile (-)	3.256.877	3.256.805	TRE5-B (+)	1. DGLT-A 2. TRE5-B
4	2	H3R (+)	2.499.744	2.500.009	265	TTTGT	33	Met (-)	2.499.709	2.499.638	TRE5-C (+)	1. TRE5-C 2. DGLT-A
5	2	DGLT-A (+)	4.959.397	4.964.435	5038	TTTT	14	Met (-)	4.959.381	4.959.309	TRE3-B (-)	1. DGLT-A
6	2	DGLT-A (+)	6.168.656	6.171.232	2576	AAGA	14	Arg (+)	6.173.745	6.173.817	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A
7	2	H3R (-)	6.173.699	6.173.732	33						TRE3-B (+)	2. TRE5-A.2
8	2	H3R (-)	3.504.906	3.504.641	265	ACAAA	33	Met (+)	3.504.939	3.505.010	TRE5-C (-)	1. TRE5-C 2. DGLT-A
9	2	DGLT-A (-)	7.858.302	7.858.284	18	TTAG	14	Leu (-)	7.858.268	7.858.186	TRE3-A (+)	1. TRE5-C 2. DGLT-A
10	3	DGLT-A (+)	7.863.348	7.860.744	2604						TRE5-A.2 (+)	2. DGLT-A
11	3	DGLT-A (+)	2.700.623	2.703.220	2597	TTTC	14	Ile (-)	2.700.607	2.700.535	TRE3-A (-)	1. TRE5-B 2. DGLT-A
12	3	DGLT-A (+)	3.358.922	3.363.873	2639	CCGT	28	Val (-)	3.366.146	3.366.218	TRE3-A (+)	1. TRE5-B 2. DGLT-A
13	3	DGLT-A (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	14	Gln (+)	3.366.146	3.366.218	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
14	3	DGLT-A (+)	3.362.125	3.363.872	1747	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
15	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
16	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
17	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
18	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
19	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
20	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
21	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
22	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
23	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
24	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
25	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
26	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
27	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
28	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
29	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
30	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
31	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
32	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
33	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
34	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
35	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
36	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
37	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
38	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
39	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
40	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
41	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
42	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
43	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
44	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
45	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
46	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
47	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
48	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
49	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
50	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
51	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
52	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
53	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
54	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
55	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
56	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
57	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
58	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
59	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
60	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
61	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
62	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
63	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
64	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
65	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
66	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
67	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
68	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
69	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
70	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
71	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
72	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
73	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
74	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
75	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
76	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2
77	3	H3R (+)	3.366.115	3.366.133	18	TGAA	13	Gln (+)	3.366.147	3.366.219	TRE5-A.2 (-)	1. DGLT-A 2. TRE5-A.2

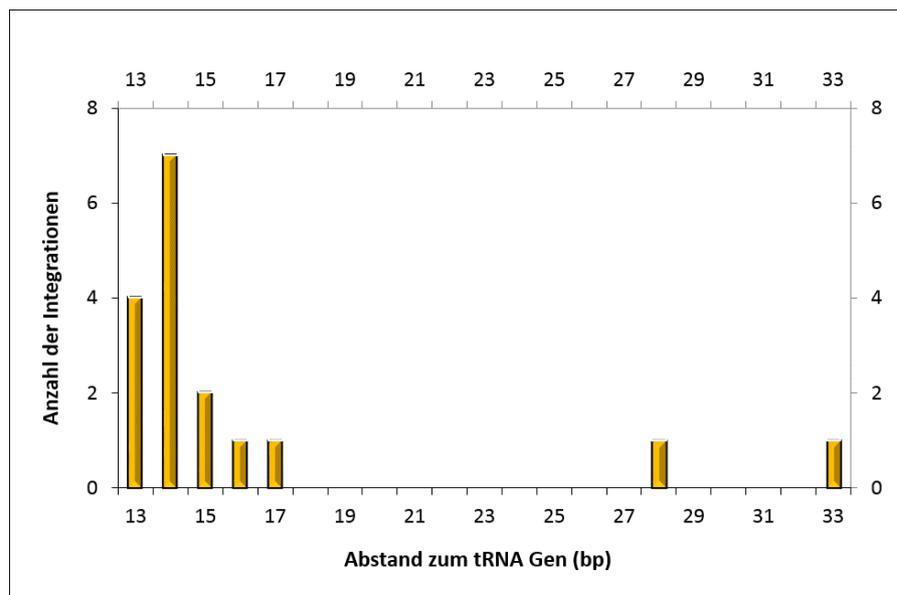
Ein Vergleich der einzelnen Solo-LTR-Sequenzen zeigte Unterschiede in der Länge bzw. Abfolge der Basensequenz. Die Konsensus-LTR-Sequenz ist 268 Basenpaare lang. Die meisten der gefundenen LTRs umfassen 256-272 Basenpaare. Die Ausnahme bilden die LTR-Sequenzen der Integrationen 15, 17, 20 und 21. Diese sind stark verkürzt und durch viele Deletionen, Insertionen oder Substitutionen von Basen gekennzeichnet. Die LTRs beginnen und enden, wie für LTR-Retrotransposons beschrieben (Leng *et al.*, 1998), mit der typischen 5'-TG...CA-3'-Sequenz.



**Abbildung 3.19. Charakterisierung der DGLT-A-Retrotransposons im Stamm AX4 exklusive Solo-LTRs.**

Vergleich der Struktur des ORFs der DGLT-A-Retrotransposons aus Tabelle 3.1 mit dem Konsensus basierend auf *Alignment*-Daten. In Klammern ist die absolute Anzahl an Aminosäuren (AS) des ORFs der einzelnen DGLT-A-Retrotransposons angegeben. Bereiche mit Aminosäureaustauschen, Deletionen bzw. Insertionen sind blau dargestellt. LTR: *long terminal repeat*; Gag: *group-specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase.

Des Weiteren wurde die Orientierung der DGLT-A-Retrotransposons analysiert. 7 Integrationen haben die gleiche Orientierung wie ihre benachbarten tRNA-Gene, die anderen 11 sind revers orientiert. Dies deutet darauf hin, dass das DGLT-A-Retrotransposon keine Orientierungsspezifität aufweist. Ein Vergleich der Abstände von DGLT-A bzw. der Solo-LTRs zu den tRNA-Genen zeigt eine Präferenz für einen Abstand von 13 und 14 Basenpaaren (Abb. 3.20). Allerdings weisen einzelne Integrationen auch einen Abstand von 15-17 bzw. 28 und 33 Basenpaaren auf. Lediglich zwei Solo-LTRs (17, 21) haben einen sehr großen Abstand zum tRNA-Gen von 470 und 484 Basenpaaren, was möglicherweise durch Rekombinationsereignisse oder unspezifische Integrationen hervorgerufen wurde. Diese Daten zeigen, dass DGLT-A deutlich näher an tRNA-Genen integriert als die TRE5-Retrotransposons, die im Durchschnitt einen Abstand von ca. 48 Basenpaaren aufweisen (Beck *et al.*, 2002).

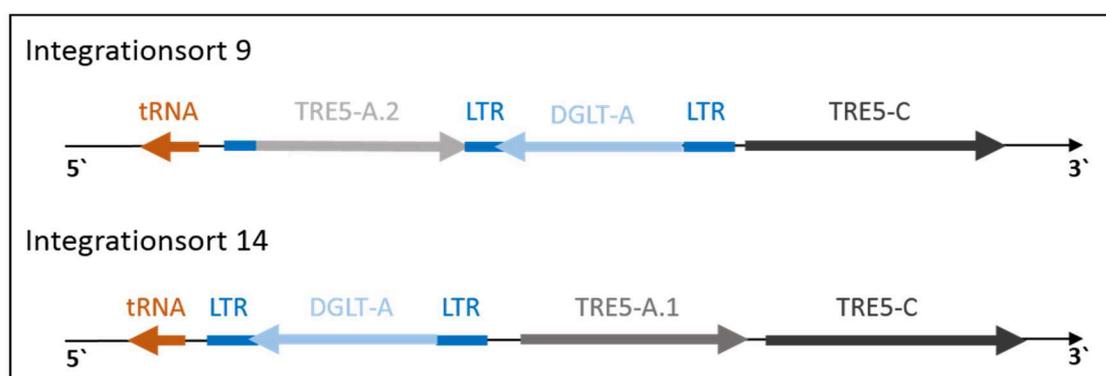


**Abbildung 3.20. tRNA-Gen-Abstände der endogenen DGLT-A-Population.**

Darstellung der Integrationen von DGLT-A im Vergleich zum Abstand des tRNA-Gens. bp: Basenpaare.

Für die ersten 14 DGLT-A-Integrationen lassen sich zudem Zielsequenz-Verdopplungen mit einer Länge von 4-5 Basenpaaren nachweisen (Tab. 3.1). Dies ist ein Merkmal vieler transposabler Elemente und entsteht bei der Integration (Kim *et al.*, 1998). Darüber hinaus lassen sich Integrationen von TRE-Retrotransposons finden, mit welchen Rückschlüsse auf die Reihenfolge der Integrationsereignisse beider Retrotransposons

getroffen werden können. So treten zum Beispiel bei dem DGLT-A-Integrationsort 9 ein TRE5-A.2- und ein TRE5-C-Retrotransposon in unmittelbarer Nähe auf. Das TRE5-C hat den größten Abstand zum tRNA-Gen, gefolgt von DGLT-A, dessen 3'-LTR von TRE5-A.2 unterbrochen wird. Somit lässt sich schließen, dass TRE5-C zuerst vor dem tRNA-Gen integriert ist, gefolgt von DGLT-A. TRE5-A.2 ist als letztes integriert und hat damit gemäß seines Integrationsabstandes zu den tRNA-Genen das 3'-Ende von DGLT-A auseinandergeschoben (Tab. 3.1, Abb. 3.21). Integrationsort 14 hat in unmittelbarer Nähe zum tRNA-Gen 3 transposable Elemente, ein DGLT-A, ein TRE5-A.1 und ein TRE5-C. Da TRE5-C den größten Abstand zum tRNA-Gen aufweist, integrierte es zuerst, gefolgt vom TRE5-A.1 und dem DGLT-A. DGLT-A integrierte zwischen dem tRNA-Gen und TRE5-A.1 und hat so beide TRE5-Retrotransposons vom tRNA-Gen in 3'-Richtung verschoben (Tab. 3.1, Abb. 3.21). Dies zeigt, dass anhand der Daten Rückschlüsse auf die Reihenfolge der erfolgten Integrationen an tRNA-Genen möglich sind und dass tRNA-Gene ein bevorzugter Integrationsort für Retrotransposons sind, unabhängig davon, ob bereits andere Retrotransposons integriert sind. Allerdings scheinen TRE- und DGLT-A-Retrotransposons nicht in bereits vorhandene Kopien des gleichen transposable Elementes zu integrieren. Das bedeutet für DGLT-A-Retrotransposons, dass sie durch nachfolgende Integrationen von TRE5-Retrotransposons beschädigt werden. Somit wurden von den identifizierten DGLT-As 8 durch nachträgliche TRE5-Integrationen zerstört (Tab. 3.1).



**Abbildung 3.21. tRNA-Gene als multiple Integrationsorte.**

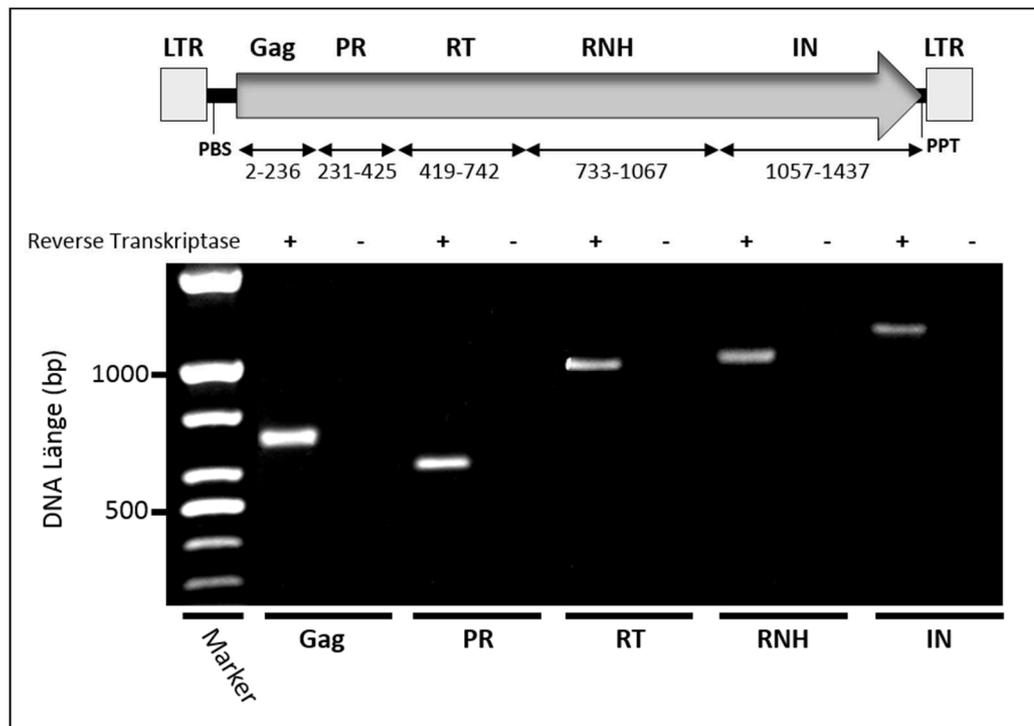
Darstellung der aus Tabelle 3.1 übertragenen DGLT-A Integrationsorte 9 und 14 mit den TRE5-Retrotransposons die am gleichen tRNA-Locus integrierten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die DGLT-A-Population in *D. discoideum* relativ klein ist. Die gefundenen DGLT-As sind meist am C-Terminus des ORFs stark verkürzt und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz vom Konsensus-Element. Darüber hinaus sind Solo-LTRs vorhanden, die möglicherweise aufgrund von Rekombinationsereignissen entstanden sind. Der Integrationsabstand zum tRNA-Gen beträgt im Durchschnitt 13-17 Basenpaare. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass tRNA-Gene als multiple Integrationsorte für mehrere Retrotransposon-Arten dienen. DGLT-A-Retrotransposons werden durch nachfolgende TRE5-Integrationen unterbrochen. Anhand der Daten lässt sich daher vermuten, dass es im Genom von *D. discoideum* keine kompletten DGLT-A-Retrotransposons mehr gibt. Es konnte aber nicht festgestellt werden, ob DGLT-A seine Eigenschaft zur Retrotransposition verloren hat.

### 3.2.3. Analyse der Transkription von DGLT-A

Die Genomanalyse hat gezeigt, dass neben den Solo-LTRs 10 degradierte DGLT-A-Retrotransposons im Genom von AX4 vorhanden sind. Der ORF dieser DGLT-As ist mehr oder weniger stark verkürzt, so dass nur zwei dieser DGLT-A-Retrotransposons zum Großteil mit dem Konsensus übereinstimmen. Um zu überprüfen, ob der ORF der DGLT-A-Retrotransposons in *D. discoideum* transkribiert wird, wurde die Transkription von DGLT-A im Stamm AX2 analysiert. Nach einer RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mit einem unspezifischen oligo(dT)<sub>18</sub>-Oligonukleotid wurden einzelne Bereiche des ORFs (Einteilung entsprechend der Proteindomänen) durch eine PCR amplifiziert. Für die einzelnen Bereiche wurden jeweils spezifische Oligonukleotide verwendet (Abb. 3.22). Mittels diesen PCRs konnten alle Bereiche des ORFs nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Dies zeigt eindeutig, dass der ORF der DGLT-A-Retrotransposons in *D. discoideum*-Zellen transkribiert wird. Die RNA des Gag- und Protease-Bereiches ließ sich stärker nachweisen als die Bereiche von Reverser Transkriptase, Ribonuklease H und Integrase (Abb. 3.22). Obwohl im Genom keine dem Konsensus von DGLT-A entsprechenden Kopien des DGLT-A-Retrotransposons gefunden wurden, ist nicht auszuschließen, dass die in *D. discoideum*-Zellen transkribierten RNAs von verschiedenen DGLT-A-Retrotransposons zu einem

funktionellen Komplex zusammenfinden und auch nicht-autonome, stark degradierte DGLT-As mobilisieren können.



**Abbildung 3.22. Analyse der Transkription des ORFs von DGLT-A.**

Oben: Darstellung des DGLT-A-Konsensus mit Einteilung des ORFs in 5 Bereiche entsprechend den vorhandenen Protein-Domänen. Unten: Gelelektrophoretische Analyse der PCR an cDNA von AX2-Zellen zeigt die Transkription der einzelnen Bereiche des ORFs der endogenen DGLT-A-Population. Es sind abwechselnd die Proben mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase aufgetragen. Bereiche: Gag (*group specific antigen*): Oligonukleotide DGLTA-09/-10; PR (Protease): Oligonukleotide DGLTA-03/-14; RT (Reverse Transkriptase): Oligonukleotide DGLTA-15/-16; RNH (Ribonuklease H): Oligonukleotide DGLTA-06/-17; IN (Integrase): Oligonukleotide DGLTA-07/-08. LTR: *long terminal repeat*; bp: Basenpaare.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Transkription des codierenden Bereiches der DGLT-A-Retrotransposons in *D. discoideum* nachweisbar ist. Daher lässt sich vermuten, dass die DGLT-A-Retrotransposons funktionell nicht degradiert sind und dass alle für eine Retrotransposition notwendigen Proteine in der Zelle vorhanden sind. Es kann ebenfalls vermutet werden, dass die 5'-LTR-Region der DGLT-A-Retrotransposons, analog zu anderen LTR-Retrotransposons (Havecker *et al.*, 2004), eine Promotor-Funktion besitzt, da der ORF der untersuchten DGLT-A transkribiert wurde. Frühere Arbeiten beschrieben bereits eine mögliche Trans-Komplementation von LTR-Retrotransposons

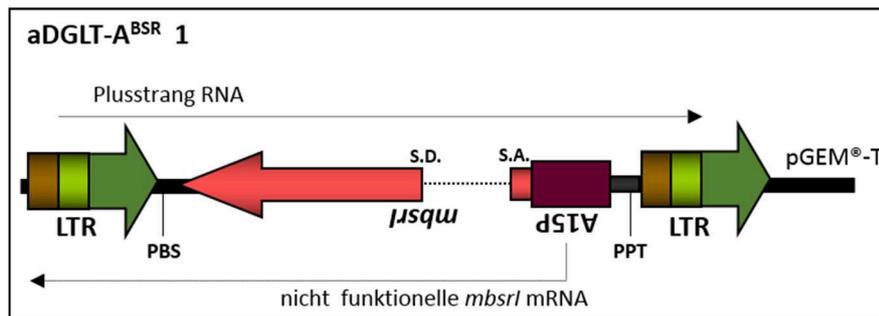
(Merkulov *et al.*, 2001), so dass auf diese Weise auch eine Retrotransposition von DGLT-A wahrscheinlich ist.

### 3.2.4. Mobilisierung artifiziieller markierter DGLT-A-Retrotransposons

Mittels des Retrotranspositionsexperimentes sollte nun untersucht werden ob DGLT-A-Retrotransposons die Fähigkeit zur Mobilisierung besitzen. Dazu sollten verschiedene artifiziielle DGLT-A-Retrotransposons mit einem Blasticidin-Resistenzmarker (*mbsrl*) gekennzeichnet werden (DGLT-A<sup>BSR</sup>). Deren mögliche Mobilisation sollte im Stamm AX2 untersucht werden. Bei einem Sprungereignis würden markierte Retrotransposons eine Blasticidin-Resistenz hervorrufen (siehe Kapitel 3.1). Diese Strategie wurde bereits erfolgreich bei dem Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A angewendet, welches durch die zellinternen TRE5-A-Proteine *in trans* mobilisiert wird (Siol *et al.*, 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte zum ersten Mal die Verwendung des Blasticidin-Resistenzmarkers bei einem LTR-Retrotransposon von *D. discoideum*. Arbeiten mit LTR-Retrotransposons aus anderen Organismen zeigen, dass eine Platzierung des Resistenzmarkers zwischen ORF und Polypurin-Bindestelle bzw. an Stelle des codierenden Teil des ORFs am geeignetsten ist (Merkulov *et al.*, 2001; Ribet *et al.*, 2004). Damit konnte ebenfalls die Retrotransposition anderer LTR-Retrotransposons durch *in trans*-Komplementation nachgewiesen werden (Ribet *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der Blasticidin-Resistenzmarker (*mbsrl*) zwischen die ORF-Sequenz und die Polypurin-Bindestelle kloniert bzw. an Stelle des codierenden Teil des ORFs von DGLT-A. Die Klonierungen der artifiziiellen DGLT-A-Retrotransposons (aDGLT-A<sup>BSR</sup>) erfolgten in dem Vektor pGEM<sup>®</sup>-T. Es wurden insgesamt 4 verschiedene Konstrukte (zwei autonome, zwei nicht autonome) hergestellt.

(1) Als kleinstmöglichstes artifizielles DGLT-A wurde ein nicht-autonomes Retrotransposon kloniert (aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1), welches aus dem 5'-LTR inklusive der untranslatierten Region mit der möglichen tRNA-*Primer*-Bindestelle, dem Blasticidin-Resistenzmarker (Siol *et al.*, 2011) und dem 3'-LTR inklusive der Polypurin-Bindestelle besteht (Abb. 3.23). Diese Bestandteile bilden vermutlich die minimale Zusammensetzung, damit ein nicht artifizielles LTR-Retrotransposon überhaupt

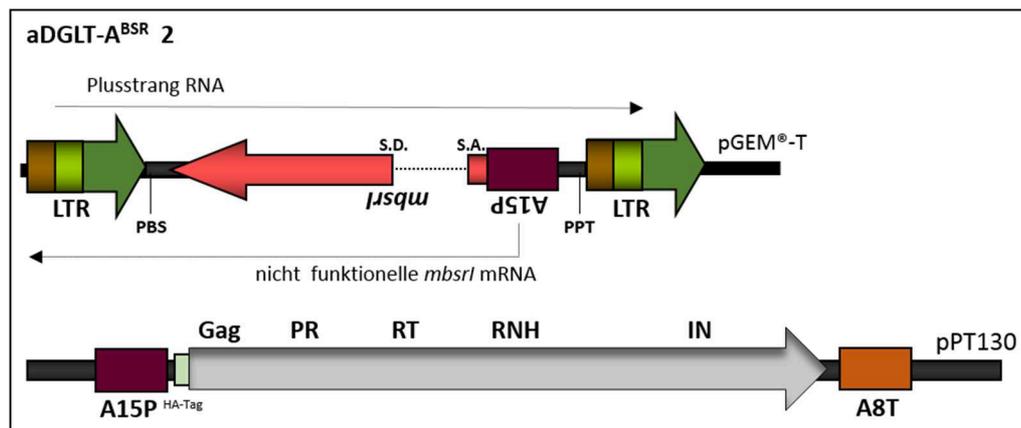
transkribiert und somit mobilisiert werden kann. Dieses artifizielle DGLT-A<sup>BSR</sup> 1 muss *in trans* über die endogenen DGLT-A-Proteine der Wirtszelle mobilisiert werden. Für die Klonierung wurde die 5'- und 3'-LTR-Region (inkl. untranslatierte Region des 3'-Endes/ tRNA-Primer-Bindestelle und Polypurin-Bindestelle) aus genomischer DNA von dem Stamm AX2 isoliert und flankierend an den Blastocidin-Resistenzmarker (*mbsrI*) kloniert (Abb. 3.23).



**Abbildung 3.23. Schematische Darstellung des nicht-autonomen aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1-Retrotransposons.**

Das artifizielle Retrotransposon aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1 im Vektor pGEM<sup>®</sup>-T wurde zusammen mit dem Plasmid pISAR (vermittelt G418-Resistenz) transformiert. LTR: *long terminal repeat*; *mbsrI*: Blastocidin-Resistenzmarker; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: *splice donor site*; S.A.: *splice acceptor site*; PBS: tRNA-Primer-Bindestelle; PPT: Polypurin-Bindestelle.

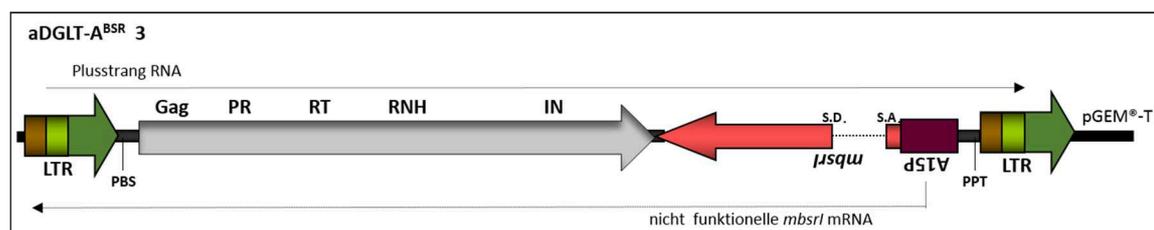
(2) Das zweite nicht-autonome Konstrukt mit dem Namen aDGLT-A<sup>BSR</sup> 2 besteht aus zwei Plasmiden. Das erste Plasmid wurde durch die Klonierung des codierenden Teil des ORFs von DGLT-A in den Expressionsvektor pPT130 (Thomason *et al.*, 2006) hergestellt. Dieses Plasmid dient dazu die Expression des ORFs von endogenen DGLT-As in der Zelle zu komplementieren (Abb. 3.24). Da dieser nicht zusammenhängend in AX2 vorkommt (Abb. 3.19), wurde er aus zwei genomischen DGLT-As mittels PCR zusammengefügt. Das zweite Plasmid ist das artifizielle DGLT-A<sup>BSR</sup> 1. Mit dem Konstrukt aDGLT-A<sup>BSR</sup> 2 wurden somit das minimale aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1 und der codierende Teil des ORFs mit zwei verschiedenen Plasmiden in das Genom von AX2 eingebracht, um die bei dem nicht-autonomen aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1 fehlende und die möglicherweise in der Zelle nicht ausreichende Expression des ORFs und damit das für die Retrotransposition notwendige Polyprotein zu komplementieren.



**Abbildung 3.24. Schematische Darstellung des nicht-autonomen aDGLT-A<sup>BSR</sup> 2-Konstruktes.**

Das künstliche Retrotransposon aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1 im Vektor pGEM<sup>®</sup>-T wurde zusammen mit dem Expressionsplasmid pPT130 (vermittelt G418-Resistenz) transformiert. LTR: *long terminal repeat*; Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; *mbsrl*: Blasticidin-Resistenzmarker; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: *splice donor site*; S.A.: *splice acceptor site*; PBS: tRNA-Primer-Bindestelle; PPT: Polypurin-Bindestelle.

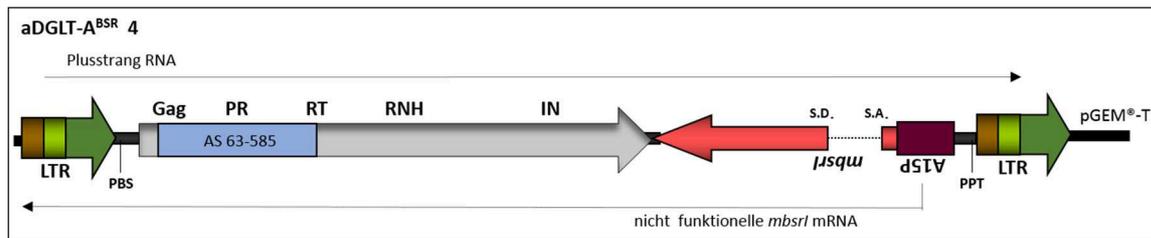
(3) Als drittes künstliches Retrotransposon wurde ein autonomes Konstrukt kloniert (aDGLT-A<sup>BSR</sup> 3), in dem sich der Blasticidin-Resistenzmarker zwischen dem 3'-Ende des kompletten codierenden Teil des ORFs und dem 3'-LTR (inkl. Polypurin-Bindestelle) befindet (Abb. 3.25). Der codierende Teil des ORFs entspricht dem ORF aus dem Expressionsvektor pPT130 von aDGLT-A<sup>BSR</sup> 2. Dieses autonome künstliche DGLT-A<sup>BSR</sup> 3 ist im Aufbau dem Konsensus-Element gleich.



**Abbildung 3.25. Schematische Darstellung des autonomen aDGLT-A<sup>BSR</sup> 3-Retrotransposons.**

Das künstliche Retrotransposon aDGLT-A<sup>BSR</sup> 3 im Vektor pGEM<sup>®</sup>-T wurde zusammen mit dem Plasmid pISAR (vermittelt G418-Resistenz) transformiert. LTR: *long terminal repeat*; Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; *mbsrl*: Blasticidin-Resistenzmarker; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: *splice donor site*; S.A.: *splice acceptor site*; PBS: tRNA-Primer-Bindestelle; PPT: Polypurin-Bindestelle.

(4) Das vierte artifizielle Retrotransposon aDGLT-A<sup>BSR</sup> 4 ist ein im Codongebrauch und in der Aminosäuresequenz verändertes aDGLT-A<sup>BSR</sup> 3. Da der codierende Teil des ORFs von aDGLT-A<sup>BSR</sup> 3 im Vergleich zum Konsensus-Element einige Aminosäureaustausche aufweist, wurden die Aminosäuren 63-585 an den Konsensus angeglichen (Abb. 3.26). Die Anpassung des Codongebrauchs sollte der Unterscheidung zu endogenen DGLT-As dienen. Das aDGLT-A<sup>BSR</sup> 4 unterscheidet sich ansonsten nicht von aDGLT-A<sup>BSR</sup> 3.

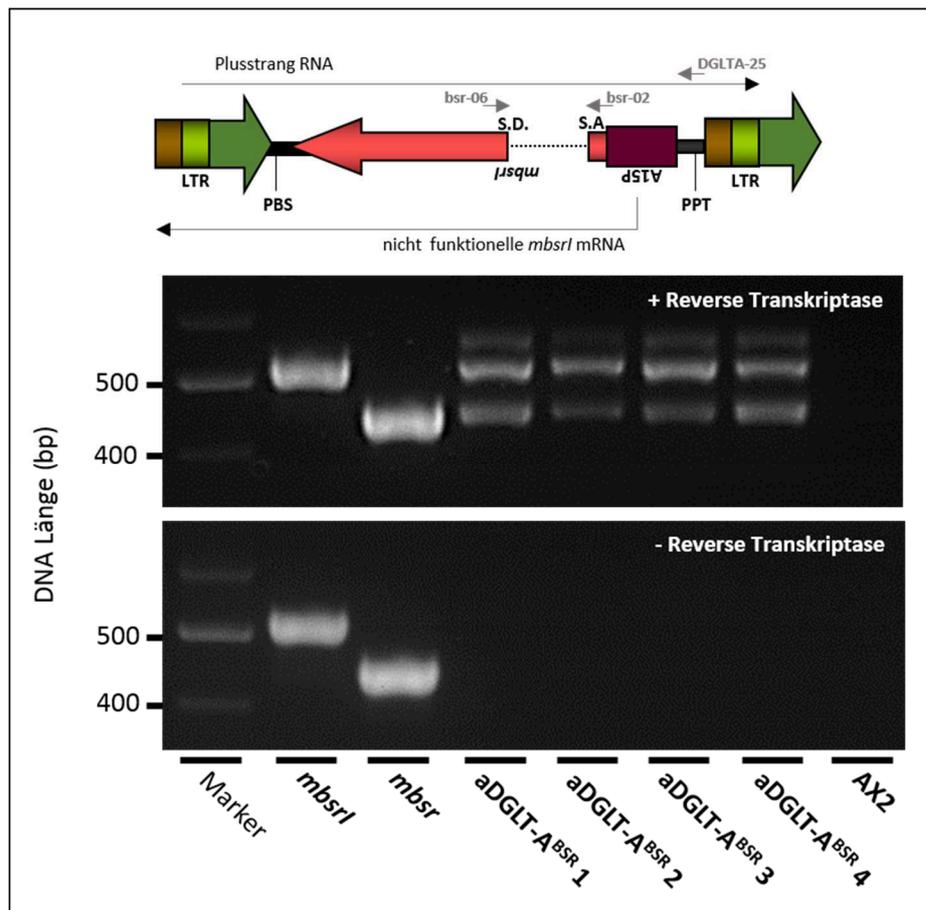


**Abbildung 3.26. Schematische Darstellung des autonomen aDGLT-A<sup>BSR</sup> 4-Retrotransposons.**

Das artifizielle Retrotransposon aDGLT-A<sup>BSR</sup> 4 im Vektor pGEM<sup>®</sup>-T wurde zusammen mit dem Plasmid pISAR (vermittelt G418-Resistenz) transformiert. LTR: *long terminal repeat*; Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; *mbsr1*: Blastizidin-Resistenzmarker; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: *splice donor site*; S.A.: *splice acceptor site*; PBS: tRNA-Primer-Bindestelle; PPT: Polypurin-Bindestelle.

Die 4 artifiziellen aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte wurden in den Stamm AX2 transformiert. Gleichzeitig erfolgte bei aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1, 3 und 4 eine Cotransformation mit dem Plasmid pISAR, welches eine G418-Resistenz vermittelt. Im Fall von aDGLT-A<sup>BSR</sup> 2 wurden grundsätzlich 2 Plasmide eingebracht, wobei der Expressionsvektor pPT130 ebenfalls eine G418-Resistenz aufweist. Mit den G418-resistenten Klonen wurde dann ein Retrotranspositionsexperiment durchgeführt, wobei Blastizidin-resistente Klone nur durch die Transkription und anschließende Retrotransposition von aDGLT-A<sup>BSR</sup> entstehen können.

Um zunächst zu untersuchen, ob die artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons transkribiert werden, wurde eine PCR an spezifisch erzeugter cDNA der funktionellen Plusstrang-mRNA (Oligonukleotid DGLTA-25) der aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons durchgeführt. Bei allen 4 artifiziellen Retrotransposons konnte gespleißter (441 bp) und ungespleißter (521 bp) Blastizidin-Resistenzmarker nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass alle 4 artifiziellen aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte, wenn auch teils unvollständig gespleißt, transkribiert werden (Abb. 3.27).



**Abbildung 3.27. Analyse der Transkription der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons.**

Gelelektrophoretische Analyse der PCR an spezifisch erzeugter cDNA (Oligonukleotid DGLTA-25) von G418-resistenten Klonen (Oligonukleotide bsr-02 und bsr-06). Die Kontrollen *mbsr1* (521 bp) und *mbsr* (441 bp) zeigen ungespleißten bzw. gespleißten Blasticidin-Resistenzmarker. bp: Basenpaare; LTR: *long terminal repeat*; Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; *mbsr1*: Blasticidin-Resistenzmarker; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: *splice donor site*; S.A.: *splice acceptor site*; PBS: tRNA-Primer-Bindestelle; PPT: Polypurin-Bindestelle.

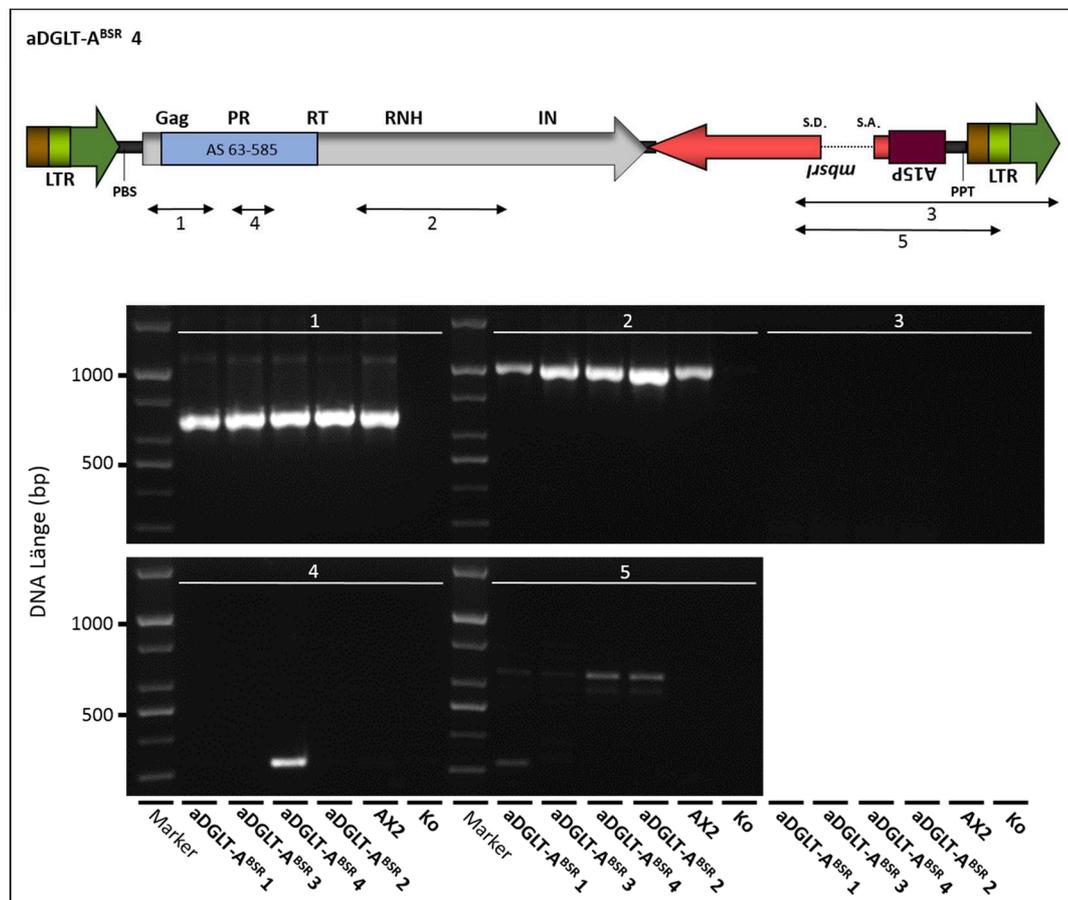
In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob der ORF der artifiziellen aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons 2-4 bzw. der endogenen DGLT-A-Retrotransposons transkribiert wird. Diese Untersuchung erfolgte durch eine PCR an mit einem oligo(dT)<sub>18</sub>-Oligonukleotid erzeugter cDNA mit verschiedenen Oligonukleotid-Kombinationen, um die gesamte mRNA der DGLT-A-Retrotransposons abzudecken (Abb. 3.28 oben). Die Analyse zeigte, dass das Produkt der Oligonukleotid-Kombination 1 nicht spezifisch für die artifiziellen aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons ist, sondern auch bei den endogenen Wildtyp-DGLT-A auftritt. Es konnte daher in allen Transformanten und in AX2-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.28).

Die Oligonukleotid-Kombination 2 bindet ebenfalls nicht spezifisch an den artifiziellen aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons, weist allerdings einen hinteren Bereich des ORFs nach, wodurch Aussagen zur Länge der gebildeten mRNA möglich sind (Abb. 3.28). Die mRNA wird mindestens bis zum Bereich der Integrase des ORFs von DGLT-A gebildet und konnte in allen Transformanten und im untransformierten Stamm AX2 nachgewiesen werden. Diesbezüglich waren die Intensitäten zwischen aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1 und dem untransformierten Stamm AX2 vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass bei aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1 und AX2 nur die ORFs der endogenen DGLT-A amplifizierbar sind. Für die aDGLT-A<sup>BSR</sup> 2, 3 und 4 konnte eine stärkere Amplifikation im Vergleich zu endogenen DGLT-A nachgewiesen werden (Abb. 3.28). Daraus lässt sich schließen, dass zusätzlich zu den endogenen DGLT-A die eingebrachten ORFs transkribiert werden.

Eine dritte Oligonukleotid-Kombination überspannt den Bereich ab Mitte des Blasticidin-Resistenzmarkers bis zum 3'-Ende der artifiziellen DGLT-A-Retrotransposons. Dieses Produkt ist spezifisch für die transformierten aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons. Das cDNA-Produkt konnte für keines der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons nachgewiesen werden (Abb. 3.28). Dies zeigt, dass die mRNA nicht bis zum 3'-Ende des 3'-LTRs gebildet wird und deutet darauf hin, dass eine U3-R-U5-Struktur des LTRs vorliegt. Das bedeutet, dass die mRNA, wie für andere Retrotransposons beschrieben (Benachenhou *et al.*, 2009, 2013), vom 5'-Ende der 5'-LTR R-Region bis zum 3'-Ende der 3'-LTR R-Region gebildet wird. In Übereinstimmung dazu konnte das Produkt der Oligonukleotid-Kombination 5 für alle 4 aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte nachgewiesen werden. Das 3'-Ende des PCR-Produktes liegt in der möglichen R-Region des 3'-LTRs und ist für die aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons spezifisch. Allerdings ist die Intensität des PCR-Produktes bei Element 1 und 2 sehr schwach (Abb. 3.28). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die mRNA bis zur möglichen R-Region des 3'-LTR von aDGLT-A<sup>BSR</sup> gebildet wird und somit der gesamte ORF transkribiert wird. Dies ist zusammen mit dem Ergebnis der Oligonukleotid-Kombination 3 ein deutlicher Hinweis für das Vorliegen einer U3-R-U5-Struktur in den LTRs von DGLT-A-Retrotransposons.

Die Oligonukleotid-Kombination 4 ist spezifisch für das aDGLT-A<sup>BSR</sup> 4-Konstrukt, da dieses im Codongebrauch verändert wurde, um es von den endogenen DGLT-A unterscheiden zu können. Die beiden Oligonukleotide binden spezifisch im Bereich dieser Veränderung.

Übereinstimmend dazu konnte das Produkt nur für Element 4 nachgewiesen werden und ist somit ein spezifischer Nachweis für die Transkription von diesem ORF (Abb. 3.28).

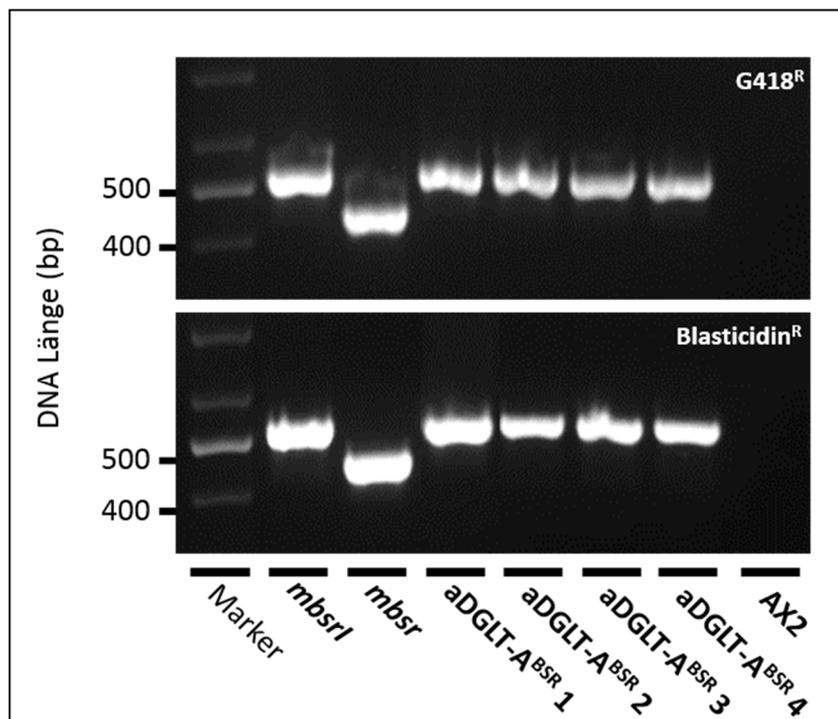


**Abbildung 3.28. Nachweis der Transkription des ORFs der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte.**

Gelelektrophoretische Analyse der PCR 1-5 an cDNA der aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte 1-4. Die Oligonukleotid-Kombinationen sind über die Länge des ORFs bis zum 3'-Ende der DGLT-A-Retrotransposons verteilt (1) Oligonukleotide DGLTA-10/-35, 692 bp; (2) Oligonukleotide DGLTA-17/-RH-02, 1.007 bp; (3) Oligonukleotide bsr-01/ DGLTA-02, 857 bp; (4) Oligonukleotide DGLTA-37/-38, 325 bp; (5) Oligonukleotide bsr-01/ DGLTA-24, 632 bp. LTR: *long terminal repeat*; Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; *mbsr1*: Blasticidin-Resistenzmarker; A15P: Aktin-15-Promotor; S.D.: *splice donor site*; S.A.: *splice acceptor site*; PBS: tRNA-Primer-Bindestelle; PPT: Polypurin-Bindestelle; bp: Basenpaare; AS: Aminosäure.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die DNA der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte über die gesamte Länge des ORFs bis zur Mitte des 3'-LTRs transkribiert wird und wahrscheinlich eine U3-R-U5-Struktur der LTRs von DGLT-A vorliegt. Ebenso scheint der Blasticidin-Resistenzmarker die Transkription nicht signifikant zu beeinflussen.

Um eine Mobilisation der aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte nachzuweisen, wurde im Folgenden genomische DNA von G418- und Blastocidin-resistenten Transformanten der aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte 1-4 mittels PCR analysiert. Im Falle einer Retrotransposition wird der Blastocidin-Resistenzmarker (*mbsrI*) funktionell gespleißt und vermittelt nach Integration der artifiziellen Retrotransposons eine Blastocidin-Resistenz. Alle aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte erzeugen ein PCR-Produkt von 521 Basenpaaren, was einem ungespleißten Blastocidin-Resistenzmarker entspricht (Abb. 3.29). Dies deutet darauf hin, dass mit keinem der 4 artifiziellen aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte eine nachweisbare Retrotransposition stattgefunden hat, obwohl Blastocidin-resistente Klone vorlagen. Ein Amplifikat des gespleißten Blastocidin-Resistenzmarkers (*mbsr*, 441 bp) konnte nicht nachgewiesen werden. Daher lässt sich schließen, dass die aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons zwar transkribiert, aber nicht mobilisiert werden.



**Abbildung 3.29. Analyse der Retrotransposition der aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte.**

Gelelektrophoretische Analyse der PCR an genomischer DNA von G418- (oben) und Blastocidin- (unten) resistenten Transformanten der aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte 1-4 (Oligonukleotide bsr-02 und bsr-06, siehe Abb. 3.27). Die Kontrollen *mbsrI* (521 bp) und *mbsr* (441 bp) zeigen ungespleißten bzw. gespleißten Blastocidin-Resistenzmarker. bp: Basenpaare.

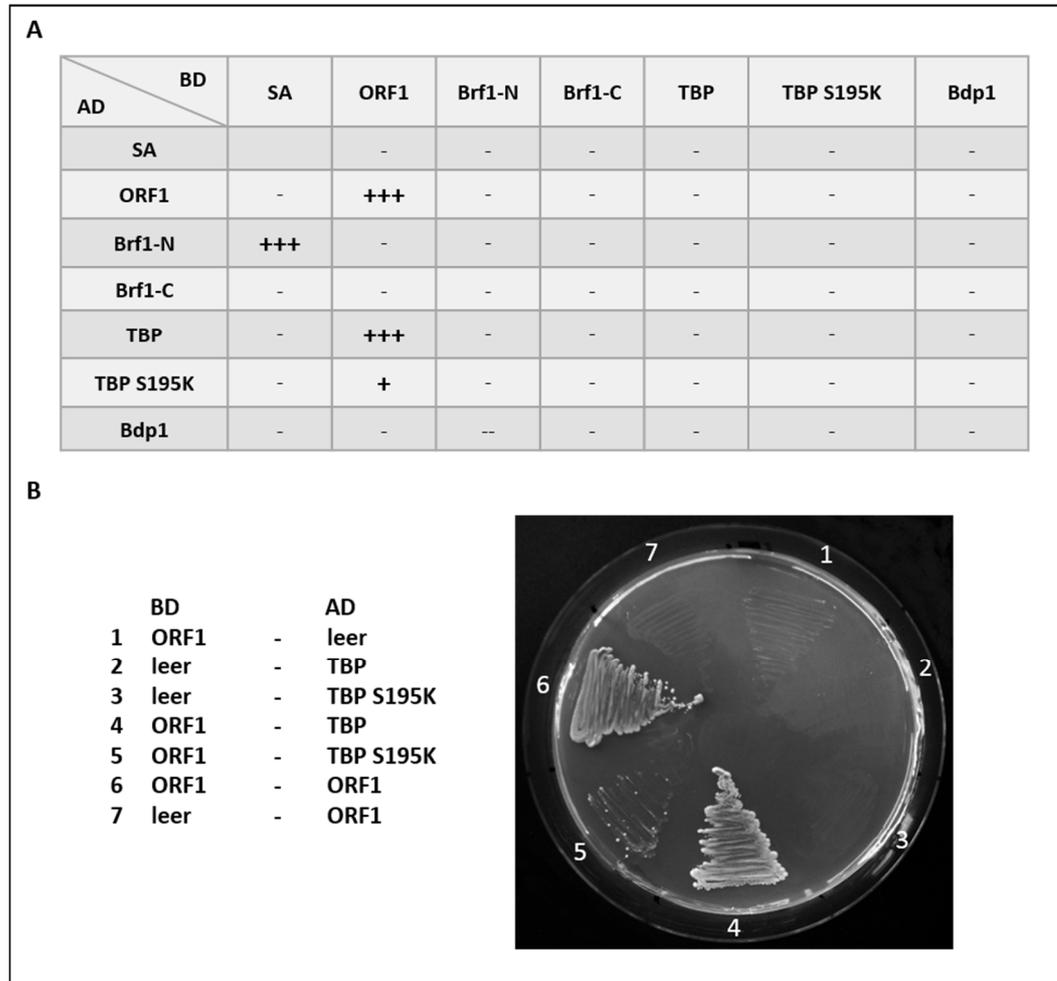
### 3.2.5. Nachweis von Protein-Interaktionen zwischen Retrotransposons und Transkriptionsfaktoren unter Verwendung des Hefe-Zweihybrid-Systems

Das Hefe-Zweihybrid-System wird zur Analyse von Protein-Interaktionen verwendet (Fields & Song, 1989). Aufgrund der spezifischen Integration des Retrotransposons DGLT-A oberhalb von tRNA-Genen sollten damit mögliche Protein-Interaktionspartner detektiert werden. Bei TRE5-A erfolgt die spezifische Integration durch Protein-Interaktionen mit Untereinheiten von TFIIIB, welcher ein Teil des RNA-Polymerase III-Komplexes ist (Abb. 3.31 A). Um zu untersuchen, ob dies auch bei DGLT-A der Fall ist, sollte das Hefe-Zweihybrid-System verwendet werden. Um dafür Positivkontrollen zu entwickeln, wurde das Retrotransposon TRE5-A verwendet. Die spezifische Integration von TRE5-A beruht wahrscheinlich auf einer Interaktion des eigenen ORF1-Proteins mit der Untereinheit TBP von TFIIIB in *D. discoideum* (Siol *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007). Diese Interaktion wurde mittels eines bakteriellen Zweihybrid-Systems identifiziert (Chung *et al.*, 2007).

Zunächst sollte die Interaktion des ORF1-Proteins von TRE5-A mit den Protein-Untereinheiten TBP, Bdp1 und Brf1 von TFIIIB getestet werden. Hierzu wurden die Untereinheiten von TFIIIB, sowie der ORF1 in die Beute- und Köder-Plasmide pAct2 und pGBKT7 kloniert. Die Untereinheit Brf1 wurde aufgrund ihrer Größe in die funktionellen Domänen Brf1-N (Aminosäuren 1-270) und Brf1-C (Aminosäuren 271-706) geteilt. Als Kontrolle wurde eine Mutante des TBP-Proteins (S195K) in die Untersuchungen eingeschlossen, die keine Interaktion mit dem ORF1-Protein im bakteriellen Zweihybrid-System zeigt (Chung *et al.*, 2007). Als Negativkontrollen wurden die zu untersuchenden Plasmide mit dem leeren Partnerplasmid cotransformiert. Die Plasmide wurden systematisch auf Selbstaktivierung und mögliche Interaktionen getestet. Hierzu wurden die Plasmide in den Hefe-Stamm AH109 transformiert und auf Selektionsplatten (SD-HALT) unter Zugabe von X- $\alpha$ -Gal getestet. Alle Proteine, die eine Selbstaktivierung zeigten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die bekannte Interaktion des ORF1-Proteins von TRE5-A mit dem TBP-Protein von TFIIIB und die Dimerisierung von ORF1 mit sich selbst konnte mit dem Hefe-Zweihybrid-System nachgewiesen werden (Abb. 3.30). Beide Interaktionen spiegeln sich durch ein starkes

Wachstum auf SD-HALT-Platten und eine intensive Blaufärbung unter Einfluss von X- $\alpha$ -Gal wider. In Übereinstimmung mit Chung *et al.* (2007) konnte zwischen den Proteinen von ORF1 und TBP S195K keine signifikante Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 3.30).



**Abbildung 3.30. Untersuchung der Interaktion des ORF1-Proteins von TRE5-A mit TFIIB im Hefe-Zweihybrid-System.**

(A) Tabellarische Darstellung der getesteten Kombinationen. + bis +++ gibt die Stärke des Wachstums bzw. der Blaufärbung der Hefe-Kolonien auf SD-HALT + X- $\alpha$ -Gal Platten an. (B) Interaktionen des ORF1-Proteins mit TFIIB, dargestellt mit ausgestrichenen Klonen. AD: Aktivierungsdomäne.; BD: Bindedomäne.; SA: Test auf Selbstaktivierung durch Doppeltransformation mit leerem AD bzw. BD-Plasmid.; ORF1: offener Leserahmen 1 von TRE5-A; Brf1-N: *B-related-factor-N* AS 1-270.; Brf1-C: *B-related-factor-C* AS 271-706; TBP: TATA-Bindeprotein;.Bdp1: *B-double-prime* 1; TBP S195K: Mutante des TBP; AS: Aminosäure.

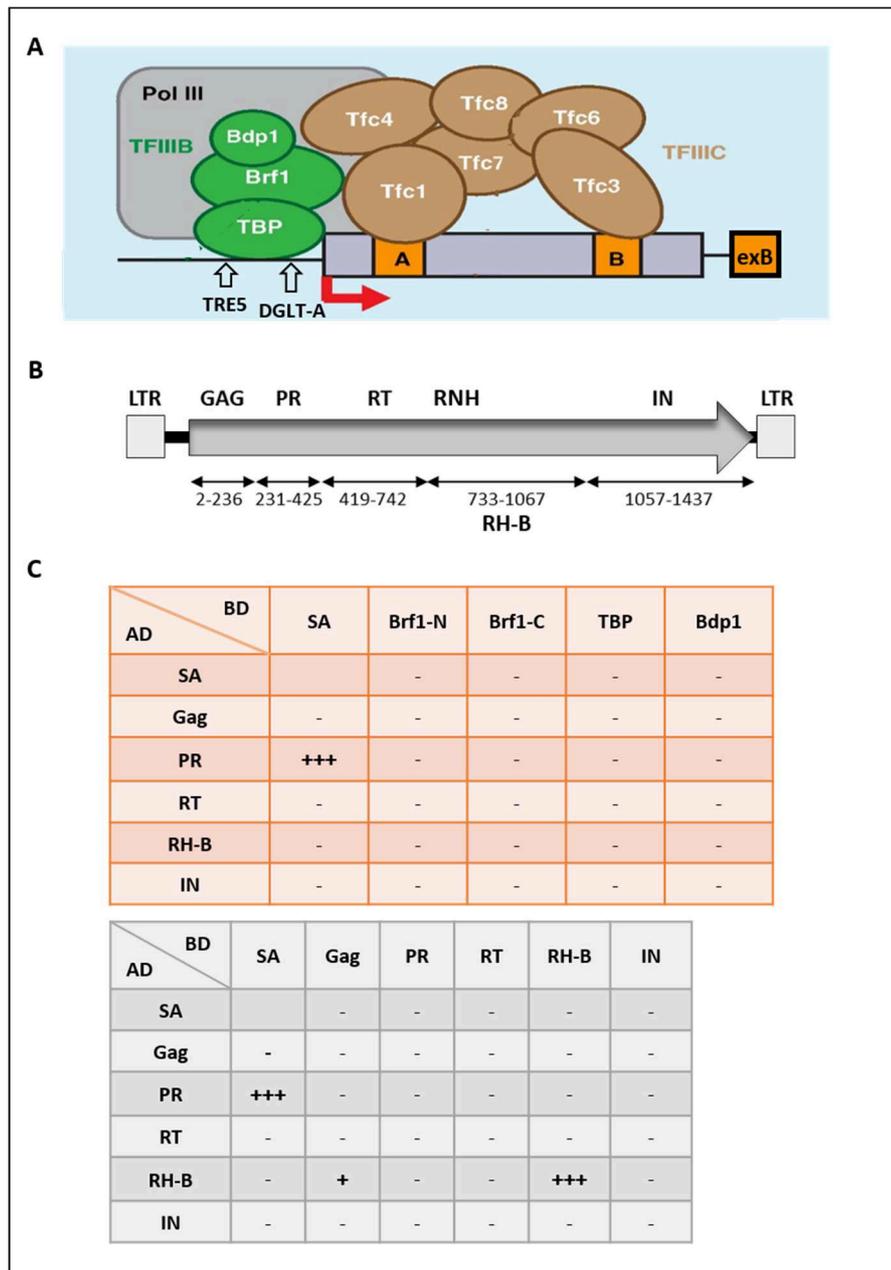
Da Brf1-N als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne des pAct2-Vektors selbstaktivierend war, wurde dieses nicht weiter untersucht. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass sich die Protein-Interaktion von ORF1 und TBP mit diesem System *in vitro*

nachweisen lässt und die S195K-Mutante von TBP die Interaktion stark verringert. Daraus lässt sich schließen, dass das Hefe-Zweihybrid-System für den Nachweis von Interaktionen von Retrotransposon-Proteinen mit TFIIB geeignet ist und somit für die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des Retrotransposons DGLT-A verwendet werden kann.

### 3.2.6. Interaktionsstudien des Retrotransposons DGLT-A mit TFIIB

Da das Retrotransposon DGLT-A ähnlich wie TRE5-A spezifisch oberhalb von tRNA-Genen integriert (Chung *et al.*, 2007; Abb. 3.31 A), sollte im Folgenden mit dem Hefe-Zweihybrid-System untersucht werden, inwieweit Protein-Interaktionen mit TFIIB eine Rolle spielen. Dazu wurde der ORF von DGLT-A, entsprechend der funktionellen Domänen (Gag, Protease, Reverse Transkriptase, Ribonuklease H, Integrase) in 5 Bereiche geteilt, welche in die Beute- und Köder-Plasmide pAct2 und pGBKT7 kloniert wurden (Abb. 3.31 B). Als Vorlage hierfür diente mit einem oligo(dT)<sub>18</sub>-Oligonukleotid erzeugte cDNA aus AX2-Zellen. Die generierten Plasmide wurden in Kombination mit den TFIIB-Plasmiden systematisch auf Selbstaktivierung und Interaktionen auf SD-HALT-Selektionsplatten mit X- $\alpha$ -Gal getestet.

Der hier getestete Ribonuklease H-Bereich von Aminosäure 733-1067 wird fortan als RH-B bezeichnet. Der Protease-Bereich von DGLT-A war selbstaktivierend und wurde daher von weiteren Analysen ausgeschlossen. Bei der Untersuchung von Interaktionen zwischen den einzelnen Bereichen des ORFs von DGLT-A zeigten sich eine Interaktion zwischen RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) und dem Gag-Bereich (DGLT-A<sub>2-236</sub>), sowie eine Dimerisierung von RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) (Abb. 3.31 C unten). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem Retrotransposon TRE5-A ließ sich mit dem Hefe-Zweihybrid-System keine Interaktion von DGLT-A mit TFIIB nachweisen (Abb. 3.31 C oben). Diese Daten lassen darauf schließen, dass DGLT-A seinen Integrationsort nicht über eine Interaktion mit TFIIB findet. Allerdings können Interaktionen zwischen TFIIB und DGLT-A aufgrund dieses *in vitro*-Testsystems nicht vollständig ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.31. Analyse der Interaktionen des ORF-Proteins von DGLT-A mit TFIIIB und sich selbst.**

(A) Darstellung des Transkriptionsfaktorkomplexes von TFIIIB/ TFIIIC an einem tRNA-Gen und der Integrationsorte von TRE5-A und DGLT-A. Abbildung modifiziert nach Huang & Maraia (2001) und Winckler *et al.* (2011). (B) Schematische Darstellung des Retrotransposon DGLT-A unter Angabe der für das Hefe-Zweihybrid-System klonierten Bereiche des ORFs (Angabe in Aminosäuren). (C) Interaktionen der ORF-Bereiche von DGLT-A mit TFIIIB (oben) und mit sich selbst (unten). AD: Aktivierungsdomäne. BD: Bindedomäne. SA: Test auf Selbstaktivierung durch Doppeltransformation mit leerem AD bzw. BD-Plasmid. + bis +++ gibt die Stärke des Wachstums bzw. der Blaufärbung der Hefe-Kolonien auf SD-HALT + X- $\alpha$ -Gal Platten an. Pol III: RNA-Polymerase III; Brf1-N: *B-related-factor-N* AS 1-270.; Brf1-C: *B-related-factor-C* AS 271-706; TBP: TATA-Bindeprotein; Bdp1: *B-double-prime 1*; Tfc1-Tfc8: Untereinheiten von TFIIIC; A/B: A-/B-Box des tRNA-Gens; exB: externe B-Box; LTR: *long terminal repeat*; RH-B: Ribonuklease H-Bereich; Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; AS: Aminosäure.

### 3.2.7. Analyse der Protein-Interaktionen zwischen dem ORF von DGLT-A und TFIIC

Das Retrotransposon DGLT-A integriert näher an tRNA-Genen als TRE5-A (Chung *et al.*, 2007). Da TFIIC näher als TFIIB und in unmittelbarer Nähe vom Integrationsort von DGLT-A bindet (Abb. 3.31 A), konnte vermutet werden, dass das Retrotransposon DGLT-A Protein-Interaktionen mit TFIIC eingeht und dadurch seinen Integrationsort findet. Daher sollten nun mögliche Interaktionen zwischen DGLT-A und TFIIC untersucht werden. TFIIC als Bestandteil des RNA Polymerase III-Komplexes in *D. discoideum* ist ein Proteinkomplex aus mehreren Untereinheiten und bindet an die B-Box von tRNA-Genen (Bukenberg *et al.*, 1994). Da über TFIIC in *D. discoideum* wenig bekannt ist, wurde mittels TFIIC-Daten aus *S. cerevisiae* nach den orthologen Genen in *D. discoideum* gesucht. TFIIC von *S. cerevisiae* besteht aus 6 Untereinheiten (Conesa *et al.*, 1993). Blast-Suchen mit diesen TFIIC-Untereinheiten in *D. discoideum* führten zur Identifizierung der beiden orthologen Gene der generell am stärksten konservierten Untereinheiten Tfc1 und Tfc4.

Das zu Tfc1 von *S. cerevisiae* (649 Aminosäuren) orthologe Gen (*gtf3C5*, dictyBase accession number DDB0231091) in *D. discoideum* entspricht der Epsilon-Untereinheit von TFIIC ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org)). Das Tfc1-orthologe Gen codiert für ein Protein, welches aus 865 Aminosäuren besteht und 98,9 kDa groß ist. Im Bereich der Aminosäuren 40-400 konnte ähnlich zu Tfc1 von *S. cerevisiae* eine Tau95-Domäne identifiziert werden. Diese stabilisiert den TFIIC/DNA-Komplex (Jourdain *et al.*, 2003). Die Aminosäuresequenz der Tau95-Domäne der beiden orthologen Gene ist zu ca. 26 Prozent identisch (Abb. 3.32). Entsprechend dieser Domäne wurde das Tfc1-orthologe Gen von *D. discoideum* für die folgenden Untersuchungen in die Aminosäuren 22-401 und 420-865 geteilt.

Das zu Tfc4 von *S. cerevisiae* (1.025 Aminosäuren) orthologe Gen (*gtf3C3*, dictyBase accession number DDB0231090) entspricht der Gamma-Untereinheit von TFIIC in *D. discoideum* und besteht aus 997 Aminosäuren ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org)). Die Aminosäuresequenz des 113,9 kDa großen Proteins ist zu 28 Prozent mit Tfc4 von *S. cerevisiae* identisch (Abb. 3.32).

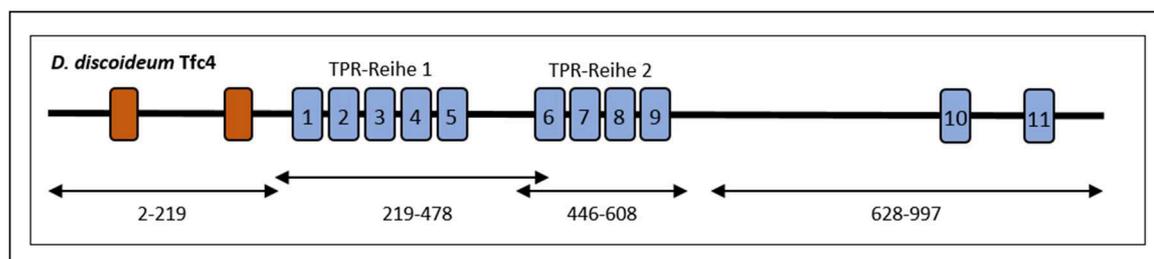
<b>Tfc1</b>			
<i>S. cerevisiae</i>	142	DSNKLRVTPVSIVDNTIKFREMSDFQ--IKLDNVPSAREFKSSFGSLEWNNFKS-----	193
		++ K T +++V +TI+F + DFQ IK DN + E + S ++ K+	
<i>D. discoideum</i>	159	ENEKFDATI IALVPSTIRFDGLCDFQYLKSDNNNTKSESDNVNDS SSSSSSKTVPIPKQ	218
	194	----FVNSVPDNDSPQENIGNLILDRSVKIPSTDFQLPPPKLMSVGFPLLYKYKANPF	249
		+V DN+ ++ NLI PP S + FP Y +KANP	
	219	KDQYYVQQYSDNNEIMKDEPMNLI-----PPLFSRIDFPQNYLFKANPN	262
	250	AKKKKNGVTEVKGTIYIKNYQLFVHDLSDKTVIPSQAHEQVLYDFEVAKKT--KVYPGTKS	307
		A+ + K + FV + +T + H + VA + KV+	
	263	AQ-----FDKTSKQFV--FAKQTRKATGHAKFN NVIPVAPQELPKVF-----	303
	308	DSKFYESLEECLKILREL FARRPIWVKRHL DGVKPK---IHHTMKIALALISYRFTMGP	364
		E +++ IL LF +RPIW+ L V K+ + HT ++ L +++ F GP	
	304	--GVNELMKKTRDILVALFEKRPWLYISLLDKVQKEGGLVAHTKRV-LPSLAFNFVDGP	360
	365	WRNTYIKFGIDPRSSVEYAQYQTEYFKI	392
		WR ++K G DPR E +QYQT F+I	
	361	WRKCWVKLGFDPRIHPETSQYQTI DFRI	388
<b>Tfc4</b>			
<i>S. cerevisiae</i>	119	RKERVLDP EVAQLLSQANEAFVRNDLQVAERLFNEVIKKDARNFAAYETLGDIIYQLQGRL	178
		++E + EV +LL NE + + + +A + EV++ R Y LG I + QG +	
<i>D. discoideum</i>	222	QQEIRIPKEVRKLLVGGNEQYTKGNFDLAFSTYAEVVRMLPRLSIPYNILGKIKESQGEM	281
	179	NDCCNWFLAAHLNASDWEFWKI VAILSADLDHVRQAIYCF SRV ISLNPMEWESIYRRSM	238
		+ A + S+ + W + + + + + A+YCF SR + + +S + +S+	
	282	EAALGFYVYGAQM QGSDGND-WSSIGVRAKEAGQMETALYCF SRACRNDDETDLDSFWEKSL	340
	239	LYKKTGQLARALDGFQRLYMYNPDANILRELAILYVDYDRIEDSIELYMKVFN	292
		+ + G RAL +L Y +L+ELA +Y + D+ + +V +	
	341	ILIQKGFYKRALKILTKLSKYTNGSPQVLQELARVYSHLSQYHDASAMISEVVD	394
	906	PDDPMVNLLMGLSHIHRAMQRLTAQRHFQIFHGLR YLYRYHKIRKSLYTDLEKQEADYNL	965
		PDDP++NLL+ + + + M R A RH +LY+Y+ +R + QE+ YNL	
	873	PDDPLINLLISVLILSQVMGRKQANRHRIAITSYSFLYKYYNLRG-----KSQESLYNL	926
	966	GRAFHLIGLVSIAIBYYNRVLENYDD-----GKLKHAAYNSIIYQQSGNVE	1013
		GR +H +G+ ++AI YY+ VL NY+D LK AA+N +IY+ GN	
	927	GRGYHQLG IYNMAINYDMVL-NYEDEIDEETGEINKNDSLKCEAAFNL SLIYKSKGNTS	985
	1014	LADHLMKEYLSI	1025
		LA+ +++KY+ +	
	986	LANEILKKYIVV	997

**Abbildung 3.32. Alignment der TFIIC-Untereinheiten aus *S. cerevisiae* und *D. discoideum*.**

Vergleich der am stärksten übereinstimmenden Regionen der Aminosäuresequenzen von Tfc1 (Tau95-Domäne) und Tfc4 zwischen *S. cerevisiae* und *D. discoideum*.

Die Tfc4-Untereinheit in *S. cerevisiae* ist zudem durch mehrere TPR-Strukturmodule gekennzeichnet, welche für Protein-Protein-Interaktionen und die Bildung von Multiproteinkomplexen wichtig sind (Marck *et al.*, 1993; Blatch & Lässle, 1999). In Übereinstimmung dazu konnten *in silico* bei dem orthologen Tfc4 von *D. discoideum*

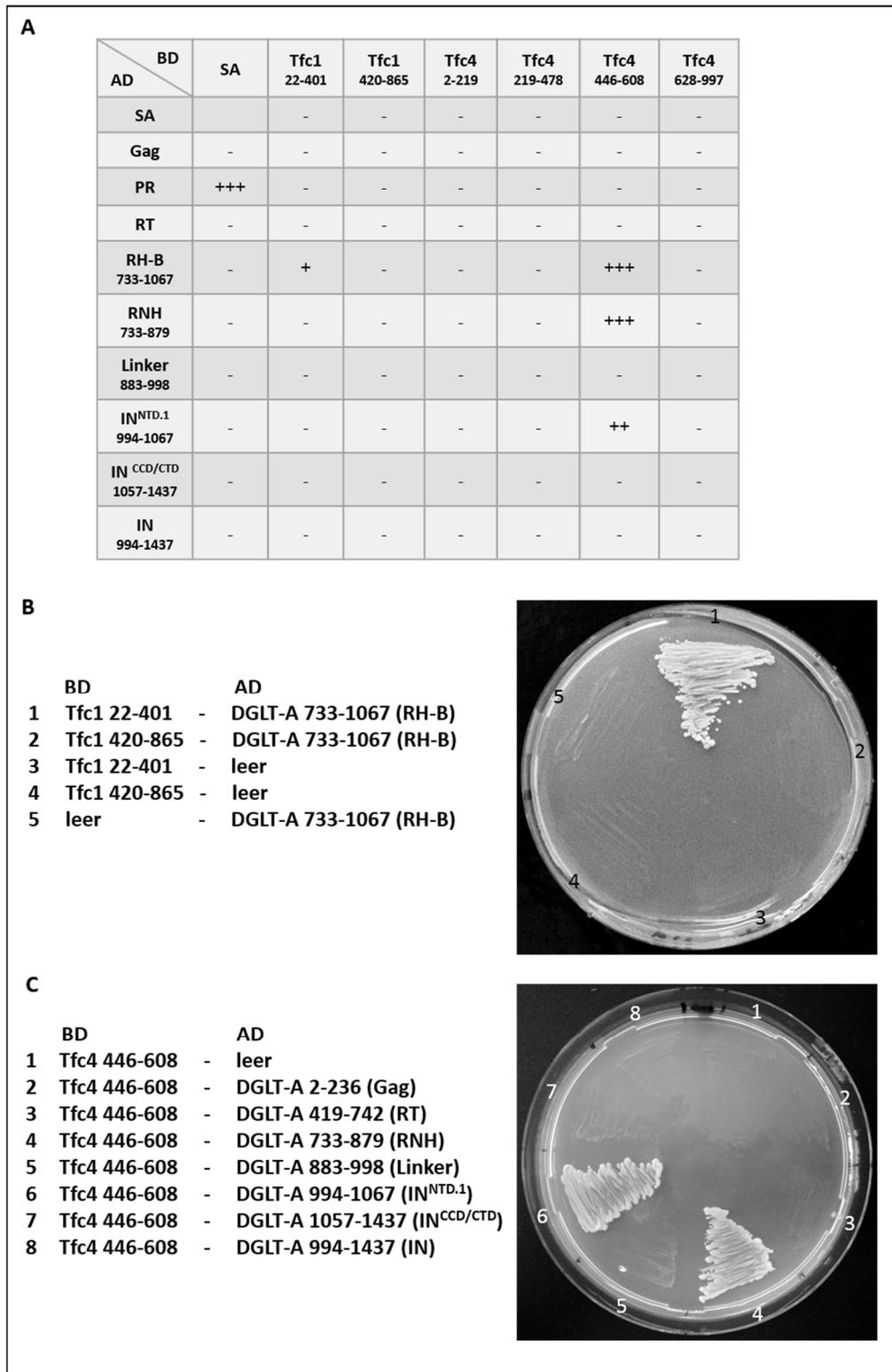
ebenso mehrere TPR-Motive gefunden werden (Abb. 3.33). Beide Proteine sind durch eine ähnliche Verteilung der TPR-Motive gekennzeichnet. Darüber hinaus weist Tfc4 von *D. discoideum* ebenso wie Tfc4 in *S. cerevisiae* 11 TPR-Motive auf, die als TPR-Reihe 1 (TPR 1-5) und TPR-Reihe 2 (TPR 6-9), sowie in zwei einzelnen TPRs organisiert sind (Abb. 3.33). Diese TPR-Motive könnten mögliche Regionen für Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Proteinen (TFIIIC-Untereinheiten bzw. DGLT-A) darstellen. Des Weiteren besitzt Tfc4 von *D. discoideum* im vorderen Viertel noch zwei Asparagin-reiche Domänen (Abb. 3.33). Solche Anhäufungen bestimmter Aminosäuren sind in vielen Proteinen zu finden und wahrscheinlich für die Bildung der nativen Proteinstruktur und zur Bindung von mRNA und anderen Proteinen wichtig (Methot *et al.*, 1996; Wootton & Federhen, 1996). Das Tfc4-orthologe Gen wurde für die nachfolgenden Experimente anhand der TPR-Motive in die Aminosäuren 2-219, 219-478 (TPR-Reihe 1), 446-608 (TPR-Reihe 2) und 628-997 aufgeteilt (Abb. 3.33).



**Abbildung 3.33. Analyse der Protein-Domänen von TFC4 in *D. discoideum*.**

Darstellung der Proteinstrukturmotive und Unterteilung von Tfc4 aus *D. discoideum* anhand von TPR-Strukturmotiven (Tetratricopeptid-Repeat) für die Untersuchungen im Hefe-Zweihybrid-System. Alle Angaben in Aminosäuren. Rot: Asparaginsäure-reiche Domäne; blau: TPR Motiv; grün: zyklisches TPR Motiv.

Um zu untersuchen, ob TFIIIC Interaktionen mit dem Retrotransposon DGLT-A in *D. discoideum* eingeht, wurden die Untereinheiten Tfc1 und Tfc4 in die Vektoren für das Hefe-Zweihybrid-System kloniert. Hierzu wurden die Untereinheiten aufgrund ihrer Größe wie oben beschrieben geteilt. Für die Klonierungen wurde cDNA aus AX2-Zellen als Vorlage benutzt, da die Gene von Tfc1 und Tfc4 durch Introns unterbrochen werden. Die damit generierten Plasmide wurden zusammen mit den Bereichen des ORFs von DGLT-A systematisch auf Selbstaktivierung und Interaktionen im Hefe-Zweihybrid-System untersucht.



**Abbildung 3.34. Untersuchungen zu Interaktionen von DGLT-A mit TFIIC.**

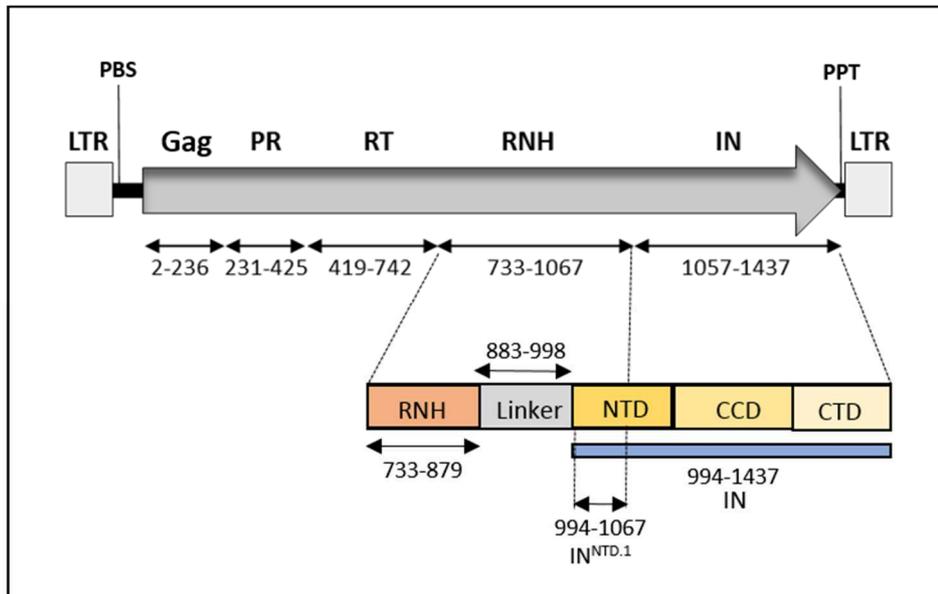
(A) Nachweis der Interaktionen der ORF-Bereiche und Protein-Domänen von DGLT-A mit TFIIC mittels des Hefe-Zweihybrid-Systems. (B) Interaktionen von Tfc1 mit RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) von DGLT-A, dargestellt mit ausgestrichenen Klonen auf SD-HALT/ X- $\alpha$ -Gal-Platten. (C) Interaktionen des Tfc4<sub>446-608</sub>-Fragmentes mit DGLT-A, dargestellt mit ausgestrichenen Klonen auf SD-HALT/ X- $\alpha$ -Gal-Platten. AD: Aktivierungsdomäne. BD: Bindedomäne. SA: Test auf Selbstaktivierung durch Doppeltransformation mit leerem AD bzw. BD-

Plasmid. + bis +++ gibt die Stärke des Wachstums bzw. der Blaufärbung der Hefe-Kolonien auf SD-HALT + X- $\alpha$ -Gal Platten an. Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; RH-B: Ribonuklease H-Bereich (AS 733-879); Linker: AS 883-998; IN: Integrase; NTD: N-terminale Domäne; CCD: katalytische *Core*-Domäne; CTD: C-terminale Domäne; AS: Aminosäure; Tfc1: TFIIC-Domäne 1; Tfc4: TFIIC-Domäne 4. Alle Angaben in Aminosäuren

Die Analyse im Hefe-Zweihybrid-System zeigte eine robuste Interaktion zwischen RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) von DGLT-A und dem Tfc4<sub>446-608</sub>-Fragment (TPR-Reihe 2; Abb. 3.34 A). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die TPR-Motive für Protein-Interaktionen mit DGLT-A eine wichtige Rolle spielen. Des Weiteren konnte eine Interaktion von RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) mit dem N-terminalen Teil von Tfc1 (Aminosäuren 22-401; Tau95-Domäne) nachgewiesen werden (Abb. 3.34 A/B).

Um die Interaktionen von RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) weiter zu untersuchen, wurde eine funktionelle Unterteilung des C-terminalen Bereiches des ORFs von DGLT-A vorgenommen. Die Unterteilung basierte auf einem Vergleich mit dem Retrotransposon Ty3 aus *S. cerevisiae*. Danach wurde RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) in drei funktionelle Bereiche aufgeteilt (Abb. 3.35). Der erste Bereich beinhaltet die Aminosäuren 733-879 und umfasst die eigentliche Ribonuklease H-Domäne (siehe auch Abb. 3.18). Dieser Bereich wird im Folgenden als RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) bezeichnet. Der auf die RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) folgende Bereich umfasst die Aminosäuren 883-998 und hat wahrscheinlich keine funktionelle Aufgabe. Daher wird dieser Bereich fortan als Linker-Region (DGLT-A<sub>883-998</sub>) bezeichnet. Der C-terminale Bereich von RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) beinhaltet die Aminosäuren 994-1067 und gehört wahrscheinlich noch zum N-Terminalen Bereich der Integrase-Domäne von DGLT-A. Daher wurde dieser Bereich als IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) bezeichnet (Abb. 3.35). Da nach dem Vergleich mit Ty3 die Aminosäuren 994-1067 der Integrase-Domäne von DGLT-A zugeordnet werden konnten, wurde die neu definierte Integrase-Domäne in die Untersuchungen mit einbezogen. Danach umfasst die Integrase-Domäne (IN) von DGLT-A die Aminosäuren 994-1437 und ist somit länger als ursprünglich definiert. Daher wurde die Integrase-Domäne in drei Domänen unterteilt, in eine N-terminale Domäne (NTD), eine katalytische *Core*-Domäne (CCD) und eine C-terminale Domäne (CTD, Abb. 3.35). Für die Untersuchung wurden die RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>), Linker (DGLT-A<sub>883-998</sub>) und IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) in die Hefe-Zweihybrid-System-Vektoren kloniert. Zusätzlich wurde das Konstrukt IN (DGLT-A<sub>994-1437</sub>), das aus dem ursprünglichen Integrase-Bereich (CCD/CTD)

besteht, welcher um den Teil  $IN^{NTD.1}$  (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) N-terminal verlängert wurde, in die Analyse einbezogen. Es erfolgte eine erneute systematische Untersuchung mit TFIIC im Hefe-Zweihybrid-System.



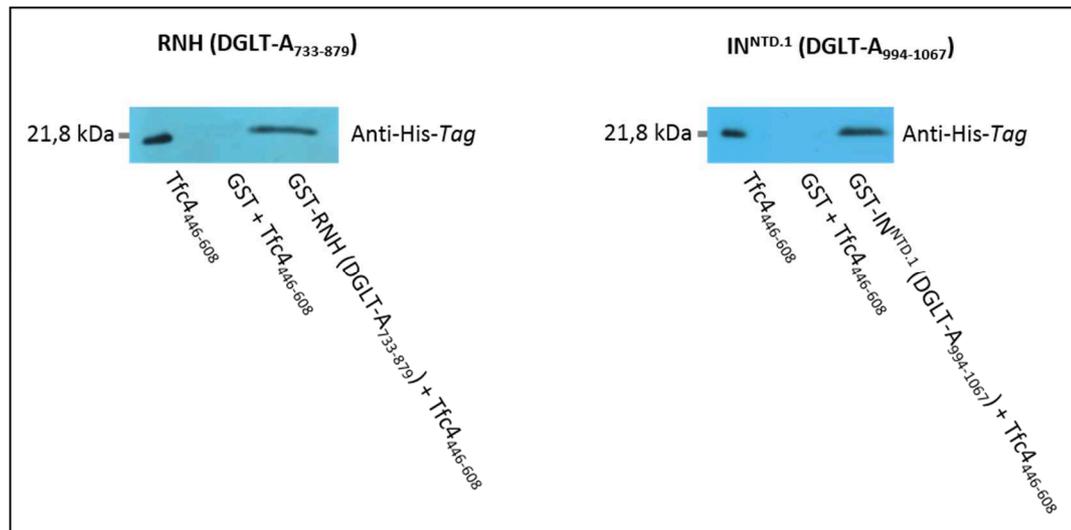
**Abbildung 3.35.** Darstellung der für die Analyse im Hefe-Zweihybrid-System verwendeten ORF-Fragmente von DGLT-A.

Einteilung des ORF von DGLT-A für die näheren Untersuchungen der Bereiche RH-B und IN im Hefe-Zweihybrid-System. LTR: *long terminal repeat*; PBS: tRNA-Primer-Bindestelle; PPT: Polypurin-Bindestelle; Gag: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; Linker: AS 883-998; IN: Integrase; NTD: N-terminale Domäne; CCD: katalytische *Core*-Domäne; CTD: C-terminale Domäne; AS: Aminosäure; Angaben in Aminosäuren.

Während sich mit der neuen funktionellen Einteilung der Proteindomänen keine Interaktion mit Tfc1 nachweisen ließ, konnten für Tfc4 zwei Interaktionen identifiziert werden. Es konnte sowohl eine Interaktion der RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>), als auch der  $IN^{NTD.1}$  (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) mit dem Fragment Tfc4<sub>446-608</sub> (TPR-Reihe 2) nachgewiesen werden (Abb. 3.34 A/C). Für die um  $IN^{NTD.1}$  (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) verlängerte Integrase, IN (DGLT-A<sub>994-1437</sub>), konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass der ursprüngliche groß umfasste Bereich der RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>), insbesondere die RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) den entscheidenden Beitrag bei der Interaktion des DGLT-A-Retrotransposons mit Tfc4 liefert.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein Protein-Protein-*Pulldown*-Experiment durchgeführt. Hierzu wurden RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) und  $IN^{NTD.1}$  (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) in den

bakteriellen Expressionsvektor pET42b kloniert, welcher zur Expression der Proteine in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert wurde. Die Proteine werden dabei als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase exprimiert, welches über magnetische Glutathion-Kügelchen aufgereinigt werden kann. Der potentielle Interaktionspartner, das Fragment Tfc4<sub>446-608</sub> (TPR-Reihe 2) wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pET33b kloniert, wodurch es mit einem His<sub>6</sub>-Tag fusioniert wurde. Im Falle einer Interaktion kann das Tfc4<sub>446-608</sub>-Fragment als Komplex mit den DGLT-A-Fragmenten über den Glutathion-S-Transferase -Tag isoliert und durch den His<sub>6</sub>-Tag nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle für den *Pulldown* diente Glutathion-S-Transferase alleine. Mit beiden DGLT-A-Fragmenten konnte eine Interaktion mit dem Fragment Tfc4<sub>446-608</sub> (TPR-Reihe 2) im *Pulldown*-Experiment nachgewiesen werden (Abb. 3.36). In Übereinstimmung mit den Daten aus dem Hefe-Zweihybrid-System zeigen diese Resultate, dass DGLT-A mit der Untereinheit Tfc4 von TFIIC interagiert. Damit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die TPR-Bereiche von Tfc4 (insbesondere TPR-Reihe 2) an Interaktionen mit DGLT-A beteiligt sind.

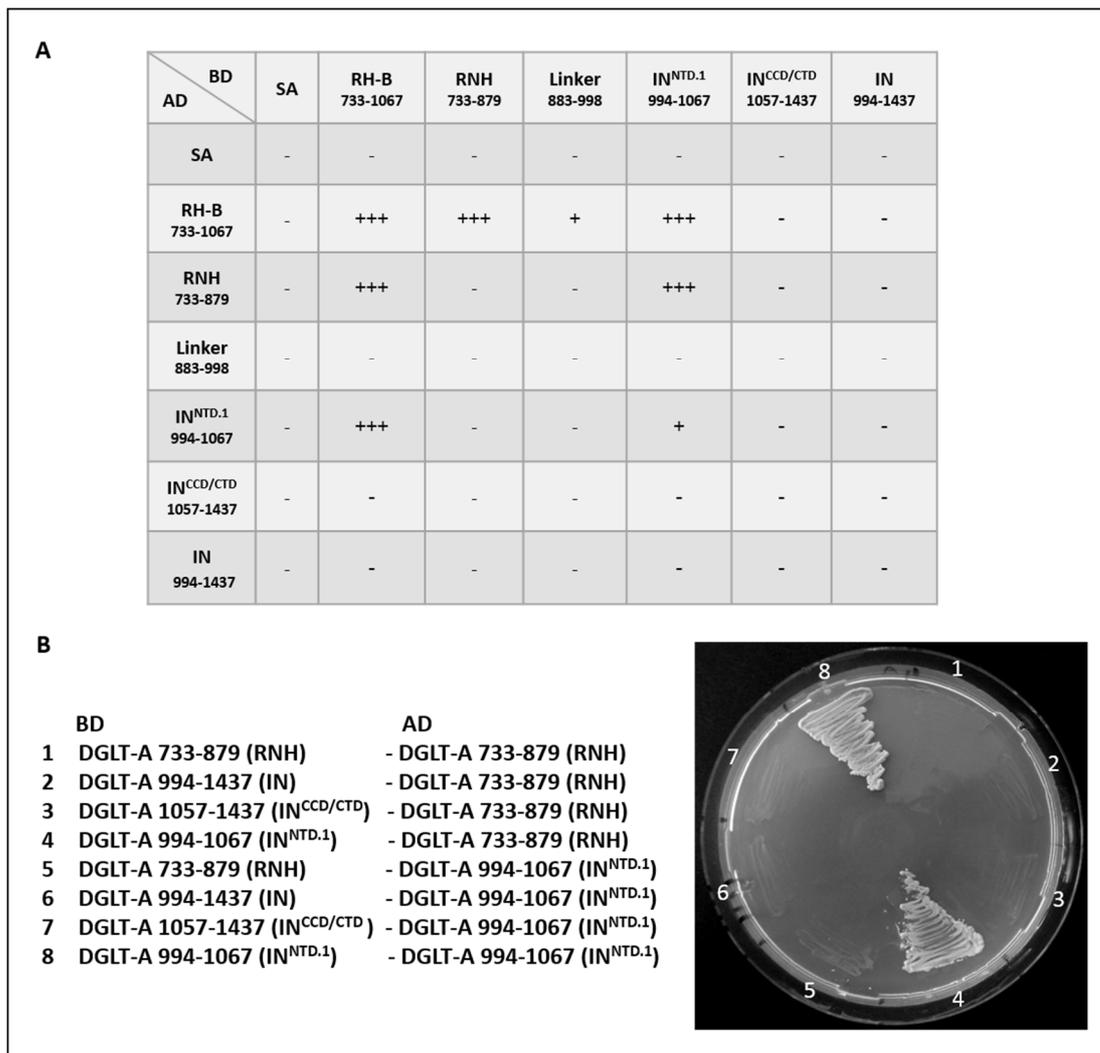


**Abbildung 3.36. Auswertung der *Pulldown*-Experimente mit Tfc4.**

Analyse des *Pulldown*-Experiments von Tfc4<sub>446-608</sub> mit den beiden Glutathion-S-Transferase-gekoppelten DGLT-A-Fragmenten, mittels *Western Blot*. Antikörper Anti-His<sub>6</sub>-Tag. Als Negativkontrolle diente das Glutathion-S-Transferase-Protein. GST: Glutathion-S-Transferase.

Neben der Interaktion von DGLT-A mit TFIIC wurden auch RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) und IN (DGLT-A<sub>994-1437</sub>) von DGLT-A auf Interaktionen untereinander mit dem Hefe-Zweihybrid-

System untersucht. Hierbei konnten Interaktionen zwischen RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) und den drei funktionell eingeteilten Fragmenten (RNH, Linker, IN<sup>NTD.1</sup>) nachgewiesen werden (Abb. 3.37 A). Ebenso konnte eine Dimerisierung von RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) sowie von IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) gezeigt werden (Abb. 3.37 A/B). Diese Interaktionen konnten leider nicht mittels eines *Pulldown*-Experiments verifiziert werden, da die rekombinant exprimierten Proteine unlöslich waren und nicht aufgereinigt werden konnten.



**Abbildung 3.37. Analyse der Interaktionen von RH-B- und der IN-Domäne von DGLT-A.**

(A) Interaktionen der DGLT-A-Fragmente RH-B und IN untereinander. (B) Interaktionen der RH-B- und IN-Fragmente von DGLT-A, dargestellt mit ausgestrichenen Klonen auf SD-HALT/ X- $\alpha$ -Gal-Platten. AD: Aktivierungsdomäne. BD: Bindedomäne. SA: Test auf Selbstaktivierung durch Doppeltransformation mit leerem AD bzw. BD-Plasmid. + bis +++ gibt die Stärke des Wachstums bzw. der Blaufärbung der Hefe-Kolonien auf SD-HALT + X- $\alpha$ -Gal Platten an. RH-B: Ribonuklease H-Bereich; RNH: Ribonuklease H; Linker: AS 883-998; IN: Integrase; NTD: N-terminale Domäne; CCD: katalytische *Core*-Domäne; CTD: C-terminale Domäne. Alle Angaben in Aminosäuren.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass eine Dimerisierung oder eine Interaktion zwischen den einzelnen Domänen für eine Bindung an Tfc4 und somit für eine Integration nötig ist. Des Weiteren interagieren RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>), IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) und das Fragment Tfc4<sub>446-608</sub> miteinander und beeinflussen so möglicherweise die Integrationsspezifität von DGLT-A.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen zu DGLT-A, dass die zelleigenen DGLT-A-Retrotransposons stark degradiert sind, aber nichtsdestotrotz eine Transkription ihrer Protein-Domänen stattfindet. Eine Mobilisierung verschiedener artifizierender aDGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl auch für diese artifizierten Retrotransposons eine Transkription vorhanden ist. Jedoch ist eine Transkomplementation der endogenen bzw. artifizierten DGLT-A aufgrund der nachgewiesenen Transkription möglich. Seinen Integrationsort findet das Retrotransposon DGLT-A wahrscheinlich aufgrund von Protein-Interaktionen mit der Untereinheit Tfc4 von TFIIC. Damit lässt sich der kürzere Integrationsabstand von DGLT-A zu tRNA-Genen erklären, da TFIIC näher an tRNA-Genen bindet. Einen entscheidenden Beitrag für die Protein-Interaktionen liefert dabei wahrscheinlich die RNH von DGLT-A.



---

## 4. Diskussion

---

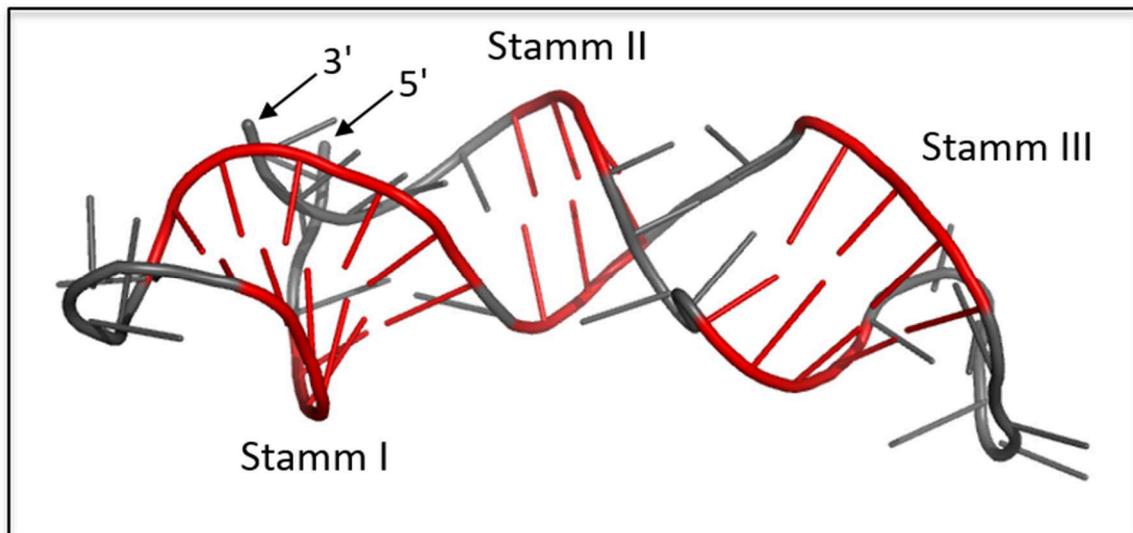
Im Fokus dieser Arbeit stand die nähere Untersuchung der Retrotransposition der beiden Retrotransposons TRE5-A und DGLT-A der „sozialen Amöbe“ *D. discoideum*. Beide Retrotransposons sind dadurch gekennzeichnet, dass sie positionsspezifisch mit unterschiedlichem Abstand oberhalb von tRNA-Genen integrieren (Winckler *et al.*, 2005). Durch diese Integrationspezifität werden möglicherweise Insertionsmutagenesen im Genom von *D. discoideum* vermieden. Da die Grundlagen dieser Integrationspezifität bislang kaum untersucht sind, wurden verschiedene Aspekte des molekularen Mechanismus der Erkennung von tRNA-Genen durch die beiden Retrotransposons analysiert.

### 4.1. Die RNA-Struktur des C-Moduls beeinflusst die Retrotransposition von TRE5-A

Vorangegangene Arbeiten zeigten bereits die Bedeutung des C-Moduls für die Retrotransposition von TRE5-A. So führt ein Austausch des C-Moduls zum vollständigen Verlust der Retrotransposition von TRE5-A (Siol *et al.*, 2011). Die RNA des C-Moduls bildet nach Strukturvorhersagen eine sehr spezielle Stamm-Schleifen-Struktur aus (Abb. 4.1). Diese kann in drei Stämme unterteilt werden (Siol *et al.*, 2011). Anhand eines Strukturmodells der RNA des C-Moduls ist zu erkennen, dass diese so gefaltet ist, dass Stamm I und Stamm III auf der gleichen Seite einer Pseudo-Helix angeordnet sind, so dass das 3'-und 5'-Ende in unmittelbarer Nähe zueinander liegen (Abb. 4.1). Diese Struktur ist wahrscheinlich von zentraler Bedeutung für die Retrotransposition von TRE5-A.

Spezifische Punktmutationen in der Basensequenz der RNA-Stämme I (\* A35C\_C38A) und III (# T15C\_C26A) der C-Modul-RNA führen zum Verlust der Retrotransposition um 98 bis 100 Prozent (Siol *et al.*, 2011). Laut Strukturvorhersagen kommt es durch diese Punktmutationen zu einem Verlust der Konformation der RNA des C-Moduls. Auch bei anderen Retrotransposons (eel LINE UnaL2, R2-Elemente) wird eine spezifische Stamm-Schleifen-Struktur der untranslatierten Region des 3'-Endes und der Einfluss der RNA-Struktur des 3'-Endes auf die Retrotransposition beschrieben (Nomura *et al.*, 2006;

Ruschak *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass die charakteristische Stamm-Schleifen-Struktur der RNA des C-Moduls von besonderer Bedeutung für die spezifische Bindung einer oder mehrerer Komponenten des Präintegrationskomplexes ist.



**Abbildung 4.1. RNA-Strukturvorhersage des C-Moduls des Retrotransposons TRE5-A.**

Darstellung der Strukturvorhersage des Programmes *RNAComposer* (<http://rnacomposer.ibch.poznan.pl>) für die RNA des C-Moduls des Retrotransposons TRE5-A. Die RNA-Stämme I-III sind in rot dargestellt.

Im Genom von *D. discoideum* sind trotz der hohen Retrotranspositionsaktivität von TRE5-A keine durch TRE5-A-Proteine prozessierten Pseudogene bekannt. Prozessierte Pseudogene zeichnen sich dadurch aus, dass sie mittels Retrotransposition mobilisiert, meist durch die RNA-Polymerase II transkribiert werden und sowohl keine Introns als auch keine 5'-Promotorsequenz besitzen. Die mRNA von Pseudogenen weist einen Poly(A)-Schwanz auf (Tutar, 2012). Die spezifische Erkennung der Stamm-Schleifen-Struktur der C-Modul-RNA durch die TRE5-A-Proteine wird als ein Grund für das Fehlen von prozessierten Pseudogenen diskutiert (Siol *et al.*, 2011). Diese Spezifität der TRE5-A-Proteine ist möglicherweise als Anpassung an das kompakte Genom von *D. discoideum* zu sehen, so dass keine Stellen im Genom für zum Beispiel durch Pseudogene vermittelte Rekombination entstehen oder das Genom dadurch vergrößert wird (Siol *et al.*, 2011). Die Stabilität des Genoms kann dadurch aufrechterhalten werden. Ein Beispiel für eine unspezifische Bindung von mRNAs durch ORF-Proteine von Retrotransposons ist das humane L1-Retrotransposon. Die ORF-Proteine des humanen L1-Retrotransposons

binden unspezifisch den Poly(A)-Schwanz von mRNAs, wodurch eine Mobilisierung von Pseudogenen mittels reverser Transkription stattfindet (Tutar, 2012). Unter anderem durch diesen Mechanismus ist das humane Genom durch eine hohe Anzahl an prozessierten Pseudogenen gekennzeichnet (Tutar, 2012). Ein weiteres Beispiel für eine unspezifische Erkennung von mRNAs durch L1-Elemente im humanen Genom sind die SINE-Elemente. SINE-Elemente sind nicht autonom und werden durch den Polymerase II-Komplex transkribiert. Die Proteine der humanen L1-Elemente erkennen ebenfalls den 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA der SINE-Elemente, wodurch diese durch die Enzyme der L1-Elemente mobilisiert werden (Ohshima, 2013). Neben mRNAs werden aber auch andere RNAs durch L1 erkannt und mobilisiert (Pavlicek & Jurka, 2006). Somit ist die Bindung der ORF-Proteine von L1 nicht spezifisch ausgeprägt. Die L1-bedingte Retrotransposition der SINE-Elemente und anderer RNAs führt so zu einer individuellen genetischen Variation der humanen Population (Kopera *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Einführung weiterer Punktmutationen in der Basensequenz des C-Moduls von TRE5-A, genauer im Stamm I (\*\* A35C\_C38A+G48T\_T51G) und im Stamm III (## T15C\_C26A+G14T\_A25G) der mRNA-Struktur, die Retrotransposition wieder auf 35 bzw. 50 Prozent des Ausgangsniveaus erhöht werden konnte (Abb. 3.4). Diese zusätzlichen Punktmutationen verändern die mRNA-Sequenz und führen laut einer Strukturvorhersage wieder zur Herstellung der ursprünglichen räumlichen Struktur der RNA des C-Moduls. Einen Einfluss auf die Transkription bzw. die RNA-Stabilität der verwendeten artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons haben die zusätzlich eingeführten Mutationen nicht (Abb. 3.4). Diese vorhergesagte Wiederherstellung der räumlichen Struktur führt also auch zur Wiederherstellung der Retrotransposition. Allerdings konnte die Retrotransposition der artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup> nicht wieder auf das Ausgangsniveau gesteigert werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass nicht nur die Struktur der mRNA des C-Moduls, sondern auch deren Basensequenz eine Rolle spielt und somit ein entscheidender Faktor für die Retrotransposition ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, dass die von TRE5-A codierten Proteine eine hohe Spezifität für die Bindung ihrer eigenen RNA aufweisen, da durch die vorhergesagte Rekonstruktion der RNA-Struktur die Retrotransposition wieder hergestellt wird.

Zum Mechanismus der Retrotransposition von TRE5-A wird diskutiert, dass es ähnlich zum humanen L1-Element zur Ausbildung eines Präintegrationskomplexes (Ribonukleoprotein-Komplex) kommt (Chung *et al.*, 2007). Der Präintegrationskomplex würde dann ähnlich zum L1-Element (Doucet *et al.*, 2010) aus der TRE5-A-RNA und den Proteinen von ORF1 und ORF2 bestehen. RNA-Bindungseigenschaften von ORF1-Proteinen konnten durch mehrere Studien gezeigt werden (Kolosha & Martin, 2003; Schneider *et al.*, 2013). Darüber hinaus besitzt das ORF1-Protein von TRE5-A eine starke *cis*-Präferenz für die Bindung der eigenen RNA nach der Translation (Siol *et al.*, 2011). Hierbei handelt es sich jedoch wahrscheinlich um eine unspezifische RNA-bindende Aktivität, da bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass das ORF1-Protein an jede angebotene RNA *in vitro* bindet. Beispielsweise bindet es an alle C-Modul-Varianten, ohne die jeweiligen Mutationen in der Sequenz der C-Modul-mRNA voneinander zu unterscheiden. Die Furchen der von Stamm I und Stamm III vorhergesagten Struktur der mRNA des C-Moduls befinden sich auf derselben Seite der Helix (Abb. 4.1) und könnten für ein spezifisches Bindeprotein gleichzeitig als Interaktionsflächen zur Verfügung stehen. Da das ORF1-Protein die C-Modul-Varianten nicht unterscheidet, ist es plausibel anzunehmen, dass eine Domäne des ORF2-Proteins für die spezifische Erkennung der C-Modul-RNA verantwortlich ist. Beispielsweise wäre eine Bindung der Histidin-/ Cystein-reichen Domäne an die Struktur des C-Moduls denkbar. Histidin-/ Cystein-reiche-Domänen bilden Strukturen für die Bindung von Nucleinsäuren aus (Han, 2010). Bei dem humanen L1-Element führen Mutationen in der Cystein-reichen-Domäne zu einer erniedrigten Retrotranspositionsfrequenz und zu einem geringeren Anteil an ORF2-Proteinen innerhalb der Ribonukleoprotein-Komplexe (Doucet *et al.*, 2010). Eine andere Möglichkeit für die Erkennung der C-Modul-Struktur durch ORF2-Proteine wäre die Bindung der Endonuklease-Domäne. Endonukleasen binden an den Ribonukleoprotein-Komplex und führen diesen in den Kern zur Ziel-DNA (Kubo *et al.*, 2006). Dort schneiden sie den Minusstrang der Ziel-DNA und sorgen so für eine freie 3'-OH-Gruppe, die als *Primer* für die reverse Transkription der Retrotransposons-RNA dient (Mandal *et al.*, 2013).

Durch die Mutationen in der Basensequenz des C-Moduls (Stamm I und Stamm III der RNA-Struktur) wurde die Basenabfolge verändert, weshalb eine Sequenz-spezifische RNA-Protein-Bindung nur noch teilweise erfolgen kann. Dies erklärt, warum die

Retrotransposition von TRE5-A nicht wieder zu 100 Prozent hergestellt werden kann, obwohl die RNA wahrscheinlich wieder die gleiche räumliche Struktur wie bei Wildtyp-TRE5-As aufweist. Dieser mögliche Einfluss einzelner Basen auf die Retrotransposition müsste durch weitere *in vitro*- und *in vivo*-Experimente verifiziert werden. Beispielsweise könnten mit RNA-Protein-Interaktionsstudien zwischen den ORF-Proteinen und verschiedenen mutierten C-Modul-RNAs und weiteren Retrotranspositionsexperimenten genauere Aussagen bezüglich der Spezifität der Interaktion getroffen werden. Darüber hinaus können die hier gezeigten C-Modul-Varianten in weiterführenden Experimenten dazu genutzt werden, Proteine, die spezifisch an die C-Modul-RNA binden, zu identifizieren.

#### **4.2. TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons zeigen eine ähnliche Retrotransposition wie TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons**

Bislang war es nicht möglich die Retrotransposition von artifiziellen TRE5-A-Elementen in dem Blasticidin-resistenten *D. discoideum*-Stamm JH.D (Winckler *et al.*, 2001) zu untersuchen. Darum wurden im Rahmen dieser Arbeit artifizielle, mit einem Hygromycin-Resistenzmarker ausgestattete TRE5-A-Retrotransposons entwickelt, um die CbfA-abhängige Retrotransposition von TRE5-A in JH.D zu untersuchen. In den für diese Arbeit relevanten Experimenten wurde konzeptionell davon ausgegangen, dass ein einzelnes Retrotranspositionsereignis die betroffene Zelle resistent gegenüber Hygromycin machen muss, um das Retrotranspositionsereignis sicher nachweisen zu können. In früheren Studien konnte mit einem Hygromycin-Resistenzgen aus *E.coli* keine stabile Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B erzielt werden (Egelhoff *et al.*, 1989). Eine Erhöhung der Kopienzahl des Resistenzgens durch extrachromosomale Plasmide konnte daran nichts ändern (Betapudi *et al.*, 2004). Daher wurde versucht, die Expression des Hygromycin-Resistenzgens dadurch zu verbessern, dass der Codongebrauch von *E. coli* an *D. discoideum* und dessen hohen A/T-Gehalt im Genom angepasst wurde. Dabei wurde ca. ein Drittel der Basen des Gens ausgetauscht (Abb. 3.5). Die Anwendung mit dem im Codongebrauch angepassten Gen lieferte eine stabile Antibiotikums-Resistenz, auch mit geringen Kopienzahlen im Genom von *D. discoideum*, und reproduzierbare Ergebnisse.

Obwohl nicht experimentell untersucht, kann spekuliert werden, dass auch eine Einzelkopie des Gens eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, da die Anpassung des Codongebrauches wahrscheinlich zu einer verbesserten Expression des Resistenz-Gens geführt hat.

Mit den so markierten artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons konnte eine reproduzierbare Retrotransposition im Stamm AX2 nachgewiesen werden, welche nur geringe Unterschiede in der Retrotranspositionsfrequenz im Vergleich zu mit Blasticidin-Resistenzmarker markierten TRE5-A<sup>BSR</sup> aufwies (Abb. 3.6). Somit konnte das Retrotranspositionssystem mit diesen neuen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons erfolgreich angewandt werden. Darüber hinaus konnten Integrationen von artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons anhand von genomischer DNA aus AX2 nachgewiesen werden.

Die hier erzielten Ergebnisse lassen sich aufgrund des angepassten Codongebrauches nicht mit früheren Studien vergleichen. Es kann aber spekuliert werden, dass die früheren Ergebnisse aufgrund langsamer und unvollständiger Translation (Amoros-Moya *et al.*, 2010) erzielt wurden, da sich der Codongebrauch zwischen *E. coli* und *D. discoideum* erheblich unterscheidet. Eine verbesserte Expression des Hygromycin-Resistenzgens nach einer Optimierung des Codongebrauches konnte auch bei der Anwendung von Lentiviralen-Gen-*ontology*-Vektoren gezeigt werden (Weber *et al.*, 2010). Und auch für das Gentamicin-Resistenzgen kann nach Optimierung des Codongebrauches eine verbesserte Translation und verstärkte Antibiotikum-Resistenz in einem Actinobakterium nachgewiesen werden (Kucho *et al.*, 2013). Durch die Ausbildung einer stabilen Resistenz gegenüber Hygromycin B können die mit dem Hygromycin-Resistenzgen markierten TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons für die Untersuchung der CbfA-abhängigen Retrotransposition von TRE5-A im Stamm JH.D verwendet werden.

### **4.3. Die Abhängigkeit der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons von CbfA**

Durch die Etablierung des neuen Nachweissystems konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Retrotransposition von artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Stamm JHD untersucht werden. Dieser CbfA-Suppressionsstamm zeigt neben verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsdefekten (Winckler *et al.*, 2001;

Beck *et al.*, 2002) einen Einfluss auf die Retrotransposition und Transkription endogener autonomer TRE5-A-Retrotransposons (Bilzer *et al.*, 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die CbfA-abhängige Retrotransposition nicht mit endogenen TRE5-A betrachtet, sondern mit nicht-autonomen Retrotransposons, die *in trans* durch die Retrotransposon-Proteine der Wirtszelle mobilisiert werden müssen. Dies sollte der Anwendung der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons in Blasticidin-resistenten Zellen dienen und eventuelle Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zu den endogenen TRE5-A in JH.D aufzeigen.

#### 4.3.1. Abhängigkeit der Transkription

Vorherige Studien zeigten eine CbfA abhängige Transkription der endogenen TRE5A. Überraschenderweise zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass die TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Gegensatz zu den endogenen TRE5-A nicht CbfA-abhängig transkribiert werden (Abb. 3.7 C). Gründe für diese Diskrepanz sind zunächst nicht offensichtlich. TRE5-A wird in beiden Richtungen durch interne Promotoren exprimiert. Da für die artifiziellen TRE5-A der konventionelle Aktin-6-Promotor verwendet wurde, ist erstmal nicht davon auszugehen, dass die Plusstrang-RNA-Synthese von CbfA abhängig ist. Die Bildung der Minusstrang-RNA wird durch das C-Modul am 3'-Ende gesteuert (Schumann *et al.*, 1994). Da die Minusstrang-RNA in großen Mengen gebildet wird, liegt es nahe zu vermuten, dass eine Kontrolle der Transkriptmenge von TRE5-A durch posttranskriptionelles *Silencing* stattfindet (Schmith *et al.*, 2013). CbfA reguliert wahrscheinlich die Transkriptmenge der Minusstrang-RNA und beeinflusst so die Amplifikation von TRE5-A. Dieser Einfluss erfolgt wahrscheinlich indirekt durch Stabilisation der Minusstrang RNA, indem CbfA die Expression eines Gens reguliert, welches in posttranskriptionelles *Gen-Silencing* mittels RNA-Interferenz involviert ist (Bilzer *et al.*, 2011). Neuere Daten unterstützen diese Hypothese und zeigen, dass das Gen *agnC* im Stamm JH.D stark hochreguliert ist. AgnC gehört als Argonaut-Protein vermutlich zur posttranskriptionellen Expressionskontrolle in *D. discoideum* (Schmith *et al.*, 2013). Da die Transkription von TRE5-A<sup>HYG</sup> nicht in Abhängigkeit von CbfA verringert wird, ist der Einfluss von CbfA auf den Retrotranspositionsmechanismus von TRE5-A<sup>HYG</sup> nicht über die

Regulation der Transkription bzw. Expression der TRE5-A<sup>HYG</sup> zu erklären. Möglicherweise wird von den TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons aufgrund des zusätzlichen Aktin-15-Promotors des in *antisense*-Richtung liegenden Hygromycin-Resistenzgens mehr *antisense*-RNA produziert als von endogenen TRE5-A. Diese *antisense*-RNA verhält sich eher wie eine mRNA, da sie das Transkript des Resistenzgens darstellt und diese Resistenz auch ausgebildet wird. Somit wird diese *antisense*-RNA wahrscheinlich von der *Silencing*-Maschinerie der Zelle nicht wahrgenommen, so dass diese TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons nicht durch posttranskriptionelles *Silencing* reguliert werden.

### 4.3.2. Abhängigkeit der Retrotransposition

In dieser Arbeit konnte für die artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons, ähnlich zu den endogenen TRE5-A (Bilzer *et al.*, 2011), eine reduzierte Retrotranspositionsaktivität in Abwesenheit von CbfA beobachtet werden (Abb. 3.7 A). Die Retrotranspositionsfrequenz der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons konnte nicht durch eine ektopische Expression von CbfA oder dessen CTD komplementiert werden (Abb. 3.10 B). Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den Resultaten von endogenen TRE5-A, deren Retrotransposition durch CbfA, aber nicht durch dessen CTD komplementiert werden kann (Bilzer *et al.*, 2011). Eine Komplementation durch die CbfA-CTD alleine war also nach den Daten von Bilzer *et al.* (2011) nicht zu erwarten. Überraschend ist allerdings, dass das zusätzliche Einbringen von CbfA zu keiner Verbesserung der Retrotransposition führte. Als Erklärung für diesen Unterschied kann eine mangelnde Transkription der TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons im Stamm JH.D ausgeschlossen werden (siehe oben). Darüber hinaus konnte die Expression von Gesamt-CbfA bzw. dessen CTD in den komplementierten Transformanten eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Eine Erklärung könnte die mögliche Chromatinst gestaltende Funktion der Jumonji-Domäne (Tsukada *et al.*, 2006) von CbfA liefern. Vorstellbar wäre ein Einfluss auf die Retrotransposition von TRE5-A, indem CbfA dessen Integration durch Veränderung der Chromatin-Struktur im Bereich der tRNA-Gene unterstützt (Bilzer *et al.*, 2011). Diese Hypothese liefert eine Erklärung für die reduzierte Retrotranspositionsaktivität der TRE5-A im Stamm JH.D. Es muss dann aber für die

artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons spekuliert werden, dass diese Funktion durch die ektopische Expression von CbfA aus unbekanntem Gründen nicht komplementiert wurde. Eine andere Erklärung könnte der erniedrigte Transkriptlevel der endogenen TRE5-A-Retrotransposons im Stamm JH.D liefern (Bilzer *et al.*, 2011). Durch den erniedrigten TRE5-A-Transkriptlevel können nicht genügend ORF2-Proteine der endogenen TRE5-A in den Transformanten mit nicht-autonomen TRE5-A<sup>HYG</sup> exprimiert werden. Eine Komplementation mit CbfA kann möglicherweise trotz Wiederherstellung normaler RNA-Level das erforderliche Niveau an ORF2-Protein für eine *in trans*-Mobilisierung von TRE5-A<sup>HYG</sup> nicht wiederherstellen. Von dem ORF1-Protein von TRE5-A ist bekannt, dass es eine starke *cis*-Präferenz, das heißt eine höhere Affinität für die Bindung seiner eigenen RNA, aufweist (Siol *et al.*, 2011). Ob dies auch ähnlich zu dem L1-Element für die ORF2-Proteine von TRE5-A gilt, ist bisher ungeklärt (Siol *et al.*, 2011). Wenn die ORF2-Proteine ebenfalls eine starke *cis*-Präferenz aufwiesen, könnten diese neu gebildeten ORF2-Proteine bevorzugt für die RNA der endogenen TRE5-A zur Verfügung stehen. Dann wäre eine *in trans*-Mobilisierung der artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons nicht in ausreichendem Maße möglich. Die nicht-autonomen artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup> würden daher mit den endogenen TRE5-A konkurrieren. Diese Hypothese setzt voraus, dass die Proteine von ORF2 ein Teil des Präintegrationskomplexes von TRE5-A sind, worauf Daten aus dieser (Kapitel 3.1.1) und anderen Arbeiten hindeuten (Siol *et al.*, 2011). Ein möglicher Ansatz zur Untersuchung dieser Hypothese ist die Durchführung des Retrotranspositionsexperimentes mit autonomen artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons, die dann für ihre ORF1- und ORF2-Proteine selbst codieren. Zum einen könnte damit die Mobilisierung von TRE5-A<sup>HYG</sup> im Stamm JH.D im Vergleich zu AX2 und zu endogenen TRE5-A weiter untersucht werden und zum anderen könnte man herausfinden, ob die Retrotransposition der artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup> dann eine Reaktion auf die Komplementation mit CbfA zeigt.

#### 4.4. Der Einfluss der TBP-ORF1-Protein-Interaktion auf die Retrotransposition von artifiziellen TRE5-A<sup>HYG</sup> *in vivo*

*In vitro*-Versuche zum Retrotransposon TRE5-A zeigten, dass dessen spezifische Integration oberhalb von tRNA-Genen wahrscheinlich auf einer Interaktion des eigenen ORF1-Proteins mit dem TBP-Protein von TFIIB beruht. Diese Protein-Interaktion wird durch den Aminosäureaustausch S195K in der Helix 2' des TBP-Proteins aufgehoben (Chung *et al.*, 2007). In dieser Arbeit sollte die Relevanz dieser Protein-Interaktion bei der Retrotransposition von TRE5-A untersucht werden. Als Grundlage für die bevorstehenden Experimente wurde die Interaktion zwischen ORF1 und TBP, sowie der Einfluss der S195K-Mutation zunächst mittels des Hefe-Zweihybrid-Systems untersucht und lies sich erfolgreich nachweisen (Abb. 3.30). Somit konnten die Ergebnisse von Chung *et al.* (2007) bestätigt werden.

Um der Relevanz dieser Protein-Interaktion *in vivo* auf den Grund zu gehen, wurden TBP-*knock-in*-Stämme in *D. discoideum* generiert. TBP ist als Untereinheit von TFIIB Bestandteil aller RNA-Polymerase-Komplexe und somit in die Transkription vieler zellulärer RNAs (ribosomale-RNA, tRNA, mRNA) eingebunden (White, 2011). Daher ist es nicht überraschend, dass ein homozygoter *knock-out* von TBP in Mäusen letal ist (Martianov *et al.*, 2002). Somit schien es als wahrscheinlich, dass ein TBP *knock-out* im haploiden Genom von *D. discoideum* ebenfalls letal wäre. Daher wurde ein *knock-in* einem *knock-out* vorgezogen. Der *knock-in* scheint keinen Einfluss auf die Zellen zu haben, da keine Unregelmäßigkeiten im Wachstum im Vergleich zum Kontroll-Stamm ersichtlich waren. Mittels der etablierten *knock-in*-Stämme konnte gezeigt werden, dass die Protein-Interaktion des ORF1-Proteins mit dem TBP-Protein ebenfalls einen Einfluss auf die Retrotransposition artifizieller TRE5-A<sup>HYG</sup>-Retrotransposons *in vivo* hat. Es konnte eine signifikante Abnahme (75 %) der Retrotransposition von TRE5-A<sup>HYG</sup> in TBP S195K-Mutanten im Vergleich zur natürlichen TBP-*knock-in*-Mutante gezeigt werden (Abb. 3.15). Somit konnte die Relevanz der ORF1-TBP-Interaktion auf die Retrotransposition von TRE5-A *in vivo* nachgewiesen und damit die Daten aus Chung *et al.* (2007) erweitert werden. Durch die Mutation S195K in Helix 2' des TBP-Proteins verringert sich die Retrotransposition von TRE5-A<sup>HYG</sup> signifikant. Die Aminosäure Lysin zeigt nach den Chou-

Fasman-Parametern ein deutlich höheres helixbildendes Potential (1,16) als Serin (0,77) (Chou & Fasman, 1978), weshalb diese Mutation die Ausbildung einer Helix sogar unterstützen sollte. Die Bindung des ORF1-Proteins erfolgt somit wahrscheinlich auch *in vivo* hauptsächlich über Helix 2' von TBP, welche im TFIIIB-Komplex frei zugänglich sein muss. Der Aminosäure Serin scheint daher für die Bindung des ORF1-Proteins eine zentrale Bedeutung zu zukommen. Durch die Mutation S195K im TBP kommt es vermutlich zur Inhibition der Bindung von ORF1 an die Helix H2' von TBP. Möglicherweise beruht der Effekt auf der Ladung und/oder einer sterischen Behinderung basierend auf der Länge der Seitenkette des Lysins. Die S195K-Mutation wurde ausgewählt, da die Aminosäure Lysin an Position 333 des humanen TBP-Proteins der ausgeprägteste Unterschied in Helix H2' im Vergleich zum TBP-Protein von *D. discoideum* ist und hier der Aminosäure Serin an Position 195 entspricht (Chung *et al.*, 2007). Da keine sichtbaren Auswirkungen auf den Phänotyp der Zellen erkennbar waren, scheint die Mutation auf die *knock-in*-Zellen keinen Einfluss hinsichtlich der normalen Zellfunktionen auszuüben. Die Helix H2' von TBP hat so möglicherweise keine größere Bedeutung für den RNA-Polymerase III-Komplex. Dies könnte ein möglicher Grund sein, weshalb es für ORF1 von TRE5-A möglich ist dort zu binden.

Der Präintegrationskomplex von TRE5-A findet seinen Integrationsort oberhalb der tRNA-Gene wahrscheinlich über die Interaktion mit der TBP-Untereinheit von TFIIIB. TBP ist allerdings nicht nur Teil von TFIIIB des RNA-Polymerase III-Komplexes sondern auch der anderen Transkriptionskomplexe (Polymerase I-Komplex; Polymerase II-Komplex; TFIID) (Hernandez, 1993). TFIID zum Beispiel ist ein Multi-Proteinkomplex, der neben TBP noch mehrere TBP-assoziierte Faktoren enthält und im Gegensatz zum RNA-Polymerase III-Komplex zuerst an die Promotorregion der Gene bindet und damit die RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart positioniert (Yatherajam *et al.*, 2003). Da das ORF1-Protein von TRE5-A nur mit TBP des RNA-Polymerase III-Komplexes interagiert, kann spekuliert werden, dass das TBP-Protein in den anderen Transkriptionskomplexen aufgrund der weiteren Bindungspartner nicht frei zugänglich ist und daher TRE5-A nur oberhalb von tRNA-Genen integrieren kann. Bei dem RNA-Polymerase III-Komplex Typ II wird TBP zusammen mit Brf1 (B'-Komplex) von TFIIIC rekrutiert, nachdem dieser an den internen Promotor der tRNA-Gene gebunden hat (Vannini, 2013; Geiduschek & Kassavetis, 2001). Kristallstruktur-Analysen des TFIIIB-Komplexes in *S. cerevisiae* zeigen, dass die Bindung

von Brf1 an TBP hauptsächlich über zwei Regionen erfolgt (Juo *et al.*, 2003; Kassavetis *et al.*, 2005). Zum einen über die konvexe Seite von TBP, speziell die Helix H2, und zum anderen über die laterale Oberfläche um Helix H1. Zu einem geringen Anteil ist die TBP-Helix H2' an der Bindung von Brf1 beteiligt (Juo *et al.*, 2003; Kassavetis *et al.*, 2005). Somit ist die Helix H2' von TBP bei dieser Interaktion zum größten Teil frei zugänglich, so dass das ORF1-Protein von TRE5-A hier an exponierte Bereiche binden könnte. Darüber hinaus ist eine konkurrierende Bindung des ORF1-Proteins von TRE5-A zu der Bindung von Brf1 an die Helix H2' denkbar. Allerdings ist die Bindung von Brf1 wichtig für die Aktivität des Transkriptionskomplexes, so dass TRE5-A in dem Fall nur inaktive sich im Aufbau befindende RNA-Polymerase III-Komplexe ansteuern könnte, die noch kein Brf1 gebunden haben. Möglich wäre auch eine Verdrängung von Brf1 durch das ORF1-Protein von TRE5-A. Die Untereinheit Bdp1 von TFIIIB interagiert neben dem C-terminalen Teil von Brf1, ebenfalls mit TBP (Kassavetis *et al.*, 2005; Kassavetis & Geiduschek, 2006; Ishiguru *et al.*, 2002). Auch hier ist eine teilweise Bindung von Bdp1 an die Helix 2' von TBP denkbar. Diese Bindung würde ebenfalls mit der Interaktion des ORF1-Proteins konkurrieren. Generell lässt sich feststellen, dass mit *knock-in*-Mutanten die Bedeutung von Protein-Interaktionen in Bezug auf die Retrotransposition *in vivo* untersucht werden kann. So kann in weiterführenden Versuchen die Retrotransposition mit anderen TBP-Mutanten bzw. auch ORF1-Mutanten untersucht werden, da hier bisher nur Ergebnisse aus *in vitro*-Protein-Interaktionsstudien vorliegen (Chung *et al.*, 2007).

#### **4.5. Analyse der DGLT-A-Population von *D. discoideum***

Da es zum Retrotransposon DGLT-A bis jetzt kaum Untersuchungen gab, wurde es in dieser Arbeit strukturell analysiert. Alle strukturellen Ergebnisse wurden mit Hilfe bioinformatischer Analysen unter Verwendung der Konsensus-Sequenz gewonnen. Diesbezüglich ist anzumerken, dass diese Sequenz rein theoretischer Natur ist, und so innerhalb der 22 gefundenen DGLT-A-Integrationen nicht vorkommt. Formal kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Konsensus-Sequenz entsprechende DGLT-A nicht annotiert wurden.

Die LTR-Sequenz enthält mehrere DNA-Motive, die Hinweise auf eine U3-R-U5-Struktur liefern und so auch eine Aussage über die Länge der mRNA ermöglichen (Abb. 3.17). Weitere Hinweise für eine U3-R-U5-Struktur lieferten Ergebnisse der Transkriptionsstudien der artifiziellen  $\alpha$ DGLT-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons (Abb. 3.28). In Übereinstimmung mit den strukturellen Daten lässt sich schließen, dass eine U3-R-U5-Struktur der LTRs von DGLT-A mit hoher Wahrscheinlichkeit vorliegt und die mRNA vom 5'-Ende der 5'-LTR R-Region bis zum 3'-Ende der 3'-LTR R-Region gebildet wird. Dies stimmt mit der Struktur von anderen Retrotransposons überein (Benachenhou *et al.*, 2009, 2013). Der ORF von DGLT-A zeichnet sich durch 5 Proteindomänen aus, welche aufgrund verschiedener Protein-Motive und sequenzspezifischen Ähnlichkeiten zu anderen Retrotransposons zugeordnet werden konnten (Abb. 3.18). Anhand dieser Ergebnisse ließ sich feststellen, dass DGLT-A insbesondere große Ähnlichkeit zu den Ty-Retrotransposons von *S. cerevisiae* aufweist. In erster Linie zeigen die Reverse Transkriptase-, Ribonuklease H- und die Integrase-Domäne von DGLT-A strukturelle Merkmale von Ty3 (Sandmeyer *et al.*, 2002; Malik & Eickbush, 1999) auf. Eine weitere Gemeinsamkeit mit Ty-Elementen ist der Integrationsort in der Nähe von RNA-Polymerase III-Genen. Ty3 findet diesen Integrationsort aufgrund von Protein-Interaktionen der Integrase-Domäne mit TFIIB und TFIIC (Sandmeyer *et al.*, 1990; Yieh *et al.*, 2000, 2002). Durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Ty3 wurde die Hypothese aufgestellt, dass DGLT-A seinen Integrationsort auf ähnliche Weise erkennt und möglicherweise konvergent entwickelt hat. Diese Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit verifiziert. Für alle Protein-Domänen des ORFs konnte eine Transkription an genomischer DNA nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Ob diese Proteine exprimiert werden und zur Mobilisierung genutzt werden können, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die verschiedenen RNAs der unterschiedlichen DGLT-A-Retrotransposons mit DGLT-A-Proteinen zu einem funktionellen Komplex assoziieren und so auch nicht-autonome degradierte endogene DGLT-A *in trans* mobilisieren können. Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass die meisten endogenen DGLT-As verkürzt und degradiert sind, weshalb es zum Verlust der Proteindomänen der Reversen Transkriptase und Ribonuklease H und zum teilweisen Verlust der Integrase-Domäne kommt. Dadurch ist es möglich, dass nicht mehr ausreichende Mengen dieser Proteine in der Zelle zur Verfügung stehen, um den Retrotranspositionsprozess

erfolgreich ablaufen zu lassen. Da die verkürzten DGLT-As in ihrer Struktur und Sequenz nahezu identisch sind, deutet dies darauf hin, dass sie trotz der Deletionen *in trans* mobilisiert worden sein könnten. Die Proteine der Reversen Transkriptase- und Ribonuklease H-Domäne sind neben den anderen Proteinen für die Synthese der doppelsträngigen DNA anhand der gebildeten RNA essentiell (Malik, 2005). Dabei ist die Ribonuklease H für die Degradierung der RNA nach der Bildung des RNA-DNA-Hybridstrangs durch die Reverse Transkriptase und für die Freigabe der Polypurin-Bindestelle zuständig. Die Bildung der Doppelstrang-DNA ist entscheidend für den Lebenszyklus eines LTR-Retrotransposons (Wilhelm & Wilhelm, 2001; Malik, 2005). Ein weiteres Merkmal der Ribonuklease H von Retrotransposons sind 5 katalytische Reste (D10, E48, D70, H124, D134) wobei D10, E48 und D70 als Carboxylat-Triade stark konserviert sind und für die enzymatische Aktivität der Ribonuklease H essentiell sind (Malik & Eickbush, 2001). In der Ribonuklease H-Domäne der Konsensus-Sequenz sind 4 der 5 Reste vorhanden (D10, E48, D70, D134). Diese katalytischen Reste konnten auch in den wenigen vorhandenen Ribonuklease H-Sequenzen der untersuchten DGLT-A-Integrationen nachgewiesen werden. Daher lässt sich vermuten, dass die Ribonuklease H-Aktivität von DGLT-A nicht durch ein Fehlen der katalytischen Reste beeinflusst wird. Da nach den Daten dieser Arbeit die Ribonuklease H- und Integrase-Domäne Protein-Interaktionen mit TFIIC eingehen (Abb. 3.34), kann allerdings schon spekuliert werden, dass ein Fehlen oder ein zu geringer Anteil dieser Proteine in der Zelle die Retrotransposition zu Ungunsten von DGLT-A beeinflussen könnte. Theoretisch sollte aber auch eine geringe Menge an intaktem Protein von einem DGLT-A für eine Retrotransposition und eine spezifische Integration ausreichen.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Abstand zu den tRNA-Genen bei 14 der 22 DGLT-A-Integrationen nur 13-17 Basenpaare beträgt (Abb. 3.20). Dieser Abstand wird vom Ende des Retrotransposons bis zum ersten Nukleotid des angesprungenen tRNA-Gens definiert. Auch in diesem Punkt zeigt DGLT-A Ähnlichkeit zum Ty3-Retrotransposon aus *S. cerevisiae*. Dieses integriert 16-17 Basenpaare oberhalb des 5'-Endes des codierenden Teils eines tRNA-Gens oder 1-4 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes der tRNA-Gene (Chalker & Sandmeyer, 1990; Chalker & Sandmeyer, 1992). Dieser Abstand entspricht ungefähr 12 Basenpaaren oberhalb des ersten Nukleotides der tRNA-Gene, wenn man eine 5-12 Basenpaare lange 5'-

Führungssequenz im tRNA-Vorläufer (Prä-tRNA) annimmt (Chu & Hopper, 2013). DGLT-A weist demnach einige Eigenschaften der Ty3-Retrotransposons auf, die auch auf einen ähnlichen Mechanismus hinsichtlich der Integration oberhalb von tRNA-Genen hindeuten.

#### 4.6. DGLT-A steht in Konkurrenz zu den TRE5-Retrotransposons

Eine genauere Betrachtung der Integrationsorte von DGLT-A im Genom zeigte Assoziationen mit integrierten TRE-Retrotransposons, die Rückschlüsse auf die Integrationsreihenfolge der Retrotransposons an tRNA-Genen ermöglichen (Tab. 3.1, Abb. 3.21). Durch Integrationen mehrerer Retrotransposons an einem tRNA-Gen wird ersichtlich, dass tRNA-Gene bevorzugte multiple Integrationsorte verschiedener Retrotransposons sein können (Winckler *et al.*, 2011). Wie das Retrotransposon TRE5-A (Winckler *et al.*, 2011) integriert auch DGLT-A nicht in eigene Kopien. Jedoch kommt es zum Auftreten von Tandem-Bildungen (Abb. 3.21). So springen TREs tRNA-Gen-Loci an, in dessen Umgebung bereits ein TRE integriert ist. Das neue TRE springt aufgrund der Integrationsspezifität vor das vorhandene TRE und nicht hinein (Winckler *et al.*, 2011). Durch diesen Mechanismus wird das ursprüngliche TRE nicht zerstört. Es kommt so zu einer Art Clusterbildung aufgrund der Integrationsspezifität und nicht durch eine „Affinität“ der Retrotransposons zueinander. Entgegen der Tatsache, dass TRE5 nicht in eigene Kopien inseriert, springen sie allerdings sehr wohl in andere Retrotransposons. So werden DGLT-A-Retrotransposons, aufgrund der Integrationsspezifität von TRE5 von ca. 48 Basenpaaren oberhalb der tRNA-Gene, durch zeitlich nachfolgende TRE5-Integrationen zerstört. DGLT-A besitzt vermutlich eine geringere Retrotranspositionsfrequenz als TRE5-A, so dass DGLT-As häufig durch die aktiveren TRE5-Retrotransposons zerstört werden bevor sie selber mobilisieren. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, weshalb die Population von DGLT-A relativ klein und möglicherweise nicht mehr aktiv ist. Für die DGLT-A-Population scheint es von Nachteil zu sein einen ähnlichen Integrationsort wie das häufiger vorkommende TRE5-Retrotransposon in *D. discoideum* aufzuweisen. Auch die Tatsache, dass relativ viele Solo-LTRs im Genom gefunden wurden, zeigt, dass die Population von DGLT-A durch häufige

Rekombinationsereignisse verkleinert wird, da der ORF zwischen den LTRs deletiert wird. Möglicherweise wird dadurch auch die Retrotransposition der verbleibenden DGLT-As eingeschränkt, da die Menge an exprimierten ORF-Proteinen durch deren Deletion verringert wird und so nicht mehr genügend Protein für eine Mobilisierung zur Verfügung steht. Durch Untersuchungen in *S. cerevisiae* konnte in der Nähe von tRNA-Genen ein Gen-freies Fenster von ca. 800 Basenpaaren Länge ermittelt werden. Durch Integrationen in diesen Bereich kann die Wahrscheinlichkeit für Insertionsmutationen verringert werden (Bolton & Boeke, 2003). Der theoretische Schutz, den damit die tRNA-Gen gebundene Integration in kompakten Genomen bietet, stellt sich so als nachteilig für DGLT-A heraus, da es in direkter Konkurrenz zu TRE5-A steht.

#### 4.7. Konstruktion artifizierender DGLT-A-Retrotransposons

Mittels des Retrotranspositionsexperimentes mit genetisch markierten Retrotransposons können erfolgreich TRE5-A-Retrotransposons mobilisiert und dadurch Erkenntnisse über deren Mechanismus zur Erkennung von Integrationszielen erlangt werden (Siol *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde der in TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons verwendete Blasticidin-Resistenzmarker zur Mobilisierung von DGLT-A in *D. discoideum* angewandt. Mit Hilfe dieses Resistenzmarkers wurden artifizierender autonome und nicht-autonome DGLT-A<sup>BSR</sup> generiert, da bereits Mobilisierungen mit Resistenzmarkern und *in trans*-Mobilisierungen von anderen LTR-Retrotransposons bekannt sind (Merkulov *et al.*, 2001; Ribet *et al.*, 2004). Der Blasticidin-Resistenzmarker wurde anstelle des ORFs bzw. zwischen ORF und Polypurin-Bindestelle kloniert, so dass ein nicht-autonomes bzw. ein autonomes artifizierendes DGLT-A entstand.

Das nicht-autonome aDGLT-A<sup>BSR</sup> 1 besteht aus dem vorderen und hinteren LTR inklusive der tRNA-Primer-Bindestelle, der 5'-untranslatierten Region und der Polypurin-Bindestelle sowie dem Resistenzmarker. Zusätzlich wurde ein autonomes artifizierendes aDGLT-A<sup>BSR</sup> konstruiert, bei dem der ORF der Konsensus-Sequenz entspricht. Alle generierten aDGLT-A<sup>BSR</sup> werden, wenn auch nicht komplett gespleißt, transkribiert (Abb. 3.27, Abb. 3.28,). Allerdings konnte eine Retrotransposition nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Obwohl Blasticidin-resistente Klone gewonnen wurden, was

theoretisch ein eindeutiger Hinweis auf Retrotransposition der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup> ist, konnte deren Mobilisierung an genomischer DNA nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.29). Daher kann aus diesen Ergebnissen keine eindeutige Schlussfolgerung über die Fähigkeit zur Retrotransposition der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup> getroffen werden.

Eine Möglichkeit wäre, dass eine Retrotransposition der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup> nicht stattgefunden hat. Diese Annahme impliziert, dass die Blasticidin-Resistenz der Klone ein Artefakt darstellt. Der Blasticidin-Resistenzmarker wurde mit dem Ziel entworfen, dass nur nach der Transkription des Retrotransposons und dessen erfolgreicher Integration eine funktionelle Blasticidin S-Deaminase und somit Blasticidin-resistente Klone entstehen können (Siol *et al.*, 2011). Möglicherweise kann die Zelle eine Blasticidin-Resistenz ausbilden ohne das Intron heraus zu spleißen, da in unmittelbarer Nähe nach dem Intron ein zusätzliches ATG existiert (Abb. 4.2). Das Resultat wäre eine N-terminal verkürzte Variante der Blasticidin S-Deaminase. Wenn diese verkürzte Variante immer noch funktionell wäre, könnte damit die Blasticidin-Resistenz der Klone erklärt werden, ohne dass eine Retrotransposition stattgefunden hat. Gegen diese Theorie spricht, dass bei den artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons keine Pseudo-resistenten Klone beobachtet wurden. Darüber hinaus zeigt eine Spleiß-Donor-Mutante der artifiziellen TRE5-A<sup>BSR</sup> keine Retrotransposition (Siol *et al.*, 2011). Diese müsste jedoch vorliegen, wenn es eine alternativ translatierte und funktionelle Blasticidin S-Deaminase gäbe. Letztendlich müsste dieser Theorie in weiteren Experimenten nachgegangen werden.

1	ATTAAATTAA	ATAAAAAATA	AAAATGGATC	AATTTAACAT	TTCTCAACAC
			M D Q	F N I	S Q Q
51	TATAATTAAA	AAAAGGTAA	GGTTAGGTAC	TTTTTTTTTG	CTTTTCTTT
101	TCTTTTTTAA	TATTAAAAC	TACAGATCTA	GAATTAGTAG	AAGTAGCGAC
			D L	E L V E	V A T
151	AGAGAAGATT	ACAATGCTTT	ATGAGGATAA	TAAACATCAT	GTGGGAGCGG
	E K I	T M L Y	E D N	K H H	V G A A
201	CAATTCGTAC	GAAAACAGGA	GAAATCATT	CGGCAGTACA	TATTGAAGCG
	I R T	K T G			

**Abbildung 4.2. Vermutliche Alternativen bei der Translation des Blasticidin-Resistenzgens.**

Darstellung der möglichen Translationsmöglichkeiten des Blasticidin-Resistenzgens anhand eines Sequenzausschnittes. Das normale Startcodon vor dem Intron ist in grün, das alternative Startcodon für ein kürzeres Protein ist in rot dargestellt. Das eingefügte Intron ist in grau hervorgehoben.

Eine Erklärung für die Annahme, dass keine Mobilisierung stattgefunden hat, könnte im unvollständigen Spleißen der artifiziellen DGLT-A liegen. Der Grund könnte in der Platzierung des Introns in den artifiziellen autonomen DGLT-A liegen. Das Intron befindet sich sehr weit hinten in einer sehr langen RNA. Eventuell kommt es dadurch nicht zur korrekten Prozessierung der RNA, weshalb die Zellen keine ausreichende Blasticidin-Resistenz entwickeln können. Möglicherweise reicht aber auch die Promotor-Funktion des 5'-LTRs von DGLT-A<sup>BSR</sup> nicht für eine erfolgreiche Mobilisierung aus. Wäre dies der Fall, könnte der Einsatz eines starken Promotors (z.B. Aktin-15-Promotor) an Stelle oder vor dem 5'-LTR zu einer Verbesserung der Retrotransposition führen. Den Theorien des unvollständigen Spleißens oder eines zu schwachen Promotors steht allerdings gegenüber, dass zum einen Blasticidin-resistente Klone gewonnen wurden und zum anderen die Transkription der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup> nachweisbar war. Des Weiteren konnten unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe die Mobilisierung eines anderen LTR-Retrotransposons zeigen, welches ähnlich dem artifiziellen DGLT-A konstruiert ist und die Blasticidinresistenz-Kassette inkl. des Introns an gleicher Stelle besitzt.

Die zweite Möglichkeit ist, dass eine Retrotransposition der artifiziellen DGLT-A<sup>BSR</sup> stattgefunden hat. Widersprüchlich ist allerdings die Tatsache, dass die Retrotransposition an genomischer DNA der Blasticidin-resistenten Klone mittels PCR nicht nachweisbar war. Dies ließe sich damit erklären, dass nur eine ungenügende PCR-Amplifikation der wenigen mobilisierten gespleißten Kopien der aDGLT-A<sup>BSR</sup> stattfindet. In der PCR könnte die Amplifikation der gespleißten Kopien durch einen großen Überschuss an eingebrachten aDGLT-A<sup>BSR</sup> mit ungespleißtem *mbsr1*-Gen behindert werden. Bei der für diese Untersuchung angewandten PCR entstehen gleichzeitig zwei Fragmente. Zum einen das gespleißte *mbsr*-Gen, zum anderen das ungespleißte *mbsr1*-Gen inklusive Intron. Die Effizienz dieser PCR könnte sich je nachdem wie viel *Template* für jedes Fragment vorhanden ist deutlich unterscheiden. Diesbezüglich konnte beobachtet werden, dass trotz konstanter Klonzahlen im Retrotranspositionsexperiment von TRE5-A der PCR-Nachweis der gesprungenen TRE5-A<sup>BSR</sup> signifikante Unterschiede im Verhältnis der beiden zu erwartenden PCR-Produkte lieferte. Dies spricht dafür, dass der Nachweis der Retrotransposition anhand von genomischer DNA von der jeweiligen *Template*-Konzentration abhängig ist. Vermutlich ist der Nachweis der TRE5-A<sup>BSR</sup> im Vergleich zu aDGLT-A<sup>BSR</sup> leichter, da die Anzahl der mobilisierten TRE5-A<sup>BSR</sup> pro Zelle

höher ist als die von aDGLT-A<sup>BSR</sup> und somit auch deutlich mehr *Template* für den PCR-Nachweis vorhanden ist. Eine alternative Nachweismethode von artifiziellen DGLT-A könnte die direkte Suche an tRNA-Genen sein. Dies könnte mittels PCR und einem tRNA-Gen spezifischen und einem im DGLT-A bindenden Oligonukleotid erfolgen (ähnlich Abb. 3.8).

Eine alternative Erklärung könnte sein, dass die Retrotranspositionsfrequenz der aDGLT-A<sup>BSR</sup> durch DNA-Methylierung oder posttranskriptionelles Gen-*Silencing* mittels RNA-Interferenz herabgesetzt wird. Dadurch könnte es zu wenige Kopien der artifiziellen Retrotransposons geben, die wiederum nicht per PCR nachgewiesen werden können. Beispielsweise lässt sich die Transkription und Mobilisierung des Retrotransposons *Skipper* in *D. discoideum*-Stämmen erhöhen, die keine Methylierung mehr zeigen oder bei denen Proteine des RNA-Interferenz-*Pathways* ausgeschaltet sind (Kuhlmann *et al.*, 2005). Das Retrotransposon DIRS-1 wird ebenfalls posttranskriptional durch *Silencing* reguliert. Dies geschieht durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase RrpC, die in die Genregulation durch RNA-Interferenz involviert ist (Wiegand *et al.*, 2013). Um diese Sachverhalte für DGLT-A zu untersuchen, könnten die artifiziellen DGLT-A-Retrotransposons in Methylierungs- oder RNA-Interferenz-Mutanten von *D. discoideum* transformiert und auf Retrotransposition untersucht werden.

#### 4.8. DGLT-A interagiert nicht mit TFIIB

Die Retrotransposons TRE5-A aus *D. discoideum* und Ty3 aus *S. cerevisiae* weisen eine Integrationsspezifität oberhalb von tRNA-Genen auf, die auf einer Protein-Interaktion mit TFIIB beruht. Um die Hypothese zu untersuchen, dass DGLT-A über die gleiche Strategie integriert, wurde systematisch nach Interaktionen zwischen DGLT-A-Proteinen und TFIIB-Untereinheiten im Hefe-Zweihybrid-System gesucht. Als Positivkontrolle wurde die TBP-ORF1-Protein-Interaktion von TRE5-A genutzt, welche mittels des bakteriellen Zweihybrid-Systems entdeckt wurde (Chung *et al.*, 2007). Für das Retrotransposon DGLT-A konnten mit diesem System allerdings keine Protein-Interaktionen mit TFIIB nachgewiesen werden (Abb. 3.31). Somit konnte die Hypothese nicht bestätigt werden, obwohl DGLT-A und Ty3 strukturelle Gemeinsamkeiten und einen ähnlichen Abstand zu

tRNA-Genen aufweisen. Allerdings können Interaktionen mit TFIIB aufgrund dieses *in vitro*-Testsystems trotzdem nicht ausgeschlossen werden, da mit Zweihybrid-Systemen nur qualitative Aussagen getroffen werden können. So können zum Beispiel Interaktionen nicht detektiert werden, wenn die Proteine keine ausreichende Expression zeigen. Hinzu kommt, dass in dieser Arbeit mit TFIIB eukaryotische Proteine getestet wurden, welche an der Transkription und somit an wichtigen Prozessen des Zellzyklus beteiligt sind (Schramm & Hernandez, 2002). Dadurch kann es sein, dass die in den Hefezellen stattfindenden Transkriptionsprozesse gestört wurden. Des Weiteren sind die TFIIB-Proteine von *S. cerevisiae* und *D. discoideum* homolog (Chung *et al.*, 2007), wodurch die Ergebnisse verfälscht werden könnten.

#### **4.9. Protein-Interaktionen zwischen DGLT-A und TFIIC definieren dessen Integrationsort**

Aufgrund der Nähe des Integrationsortes von DGLT-A zu den tRNA-Genen und dem Ausschluss von TFIIB als Interaktionspartner wurde vermutet, dass TFIIC der entscheidende Faktor bei der Zielfindung des Integrationsortes von DGLT-A sein könnte. TFIIC bindet direkt an tRNA-Gene und erst danach wird TFIIB rekrutiert (Geiduschek & Kassavetis, 2001). Untersuchungen mit dem Hefe-Zweihybrid-System bestätigten die oben beschriebene Annahme. So konnten Interaktionen des DGLT-A-Bereichs RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) mit den Fragmenten der TFIIC-Untereinheiten Tfc<sub>446-608</sub> und Tfc<sub>122-401</sub> identifiziert werden (Abb. 3.34). Eine weitere Aufteilung der RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) zeigte, dass nur die RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) und die N-terminale Extension der Integrase (IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>)) mit dem Fragment Tfc<sub>446-608</sub> interagieren (Abb. 3.34). Diese beiden näher identifizierten Interaktionen konnten mittels eines *Pulldown*-Experimentes mit in Bakterien exprimierten Proteinen nachgewiesen werden (Abb. 3.36). Somit konnten die Ergebnisse durch die Verwendung einer anderen Methode bestätigt werden. Daher ist es plausibel anzunehmen, dass die RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) den entscheidenden Beitrag zur Interaktion mit Tfc4 liefert. Eine weitere Interaktion wurde zwischen der RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) und IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) beobachtet (Abb. 3.37). Diese Interaktionen lassen darauf schließen, dass die RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>), IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) und das Fragment Tfc<sub>446-</sub>

608 eine Protein-Interaktion eingehen, um den Integrationsort von DGLT-A zu definieren. Da mit dem Hefe-Zweihybrid-System nur qualitative Aussagen möglich sind, können diese Interaktionen allerdings nicht hinsichtlich ihrer Stärke beurteilt werden. Dieses Experiment wurde nur mit den beiden TFIIC-Untereinheiten Tfc1 und Tfc4 durchgeführt, da nur diese mit den orthologen Proteinen aus *S. cerevisiae* im Genom von *D. discoideum* zu identifizieren waren. Daher sind die weiteren Untereinheiten nicht untersucht worden. Tfc4 ist durch das Vorkommen mehrerer TPR-Motive gekennzeichnet. Diese sind an der Bildung von Protein-Protein-Interaktionen und Multiproteinkomplexen beteiligt (Marck *et al.*, 1993; Blatch & Lässle, 1999). Interessanterweise wird die hier gefundene Interaktionsfläche des Fragmentes Tfc4<sub>446-608</sub>, welche mit der RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) interagiert, durch 4 dieser Motive gekennzeichnet (TPR-Reihe II, TPR 6-9). Dies spricht dafür, dass die TPR-Motive ein entscheidender Faktor bei der Interaktion dieser beiden Proteine sind. Neben der Bedeutung der TPR-Motive von Tfc4 für die Protein-Interaktion mit DGLT-A sind diese auch für die Interaktion mit TFIIB wichtig. Der N-terminale Teil von Tfc4 (TPR-1-9), insbesondere die TPRs 6-9, bildet die entscheidende Bindungsfläche für die TFIIB-Untereinheiten Brf1 und Bdp1 (Liao *et al.*, 2006). Daher kann vermutet werden, dass die Bindung der DGLT-A-Proteine an Tfc4 mit den TFIIB-Untereinheiten Brf1 und Bdp1 konkurriert. DGLT-A könnte damit komplett unabhängig von TFIIB Stellen im Genom von *D. discoideum*, die nur TFIIC enthalten, anspringen. Solche Stellen sind beispielsweise bei den Centromeren in *S. cerevisiae* bekannt. Dort finden Interaktionen zwischen TFIIC und Nukleosomen in Abwesenheit von TFIIB statt (Nagarajavel *et al.*, 2013). Im Vergleich zu DGLT-A dienen für das *D. discoideum*-Retrotransposon TRE5-A nur Stellen mit TFIIC/TFIIB-Komplex als Integrationsziel.

Im Gegensatz zu TRE5-A und Ty3 aus *S. cerevisiae* findet DGLT-A seinen Integrationsort nicht aufgrund von Protein-Interaktionen mit TFIIB, sondern mit TFIIC. Zwar können auch für Ty3 Interaktionen mit der TFIIC-Untereinheit Tfc1 nachgewiesen werden, diese beeinflussen aber nur die Orientierung von Ty3 (Aye *et al.*, 2001). Der Integrationsort von Ty3 wird durch eine Interaktion der Integrase mit TFIIB definiert (Yieh *et al.*, 2000, 2002; Xiaojie & Sandmeyer, 2012). Im Gegensatz dazu ist der entscheidende Teil bei DGLT-A die RNH (DGLT-A<sub>733-1067</sub>). Aus den Vergleichen von RH-B (DGLT-A<sub>733-1067</sub>) und des Integrase-Bereiches (DGLT-A<sub>1057-1437</sub>) von DGLT-A und Ty3 wurde der DGLT-A-Teil von Aminosäure 994-1067 als N-terminaler Teil der Integrase-Domäne (IN<sup>NTD.1</sup>) definiert. Für die

IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) wurde eine Protein-Interaktion mit Tfc4 nachgewiesen (Abb. 3.34). Im Gegensatz dazu interagiert der entsprechende Teil des Retrotransposons Ty3 in *S. cerevisiae* mit Tfc1 (Aye *et al.*, 2001). Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die TFIIC-Untereinheiten Tfc1, Tfc4 und Tfc7 als Domäne  $\tau_A$  an die A-Box binden (Geiduschek & Kassavetis, 2001). Wird eine Ähnlichkeit im Aufbau von TFIIC zwischen *S. cerevisiae* und *D. discoideum* vorausgesetzt, kann angenommen werden, dass dadurch der kurze Abstand von DGLT-A zu den tRNA-Genen in *D. discoideum* definiert wird. Aufgrund des geringen Abstandes zu den tRNA-Genen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass ebenfalls eine Interaktion zwischen DGLT-A-Proteinen und TFIIB stattfindet, da sowohl Komponenten von TFIIB als auch von TFIIC erreichbar wären. Insgesamt implizieren die Daten dieser Arbeit, dass DGLT-A und Ty3 unterschiedliche Strategien entwickelt haben um ihren Integrationsort zu finden, obwohl beide einen ähnlichen Abstand zu den tRNA-Genen aufweisen.

DGLT-A-Retrotransposons sind in beiden Orientierungen oberhalb von tRNA-Genen zu finden. Ob die Orientierung während der Integration durch bestimmte Protein-Interaktionen beeinflusst wird, bleibt im Moment ungeklärt und müsste durch weitere Untersuchungen betrachtet werden. So könnte zum Beispiel der Integrationsort durch TFIIC-Interaktionen, die Orientierung aber durch TFIIB-Interaktionen bestimmt werden, oder aber ähnlich zu Ty3 (Aye *et al.*, 2001) die Erkennung der tRNA-Gene über TFIIB und die Orientierung über TFIIC erfolgen.

In weitergehenden Untersuchungen sollten die Interaktionsflächen der RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) und der IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) mit dem Fragment Tfc4<sub>446-608</sub> näher definiert werden. Darüber hinaus sollten die drei Integrase-Fragmente hinsichtlich ihrer neuen Einteilung (NTD, CCD, CTD) auf Protein-Interaktionen mit TFIIB, TFIIC und DGLT-A getestet werden. Eine weitere Untersuchung der Tfc4-Interaktionsfläche mit RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) und IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) scheint ebenso interessant, da möglicherweise die Interaktionsfläche auf einen der 4 TPRs eingeschränkt werden könnte. Zusätzlich sollte durch Mutationen versucht werden die Interaktionen von Tfc4 mit RNH (DGLT-A<sub>733-879</sub>) und IN<sup>NTD.1</sup> (DGLT-A<sub>994-1067</sub>) zu stören, um die Interaktionsfläche auf mögliche wichtige Aminosäuren einzuschränken. Weiterführende Ergebnisse hinsichtlich der Retrotransposition von DGLT-A könnten auch durch Untersuchungen möglicher RNA-Protein-Interaktionen erfolgen.

## 4.10. Erkennung von Integrationszielen: Konvergente Evolution

Die tRNA-Gen-spezifische Integration von Retrotransposons wurde bislang nur in zwei Organismen gefunden, in *S. cerevisiae* und in *D. discoideum*. (Kim *et al.*, 1998; Glöckner *et al.*, 2001). Die Genome von *S. cerevisiae* und *D. discoideum* sind ähnlich kompakt gebaut, die intergenischen Bereiche sind relativ klein (Oliver *et al.*, 1992; Eichinger *et al.*, 2005). Daher scheint es plausibel, dass in diesen Genomen ein hoher Selektionsdruck auf mobilen Elementen liegt. In der Bäckerhefe befindet sich in der Nähe von tRNA-Genen ein ca. 800 Basenpaare großes Gen-freies „Fenster“, da benachbarte RNA-Polymerase II-Gene durch aktive tRNA-Gene reprimiert werden (Bolton & Boeke, 2003). Dieses Fenster wird zur Integration von Retrotransposons genutzt, wodurch Mutationen im Genom vermieden werden könnten. Es lässt sich feststellen, dass die Erkennung von tRNA-Genen als scheinbar „sicheres“ Integrationsziel mehrfach in den beiden Organismen entstanden ist (Kim *et al.*, 1998; Glöckner *et al.*, 2001).

In *D. discoideum* ist diese Erkennung von tRNA-Genen als Integrationsziel dreimal entwickelt worden. Dabei gehören die Retrotransposons TRE5-A, TRE3 und DGLT-A unterschiedlichen Gruppen von Retrotransposons an. So integriert das Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A ca. 48 Basenpaare oberhalb von tRNA-Genen und findet dieses Ziel wahrscheinlich aufgrund einer Protein-Interaktion des eigenen ORF1-Proteins mit der TFIIB-Untereinheit TBP (Kapitel 3.1, Chung *et al.*, 2007). DGLT-A dagegen zählt zu den LTR-Retrotransposons und integriert ca. 14-30 Basenpaare oberhalb von tRNA-Genen (Glöckner *et al.*, 2001). Es findet seinen Integrationsort wahrscheinlich aufgrund einer Protein-Interaktion der ORF1-Domänen RNH und Integrase mit der TFIIC-Untereinheit Tfc4 (Kapitel 3.2.7). Für das mit TRE5-A verwandte Non-LTR-Retrotransposon TRE3 wird ein ähnlicher Integrationsmechanismus wie für TRE5-A angenommen, aber mit TFIIC an Stelle von TFIIB (Winckler *et al.*, 2005). TRE3s integrieren allerdings ca. 100 Basenpaare unterhalb der B-Box von tRNA-Genen (Szafranski *et al.*, 1999). Damit ist der Mechanismus der tRNA-Gen-Erkennung wahrscheinlich mehrfach unabhängig in *D. discoideum* entstanden.

Auch in *S. cerevisiae* wurde die Erkennung von tRNA-Genen als Integrationsort mehrfach entwickelt. So weisen die LTR-Retrotransposons Ty1 und Ty3, obwohl miteinander

verwandt, unterschiedliche Erkennungsmechanismen auf. Für das *copia*-ähnliche Retrotransposon Ty1 bildet eine bestimmte Nukleosomenoberfläche das Integrationsziel (Bridier-Nahmias & Lesage, 2012), während das *gypsy*-ähnliche Retrotransposon Ty3 über eine Interaktion seiner Integrase mit den TFIIIB-Untereinheiten TBP und Brf1 seinen Integrationsort erkennt (Yieh *et al.*, 2002). Die Integration von Ty3 am Startpunkt der RNA-Polymerase III-Transkription oberhalb der tRNA-Gene scheint nach neusten Analysen sehr spezifisch zu sein (Qi *et al.*, 2012).

Somit ist nicht nur innerhalb eines Organismus die Erkennung von tRNA-Genen als Integrationsort entstanden. Die strukturell ähnlichen und miteinander verwandten (*gypsy*-ähnlichen) LTR-Retrotransposons DGLT-A und Ty3 der Organismen *D. discoideum* und *S. cerevisiae* haben die Strategie zur tRNA-Gen-Erkennung wahrscheinlich unabhängig voneinander entwickelt, da sie unterschiedliche Mechanismen aufweisen. So nutzt Ty3 zur Zielerkennung TFIIIB (Yieh *et al.*, 2002), DGLT-A hingegen TFIIIC. DGLT-A nutzt dafür die Domänen RNH und Integrase. Ty3 definiert seinen Integrationsort dagegen nur über die Integrase (Qi *et al.*, 2012).

Möglicherweise ist die Integrationsspezifität von DGLT-A und TRE5-A aber auch nur ein Artefakt, da Integrationen in Euchromatin und somit in codierende Bereiche gerade in haploiden Genomen wie *D. discoideum* oftmals letal sind (Winckler *et al.*, 2011). Zellen mit diesen Integrationen sind somit nicht mehr sichtbar und können daher nicht untersucht werden. Bei heutigen Genomanalysen werden in der Regel verhältnismäßig „alte“ Sprungereignisse betrachtet. Es blieb demnach genug Zeit schädliche Integrationen zu selektieren, so dass solche nicht gefunden werden können. Mit dem in dieser Arbeit angewandten Retrotranspositions-Testsystem, welches auf einem eine Blasticidin-Resistenz vermittelnden Retrotransposon basiert, könnten „neue“ Integrationen genomweit kartiert werden. Möglicherweise können dadurch auch Integrationen unabhängig von tRNA-Genen gefunden werden. Trotzdem zeigt die vorliegende Arbeit im Zusammenhang mit der Literatur, dass der RNA-Polymerase III-Komplex einen entscheidenden Beitrag für die Zielfindung von „sicheren“ Integrationsorten in kompakten Genomen für Retrotransposons spielt.

---

## 5. Zusammenfassung

---

Das haploide Genom der „sozialen Amöbe“ *Dictyostelium discoideum* weist eine hohe Gendichte auf. Ein signifikanter Anteil dieses Genoms besteht aus mobilen genetischen Elementen, die ein hohes Risiko für Insertionsmutagenesen darstellen. Als grundlegende Hypothese dieser Arbeit wird vermutet, dass die Retrotransposons TRE5-A und DGLT-A positionsspezifisch oberhalb von tRNA-Genen im Genom von *Dictyostelium discoideum* integrieren, um Insertionsmutagenesen zu vermeiden. Als Ziel dieser Arbeit sollten deshalb die molekularen Mechanismen der tRNA-Gen-Erkennung durch TRE5-A und DGLT-A untersucht werden.

*In vitro*-Daten deuten darauf hin, dass das Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A seinen Integrationsort aufgrund einer Interaktion zwischen dem eigenen codierten ORF1-Protein mit dem TATA-Bindeprotein (TBP) des Transkriptionsfaktors IIIB findet. In dieser Arbeit wurden *knock-in*-Mutanten von TBP erzeugt, um die Bedeutung der Protein-Interaktion zwischen ORF1 und TBP für die Retrotransposition von TRE5-A *in vivo* untersuchen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass die tRNA-Gen gerichtete Retrotransposition von TRE5-A *in vivo* durch eine Interaktion des ORF1-Proteins mit der Helix H2' von TBP bestimmt wird. Darüber hinaus wurden auch strukturelle Voraussetzungen von TRE5-A für eine effiziente Retrotransposition analysiert. Es zeigt sich, dass eine Sekundärstruktur des 3'-Endes der RNA von TRE5-A für dessen Retrotransposition *in vivo* essentiell ist. Die Bildung der RNA als Voraussetzung für die Retrotransposition von TRE5-A wird durch den C-Modul-bindenden-Wirtsfaktor A kontrolliert. In dieser Arbeit wurde ein *in vivo*-Retrotranspositionsmodell für TRE5-A entwickelt und gezeigt, dass der C-Modul-bindende-Faktor A neben der Akkumulation von TRE5-A-Transkripten auch dessen Retrotransposition positiv beeinflusst.

Erstmals wurde mit dieser Arbeit das LTR-Retrotransposon DGLT-A näher untersucht. Dieses mobile Element weist eine zu TRE5-A ähnliche Integrationspezifität an tRNA-Genen auf. Daher wurde untersucht, ob DGLT-A zur Erkennung des Integrationsortes ebenfalls Protein-Interaktionen zwischen eigens codierten Proteinen und Untereinheiten von Transkriptionsfaktoren nutzt. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die

Ribonuklease H-Domäne von DGLT-A eine direkte Interaktion mit der Untereinheit Tfc4 des Transkriptionsfaktors IIIC eingeht.

Durch diese Daten kann gezeigt werden, dass die Erkennung der tRNA-Gene als „sichere“ Integrationsorte durch TRE5-A und DGLT-A in *Dictyostelium discoideum* unabhängig voneinander auf unterschiedliche Weise erfolgt. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde die aktive Integration durch Protein-Interaktionen in der Nähe von tRNA-Genen ebenfalls mindestens zweimal realisiert. Somit unterstützen die vorliegenden Daten die Hypothese, dass eine Form konvergenter Evolution auf molekularer Ebene dazu beitragen könnte, dass sich mobile Elemente durch Integration in der Nähe von tRNA-Genen in kompakten Genomen halten können.

---

## 6. Abstract

---

The haploid genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* is characterized by a high gene density. A significant part of this genome consists of mobile genetic elements. These elements pose a high risk for insertional mutagenesis. The working hypothesis for this dissertation is that the specific integration of the retrotransposons TRE5-A and DGLT-A upstream of tRNA genes in the genome of *Dictyostelium discoideum* represents a successful strategy to avoid insertional mutagenesis. Therefore the aim of this work was to examine the molecular mechanism of targeting tRNA genes through TRE5-A and DGLT-A.

*In vitro* studies indicate that the non-long terminal repeat retrotransposon TRE5-A detects his integration site on the basis of a protein interaction between its own encoded ORF1 protein and the tata-binding protein (TBP) of the transcription factor IIIB. To investigate the relevance of this protein interaction to the retrotransposition of TRE5-A *in vivo* TBP knock-in mutants were generated. It was shown that the tRNA gene directed retrotransposition of TRE5-A *in vivo* is based on an interaction between the ORF1 protein and helix H2' of TBP. Furthermore structural conditions of TRE5-A for efficient retrotransposition were analyzed. Results have shown that a secondary structure in the RNA of the 3' untranslated region of TRE5-A is essential *in vivo*. The formation of RNA as a requirement for the retrotransposition process of TRE5-A is controlled by the host C-module-binding factor A. An *in vivo* retrotransposition model for TRE5-A was generated and it could be shown that the C-module-binding factor A has an effect on both accumulation of TRE5-A transcripts and TRE5-A retrotransposition.

For the first time the long terminal repeat retrotransposon DGLT-A was analyzed in greater detail. This mobile element shows a specific integration near tRNA genes similar to TRE5-A. Thus it was investigated whether DGLT-A targets tRNA genes by using protein interactions between own encoded proteins and subunits of transcription factors as well. Regarding this it could be shown that there is a direct interaction between the ribonuclease H domain and the subunit Tfc4 of the transcription factor IIIC.

The here generated data demonstrate that targeting of tRNA genes as save integration sites is controlled independently in different ways by TRE5-A and DGLT-A in *Dictyostelium*

*discoideum*. Also in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* the active integration near tRNA genes that is based on protein interactions was realized at least twice. Therefore these data support the hypothesis that a form of convergent evolution at molecular level could help to keep in compact genomes by mobile elements through integration near tRNA genes.

---

## 7. Referenzen

---

**Alvarez-Curto E., Rozen D. E., Ritchie A. V. et al.** (2005) Evolutionary origin of cAMP-based chemoattraction in the social amoebae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:6385-6390.

**Amorós-Moya D., Bedhomme S., Hermann M. et al.** (2010) Evolution in Regulatory Regions Rapidly Compensates the Cost of Nonoptimal Codon Usage. *Mol. Biol. Evol.* **27 (9)**:2141-2151.

**Anzai T., Osanai M., Hamada M. et al.** (2005) Functional roles of 3'-terminal structures of template RNA during in vivo retrotransposition of non-LTR retrotransposon, R1Bm. *Nucleic Acids Res.* **33(6)**:1993-2002.

**Arkhipova I. R., Mazo A. M., Cherkasova V. A. et al.** (1986) The steps of reverse transcription of *Drosophila* mobile dispersed genetic elements and U3-R-U5 structure of their LTRs. *Cell* **44**:555-563.

**Asghar A., Groth M., Siol O. et al.** (2012) Developmental gene regulation by an ancient intercellular communication system in social amoebae. *Protist* **163(1)**:25-37.

**Ashworth J.M., Watts, D.J.** (1970) Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. *Biochem. J.* **119**: 175-182.

**Aye M., Dildine S. L., Claypool J. A. et al.** (2001) A truncation mutant of the 95-kilodalton subunit of transcription factor III C reveals asymmetry in Ty3 integration. *Mol. Cell. Biol.* **21(22)**:7839-7851.

**Babu M. M., Iyer L. M., Balaji S. et al.** (2006) The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acids Res.* **34(22)**:6505-6520.

**Bachman N., Gelbart M. E., Tsukiyama T. et al.** (2005) TFIIB subunit Bdp1p is required for periodic integration of the Ty1 retrotransposon and targeting of Isw2p to *S. cerevisiae* tDNAs. *Genes Dev.* **19(8)**:955-964.

**Barlow D. P.** (1993) Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* **260**:309-310.

**Batzer M. A., Deininger P. L.** (2002) Alu repeats and human diversity. *Nat. Rev. Genet.* **3**:370-379.

**Beck P., Dinger T., Winckler T.** (2002) Transfer RNA gene-targeted retrotransposition of *Dictyostelium* TRE5-A into a chromosomal UMP synthase gene trap. *J. Mol. Biol.* **318(2)**:273-285.

**Bellen H. J., Levis R. W., He Y. et al.** (2011) The *Drosophila* gene disruption project: progress using transposons with distinctive site specificities. *Genetics* **188(3)**:731-743.

**Benachou F., Blikstad V., Blomberg J.** (2009) The phylogeny of orthoretroviral long terminal repeats (LTRs). *Gene* **448(2)**:134-8.

**Benachou F., Jern P., Oja M. et al.** (2009) Evolutionary conservation of orthoretroviral long terminal repeats (LTRs) and ab initio detection of single LTRs in genomic data. *PLoS One* **4(4)**:e5179.

**Benachenhou F., Sperber G. O., Bongcam-Rudloff E. et al.** (2013) Conserved structure and inferred evolutionary history of long terminal repeats (LTRs). *Mob. DNA*. **4(1)**:5.

**Betapudi V., Shoebbotham K., Egelhoff T. T.** (2004) Generation of double gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single antibiotic marker selection. *Biotechniques* **36(1)**:106-112.

**Bienz M.** (2005) The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.* **31(1)**:35-40.

**Bilzer A.** (2011) Dissertation „Funktion des Transkriptionsfaktors CbfA in *Dictyostelium discoideum*.“, Jena

**Bilzer A., Dölz H., Reinhardt A. et al.** (2011) The C-module-binding factor supports amplification of TRE5-A retrotransposons in the *Dictyostelium discoideum* genome. *Eukaryot. Cell* **10(1)**:81-6.

**Blatch G. L., Lässle M.** (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21(11)**:932-939.

**Boeke J. D., Eichinger D., Castrillon D. et al.** (1988) The *Saccharomyces cerevisiae* genome contains functional and nonfunctional copies of transposon Ty1. *Mol. Cell. Biol.* **8(4)**:1432-1442.

**Boeke J. D., Chapman K. B.** (1991) Retrotransposition mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **3(3)**:502-507. Review.

**Boeke J. D., Stoye J. P.** (1997) Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In: Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1997.

**Boeke J. D., Devine S. E.** (1998) Yeast retrotransposons: finding a nice quiet neighborhood. *Cell* **93(7)**:1087-1089. Review.

**Bolton E. C., Boeke J. D.** (2003) Transcriptional interactions between yeast tRNA genes, flanking genes and Ty elements: a genomic point of view. *Genome Res.* **13(2)**:254-263.

**Bonner J. T., Slifkin M. K.** (1949) A study of the control of differentiation: the proportions of stalk and spore cells in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Am. J. Bot.* **36**:727-734.

**Bonner J. T., Clarke W. W., Neely Jr C. L. et al.** (1950) The orientation to light and the extremely sensitive orientation to temperature gradients in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **36**:149-158.

**Bonner J. T.** (1952) Morphogenesis. *Princeton University Press*, Princeton

**Bonner J. T., Shaw M. J.** (1957) The role of humidity in the differentiation of the cellular slime mold molds. *J. Cell Comp. Physiol.* **50**:145-154.

**Bozzaro S., Ponte E.** (1995) Cell adhesion in the life cycle of *Dictyostelium*. *Experientia*. **51(12)**:1175–1188.

**Brayer K. J., Segal D. J.** (2008) Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell. Biochem. Biophys.* **50(3)**:111-131. Review.

- Brefeld J. O.** (1870[1869]) *Dictyostelium mucoroides*, ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* **7**: 85-107.
- Brefeld O.** (1884) *Polysphondylium violaceum* und *Dictyostelium mucoroides* nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. *Pt. 6*: 1-34.
- Bridier-Nahmias A., Lesage P.** (2012) Two large-scale analyses of Ty1 LTR-retrotransposon de novo insertion events indicate that Ty1 targets nucleosomal DNA near the H2A/H2B interface. *Mob. DNA*. **3(1)**:22.
- Brock D. A., Douglas T. E., Queller D. C. et al.** (2011) Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature* **469**:393–396.
- Brown R. S.** (2005) Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15(1)**:94-98. Review.
- Bukenberger M., Marschalek R., Salzburger W. et al.** (1991) Nuclear factors which bind to *Dictyostelium discoideum* transfer RNA genes. *Curr. Genet.* **20(1-2)**:129-135.
- Bukenberger M., Dingermann T., Meissner W. et al.** (1994) Isolation of transcription factor IIIC from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **220(3)**:839-846.
- Burdine V., Clarke M.** (1995) Genetic and physiologic modulation of the prestarvation response in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell.* **6(3)**:311-325.
- Bushman F. D.** (2003) Targeting survival: Integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell* **115**:135-138.
- Calvo-Garrido J., Carilla-Latorre S., Kubohara Y. et al.** (2010) Autophagy in *Dictyostelium*: genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy* **6(6)**:686-701. Review.
- Cappello J., Handelsman K., Lodish H. F.** (1985) Sequence of *Dictyostelium* DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell* **43(1)**:105-115.
- Capy P.** (2005) Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenet Genome Res.* **110(1-4)**:457-461. Review.
- Casacuberta J. M., Santiago N.** (2003) Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene* **311**:1-11.
- Caterina M. J., Milne J. L., Devreotes P. N.** (1994) Mutation of the third intracellular loop of the cAMP receptor, cAR1, of *Dictyostelium* yields mutants impaired in multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **269(2)**:1523-1532.
- Chalker D. L., Sandmeyer S. B.** (1990) Transfer RNA genes are genomic targets for de Novo transposition of the yeast retrotransposon Ty3. *Genetics* **126(4)**:837-850.

**Chalker D. L., Sandmeyer S. B.** (1992) Ty3 integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation. *Genes Dev.* **6(1)**:117-128.

**Chapman K. B., Byström A. S., Boeke J. D.** (1992) Initiator methionine tRNA is essential for Ty1 transposition in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89(8)**:3236-3240.

**Chen H. R., Barker W. C.** (1984) Nucleotide sequences of the retroviral long terminal repeats and their adjacent regions. *Nucleic Acids Res.* **12(4)**:1767-1778.

**Chou P. Y., Fasman G. D.** (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Ann. Rev. Biochem.* **47**:251-276.

**Chu H. Y., Hopper A. K.** (2013) Genome-wide investigation of the role of the tRNA nuclear-cytoplasmic trafficking pathway in regulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome and proteome. *Mol. Cell. Biol.* **33(21)**:4241-4254.

**Chung T.** (2007) Dissertation „Interaktionsanalysen zur spezifischen Integration des Retrotransposons TRE5-A.1 in *Dictyostelium discoideum*.“, Frankfurt am Main

**Chung T., Siol O., Dingermann T. et al.** (2007) Protein interactions involved in tRNA gene-specific integration of *Dictyostelium discoideum* non-long terminal repeat retrotransposon TRE5-A. *Mol. Cell. Biol.* **27(24)**:8492-8501.

**Clark R. L., Steck T. L.** (1979) Morphogenesis in dictyostelium: an orbital hypothesis. *Science* **204(4398)**:1163-1168.

**Clarke M., Gomer R. H.** (1995) PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium*. *Experientia* **51(12)**:1124-1134.

**Clissold P. M., Ponting C. P.** (2001) JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem. Sci.* **26(1)**:7-9.

**Coates J. C., Harwood A. J.** (2001) Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. *J. Cell. Sci.* **114(24)**:4349-4358.

**Conesa C., Swanson R. N., Schultz P. et al.** (1993) On the subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation of the yeast transcription factor TFIIC/tau. *J. Biol. Chem.* **268(24)**:18047-18052.

**Cotter D. A., Sands T. W., Viridy K. J. et al.** (1992) Patterning of development in *Dictyostelium discoideum*: factors regulating growth, differentiation, spore dormancy, and germination. *Biochem. Cell. Biol.* **70(10-11)**:892-919.

**Cox E. C., Vocke C. D., Walter S. et al.** (1990) Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:8247-8251.

**Craig N. L., Craigie R., Gellert M. et al.** (2002). Mobile DNA II. Washington (DC): *American Society for Microbiology Press*.

**Davies D. R.** (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**:189-215. Review.

- de la Chaux N., Wagner A.** (2011) BEL/Pao retrotransposons in metazoan genomes. *BMC Evol. Biol.* **11**:154.
- Deery W. J., Gomer R. H.** (1999) A putative receptor mediating cell-density sensing in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* **274(48)**:34476-34482.
- Devine S.E., Boeke J.D.** (1996) Regionally specific, targeted integration of the yeast retrotransposon Ty1 upstream of genes transcribed by RNA polymerase III. *Genes & Dev.* **10**:620–633.
- Dormann D., Weijer C. J.** (2001) Propagating chemoattractant waves coordinate periodic cell movement in *Dictyostelium* slugs. *Development* **128(22)**:4535-4543.
- Doucet A. J., Hulme A. E., Sahinovic E. et al.** (2010) Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS Genet.* **6(10)**: e1001150.
- Dumay-Odelot H., Marck C., Durrieu-Gaillard S. et al.** (2007) Identification, molecular cloning, and characterization of the sixth subunit of human transcription factor TFIIIC. *J. Biol. Chem.* **282(23)**:17179-17189.
- Early A. E., Gaskell M. J., Traynor D. et al.** (1993) Two distinct populations of prestalk cells within the tip of the migratory *Dictyostelium* slug with differing fates at culmination. *Development* **118**:353-362.
- Egelhoff T. T., Brown S. S., Manstein D. J. et al.** (1989) Hygromycin resistance as a selectable marker in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* **9(5)**:1965-1968.
- Eichinger L., Pachebat J. A., Glöckner G. et al.** (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435(7038)**:43-57.
- Eickbush T.H.** (1994) Origin and evolutionary relationship of retroelements. *Evolutionary Biology of Viruses* (S.S. Morse ed.), *Raven Press Ltd.* 121-157.
- Eickbush T. H., Malik H. S.** (2002) Origins and evolution of retrotransposons. *Mobile DNA II* (Craig N. L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A. M., eds.): *ASM Press*. Washington (DC):1111–1144.
- Escalante R., Vicente J. J.** (2000) *Dictyostelium discoideum*: a model system for differentiation and patterning. *Int J Dev Biol.* **44(8)**:819-835. Review.
- Fedoroff N. V.** (1989) About maize transposable elements and development. *Cell* **56(2)**:181-191. Review.
- Feschotte C., Pritham E. J.** (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.* **41**:331-368. Review.
- Fields S., Song O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340(6230)**:245-246.
- Freeze H., Loomis W. F.** (1977) Isolation and characterization of a component of the surface sheath of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **252(3)**:820-824.

- Friant S., Heyman T., Byström A. S. et al.** (1998) Interactions between Ty1 retrotransposon RNA and the T and D regions of the tRNA(iMet) primer are required for initiation of reverse transcription in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **18(2)**:799-806.
- Gamsjaeger R., Liew C. K., Loughlin F. E. et al.** (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem. Sci.* **32(2)**:63-70. Review.
- Gaudet P., Pilcher K. E., Fey P. et al.** (2007) Transformation of *Dictyostelium discoideum* with plasmid DNA. *Nat. Protoc.* **2(6)**:1317-1324.
- Geiduschek E. P., Tocchini-Valentini G. P.** (1988) Transcription by RNA polymerase III. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:873-914. Review.
- Geiduschek E. P., Kassavetis G. A.** (2001) The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol.* **310(1)**:1-26. Review.
- Geier A., Horn J., Dingermann T. et al.** (1996) A nuclear protein factor binds specifically to the 3'-regulatory module of the long-interspersed-nuclear-element-like *Dictyostelium* repetitive element. *Eur. J. Biochem.* **241(1)**:70-76.
- George J. A., Traverse K. L., DeBaryshe P. G. et al.** (2010) Evolution of diverse mechanisms for protecting chromosome ends by Drosophila TART telomere retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107(49)**:21052-21057.
- Gietz R. D., Woods R. A.** (2001) Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30(4)**:816-820, 822-826, 828 passim. Review.
- Gilbert N., Lutz-Prigge S., Moran J. V.** (2002) Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell* **110(3)**:315-325.
- Gilbert N., Lutz S., Morrish T. A. et al.** (2005) Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**:7780-7795.
- Gladyshev E. A., Arkhipova I. R.** (2011) A widespread class of reverse transcriptase-related cellular genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108(51)**:20311-20316.
- Glöckner G., Szafranski K., Winckler T. et al.** (2001) The complex repeats of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Res.* **11(4)**:585-594.
- Glöckner G., Eichinger L., Szafranski K. et al.** (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **418(6893)**:79-85.
- Glöckner G., Heidel A. J.** (2009) Centromere sequence and dynamics in *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **37(6)**:1809-1816.
- Goodwin T. J., Poulter R. T.** (2001) The DIRS1 group of retrotransposons. *Mol. Biol. Evol.* **18(11)**:2067-2082.
- Gritz L., Davies J.** (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25(2-3)**:179-188.

- Haag A. L., Lin J. H., Levin H. L.** (2000) Evidence for the packaging of multiple copies of Tf1 mRNA into particles and the trans priming of reverse transcription. *J. Virol.* **74(15)**:7164-7170.
- Hagiwara H.** (1989) The taxonomic study of Japanese dictyostelid cellular slime molds. *Tokyo: National Science Museum.* 131 p.
- Han J. S.** (2010) Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions. *Mob. DNA* **1(1)**:15.
- Havecker E. R., Gao X., Voytas D. F.** (2004) The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol.* **5(6)**:225.
- Hernandez N.** (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* **7**:1291-1308.
- Hofmann J., Schumann G., Borschet G. et al.** (1991) Transfer RNA genes from Dictyostelium discoideum are frequently associated with repetitive elements and contain consensus boxes in their 5' and 3'-flanking regions. *J. Mol. Biol.* **222(3)**:537-552.
- Hohjoh H., Singer M. F.** (1997) Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. *EMBO J.* **16(19)**:6034-6043.
- Horn J., Dietz-Schmidt A. et al.** (1999) A Dictyostelium protein binds to distinct oligo(dA) x oligo(dT) DNA sequences in the C-module of the retrotransposable element DRE. *Eur. J. Biochem.* **265(1)**:441-448.
- Ikeda R., Kokubu C., Yusa K. et al.** (2007) Sleeping beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol. Cell. Biol.* **27(5)**:1665-1676.
- Ishiguro A., Kassavetis G. A., Geiduschek E. P.** (2002) Essential Roles of Bdp1, a Subunit of RNA Polymerase III Initiation Factor TFIIIB, in Transcription and tRNA Processing. *Mol. Cell. Biol.* **22(10)**:3264-3275
- Jermyn K. A., Williams J. G.** (1991) An analysis of culmination in Dictyostelium using prestalk and stalk-specific cell autonomous markers. *Development* **111**:779-787.
- Jermyn K. A., Traynor D., Williams, J. G.** (1996) The initiation of basal disc formation in Dictyostelium discoideum is an early event in culmination. *Development* **122**:753-760.
- Johnson M. S., McClure M. A., Feng D. F. et al.** (1986) Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83(20)**:7648-7652.
- Jourdain S., Acker J., Ducrot C. et al.** (2003) The tau95 subunit of yeast TFIIIC influences upstream and downstream functions of TFIIIC.DNA complexes. *J. Biol. Chem.* **278(12)**:10450-10457.
- Juo Z. S., Kassavetis G. A., Wang J. et al.** (2003) Crystal structure of a transcription factor IIIB core interface ternary complex. *Nature* **422(6931)**:534-539.
- Kajikawa M., Okada N.** (2002) LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell* **111(3)**:433-444.

- Kano H., Godoy I., Courtney C. et al.** (2009) L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes Dev.* **23**:1303-1312.
- Kapitonov V. V., Jurka J.** (2001) Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98(15)**:8714-8719.
- Kassavetis G. A., Braun B. R., Nguyen L. H. et al.** (1990) *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. *Cell* **60(2)**:235-245.
- Kassavetis G. A., Joazeiro C. A., Pisano M. et al.** (1992) The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIB. *Cell* **71(6)**:1055-1064.
- Kassavetis G. A., Soragni E., Driscoll R. et al.** (2005) Reconfiguring the connectivity of a multiprotein complex: fusions of yeast TATA-binding protein with Brf1, and the function of transcription factor IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102(43)**:15406-15411.
- Kassavetis G. A., Geiduschek E. P.** (2006) Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochem. Soc. Trans.* **34(6)**:1082-1087.
- Kay R. R., Williams J. G.** (1999) The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet.* **15(8)**:294-297.
- Kazazian H. H. Jr, Wong C., Youssoufian H. et al.** (1988) Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* **332(6160)**:164-166.
- Kazazian H. H. Jr.** (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303(5664)**:1626-1632. Review.
- Kenna M. A., Brachmann C. B., Devine S. E. et al.** (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.** (2001) *Dictyostelium*: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity. Cambridge University Press.
- Kessin R. H.** (2003) Cell motility: Making streams. *Nature* **422(6931)**:481-492.
- Khan E., Mack J. P., Katz R. A. et al.** (1991) Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res.* **19(4)**:851-860.
- Kidwell M. G., Lisch D. R.** (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* **55(1)**:1-24.
- Kim J. M., Vanguri S., Boeke J. D. et al.** (1998) Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.* **8(5)**:464-478.

- Knecht D. A., Cohen S. M., Loomis W. F. et al.** (1986) Developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol. Cell. Biol.* **6(11)**:3973-83.
- Kolosha V. O., Martin S. L.** (2003) High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *J. Biol. Chem.* **278(10)**:8112-8117.
- Kopera H. C., Moldovan J. B., Morrish T. A. et al.** (2011) Similarities between long interspersed element-1 (LINE-1) reverse transcriptase and telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108(51)**:20345-20350.
- Krishna S. S., Majumdar I., Grishin N. V.** (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res.* **31(2)**:532-550.
- Kubo S., Seleme M. C., Soifer H. S. et al.** (2006) L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103(21)**:8036-8041.
- Kucho K., Kakoi K., Yamaura M. et al.** (2013) Codon-optimized antibiotic resistance gene improves efficiency of transient transformation in *Frankia*. *Journal of Biosciences* **38(4)**:713-717.
- Kuduvalli P. N., Rao J. E., Craig N. L.** (2001) Target DNA structure plays a critical role in Tn7 transposition. *EMBO J.* **20(4)**:924-932.
- Kuhlmann M., Borisova B. E., Kaller M. et al.** (2005) Silencing of retrotransposons in *Dictyostelium* by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res.* **33(19)**:6405-6417.
- Kulpa D. A., Moran J. V.** (2005) Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Hum. Mol. Genet.* **14(21)**:3237-3248.
- Kulpa D. A., Moran J. V.** (2006) Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13(7)**:655-660.
- Kuspa A., Maghakian D., Bergesch P. et al.** (1992) Physical mapping of genes to specific chromosomes in *Dictyostelium discoideum*. *Genomics* **13(1)**:49-61.
- 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., Linton L. M., Birren B. et al.** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409(6822)**:860-921.
- Leng P., Klatte D. H., Schumann G. et al.** (1998) Skipper, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Res.* **26(8)**:2008-2015.
- Lerat E., Capy P.** (1999) Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. *Mol. Biol. Evol.* **16(9)**:1198-1207.
- Lerman D. N., Feder M. E.** (2005) Naturally occurring transposable elements disrupt hsp70 promoter function in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* **22(3)**:776-783.

**Lesage P., Todeschini A. L.** (2005) Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts. *Cytogenet. Genome Res.* **110(1-4)**:70-90. Review.

**Levin H. L., Moran J. V.** (2011) Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat. Rev. Genet.* **12(9)**:615-627. Review.

**Liao Y., Moir R. D., Willis I. M.** (2006) Interactions of Brf1 peptides with the tetratricopeptide repeat-containing subunit of TFIIC inhibit and promote preinitiation complex assembly. *Mol. Cell. Biol.* **26(16)**:5946-5956.

**Loomis W. F. Jr.** (1971) Sensitivity of *Dictyostelium discoideum* to nucleic acid analogues. *Exp. Cell. Res.* **64(2)**:484-486.

**Loomis W. F., Welker D., Hughes J. et al.** (1995) Integrated maps of the chromosomes in *Dictyostelium discoideum*. *Genetics* **141(1)**:147-157.

**Loomis W. F., Kuspa A.** (1997) The genome of *Dictyostelium discoideum*. In: Maeda Y., Inouye K., Takeuchi I., editors. *Dictyostelium—A model system for cell and developmental biology*. Tokyo: Universal Academy Press 15–30.

**Luan D. D., Korman M. H., Jakubczak J. L. et al.** (1993) Reverse transcription of R2Bm is primed by a nick at the chromosomal target site—a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* **72**:595–605.

**Lucas J., Bilzer A., Moll L. et al.** (2009) The carboxy-terminal domain of Dictyostelium C-module-binding factor is an independent gene regulatory entity. *PLoS One.* **4(4)**:e5012.

**Malik H. S.** (2005) Ribonuclease H evolution in retrotransposable elements. *Cytogenet. Genome Res.* **110(1-4)**:392-401. Review.

**Malik H. S., Burke W. D., Eickbush T. H.** (1999) The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol. Biol. Evol.* **16**:793-805.

**Malik H. S., Eickbush T. H.** (1999) Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR retrotransposons. *J. Virol.* **73(6)**:5186-5190.

**Malik H. S., Henikoff S., Eickbush T. H.** (2000) Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res.* **10(9)**:1307-1318.

**Malik H. S., Eickbush T. H.** (2001) Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res.* **11(7)**:1187-1197.

**Mandal P. K., Ewing A. D., Hancks D. C. et al.** (2013) Enrichment of processed pseudogene transcripts in L1-ribonucleoprotein particles. *Hum. Mol. Genet.* **22(18)**:3730-3748.

**Marck C., Lefebvre O., Carles C. et al.** (1993) The TFIIB-assembling subunit of yeast transcription factor TFIIC has both tetratricopeptide repeats and basic helix-loop-helix motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90(9)**:4027-4031.

- Marquet R., Isel C., Ehresmann C. et al.** (1995) tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie*. **77(1-2)**:113-124.
- Marschalek R., Brechner T., Amon-Böhm E. et al.** (1989) Transfer RNA genes: landmarks for integration of mobile genetic elements in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **244(4911)**:1493-1496.
- Marschalek R., Hofmann J., Schumann G. et al.** (1992) Two distinct subforms of the retrotransposable DRE element in NC4 strains of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **20(23)**:6247-6252.
- Martianov I., Viville S., Davidson I.** (2002) RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein. *Science*. **298(5595)**:1036-1039.
- Martin S. L., Bushman F. D.** (2001) Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. *Mol. Cell. Biol.* **21(2)**:467-475.
- Matsuda E., Garfinkel D. J.** (2009) Posttranslational interference of Ty1 retrotransposition by antisense RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106(37)**:15657-15662.
- McClintock B.** (1948) Mutable loci in maize: Nature of the Aaction. The mutable cloci. The mutable wxloci. Conclusions. *Carnegie Institution of Washington Year Book No.* **47**:155–169.
- Merkulov G. V., Lawler J. F. Jr, Eby Y. et al.** (2001) Ty1 proteolytic cleavage sites are required for transposition: all sites are not created equal. *J. Virol.* **75(2)**:638-644.
- Methot N., Pickett G., Keene J. D. et al.** (1996) In vitro RNA selection identifies RNA ligands that specifically bind to eukaryotic translation initiation factor 4B: the role of the RNA remotif. *RNA* **2(1)**:38-50.
- Mularoni L., Zhou Y., Bowen T. et al.** (2012) Retrotransposon Ty1 integration targets specifically positioned asymmetric nucleosomal DNA segments in tRNA hotspots. *Genome Res.* **22(4)**:693-703.
- Muñoz-López M., García-Pérez J. L.** (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr. Genomics* **11(2)**:115-128.
- Mylona A., Fernández-Tornero C., Legrand P. et al.** (2006) Structure of the tau60/Delta tau91 subcomplex of yeast transcription factor IIIC: insights into preinitiation complex assembly. *Mol. Cell* **24(2)**:221-232.
- Nagarajavel V., Iben J. R., Howard B. H. et al.** (2013) Global 'bootprinting' reveals the elastic architecture of the yeast TFIIB-TFIIC transcription complex in vivo. *Nucleic Acids Res.* **41(17)**:8135-8143.
- Narayanan N., Gorelick R. J., DeStefano J. J.** (2006) Structure/function mapping of amino acids in the N-terminal zinc finger of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein: residues responsible for nucleic acid helix destabilizing activity. *Biochemistry* **45(41)**:12617-12628.
- Neuvéglise C., Feldmann H., Bon E. et al.** (2002) Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. *Genome Res.* **12(6)**:930-943.

**Nomura Y., Kajikawa M., Baba S. et al.** (2006) Solution structure and functional importance of a conserved RNA hairpin of eel LINE UnaL2. *Nucleic Acids Res.* **34(18)**:5184-5193.

**Nymark-McMahon M. H., Beliakova-Bethell N. S., Darlix J. L. et al.** (2002) Ty3 integrase is required for initiation of reverse transcription. *J. Virol.* **76(6)**:2804-2816.

**Ohshima K.** (2013) RNA-Mediated Gene Duplication and Retroposons: Retrogenes, LINEs, SINEs, and Sequence Specificity. *Int. J. Evol. Biol.* **2013**:424726.

**Oliver S. G, van der Aart Q. J. M., Agostoni-Carbone M. L. et al.** (1992) The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* **357**:38-46.

**Ostertag E. M., Kazazian H. H. Jr.** (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**:501-538. Review.

**Parent C. A., Devreotes P. N.** (1996) Molecular genetics of signal transduction in *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:411-440. Review.

**Pavlicek A., Jurka J.** (2006) Ancient Transposable Elements, Processed Pseudogenes, and Endogenous Retroviruses. *Genomic Disorders* **2006**, 57-72.

**Pfaffl M. W.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29(9)**:e45.

**Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L. et al.** (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92(9)**:3804-3808.

**Plasterk R. H., Izsvák Z., Ivics Z.** (1999) Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* **15(8)**:326-332. Review.

**Potts G.** (1902) Zur Physiologie des *Dictyostelium mucoroides*. *Flora* **91**:281-347.

**Poulter R. T., Goodwin T. J.** (2005) DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet Genome Res.* **110(1-4)**:575-588. Review.

**Pritham E. J., Putliwala T., Feschotte C.** (2007) Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* **390(1-2)**:3-17.

**Qi X., Sandmeyer S.** (2012) In vitro targeting of strand transfer by the Ty3 retroelement integrase. *J. Biol. Chem.* **287(22)**:18589-18595.

**Qi X., Daily K., Nguyen K. et al.** (2012) Retrotransposon profiling of RNA polymerase III initiation sites. *Genome Res.* **22(4)**:681-692.

**Raper K.B.** (1935) *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res. (Wash.)* **50**:135-147.

**Raper K. B.** (1940). Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* **56**: 241-282.

- Raper K. B., Fennell D. I.** (1952) Stalk formation in Dictyostelium. *Bull. Torrey Bot. Club* **79**:25-51.
- Raper K. B.** (1984) The Dictyostelids. *Princeton University Press*. Princeton, New Jersey.
- Reeves R.** (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* **277(1-2)**:63-81. Review.
- Reeves R., Beckerbauer L.** (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1519(1-2)**:13-29.
- Ribet D., Dewannieux M., Heidmann T.** (2004) An active murine transposon family pair: retrotransposition of "master" MusD copies and ETn trans-mobilization. *Genome Res.* **14(11)**:2261-2267.
- Robert J. W.** (2011) Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics* **12**:459-463.
- Romeralo M., Escalante R., Sastre L. et al.** (2007) Molecular systematics of dictyostelids: 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer region analyses. *Eukaryot Cell* **6(1)**:110-116.
- Romeralo M., Escalante R., Baldauf S. L.** (2012) Evolution and diversity of dictyostelid social amoebae. *Protist* **163(3)**:327-343. Review.
- Ruschak A. M., Mathews D. H., Bibillo A. et al.** (2004) Secondary structure models of the 3' untranslated regions of diverse R2 RNAs. *RNA* **10(6)**:978-987.
- Sanchez R., Zhou M. M.** (2011) The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends Biochem. Sci.* **36(7)**:364-372.
- Sandmeyer S. B., Hansen L. J., Chalker D. L.** (1990) Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. *Annu. Rev. Genet.* **24**:491-518. Review.
- Sandmeyer, S., Aye, M., Menees, T. (2002)** Ty3: A Position-Specific, Gypsylike Element in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mobile DNA*. ASM Press, Washington DC.
- Sandmeyer S. B., Clemens K. A.** (2010) Function of a retrotransposon nucleocapsid protein. *RNA Biol.* **7(6)**:642-654.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.-K. et al.** (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**: 765-768.
- Schaap P., Winckler T., Nelson M. et al.** (2006) Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science* **314(5799)**:661-663.
- Schaap P.** (2011) Evolution of developmental cyclic adenosine monophosphate signaling in the Dictyostelia from an amoebozoan stress response. *Dev. Growth Differ.* **53(4)**:452-462. Review.
- Schaap P.** (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Development* **138(3)**:387-396.
- Schilde C., Schaap P.** (2013) The Amoebozoa. *Methods Mol. Biol.* **983**:1–15.

- Schmith A., Groth M., Ratka J. et al.** (2013) Conserved gene regulatory function of the carboxy-terminal domain of dictyostelid C-module-binding factor. *Eukaryot. Cell.* **12(3)**:460-468.
- Schneider A. M., Schmidt S., Jonas S. et al.** (2013) Structure and properties of the esterase from non-LTR retrotransposons suggest a role for lipids in retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **41(22)**:10563-10572.
- Schramm L., Hernandez N.** (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* **16(20)**:2593-2620.
- Schumann G., Zündorf I., Hofmann J. et al.** (1994) Internally located and oppositely oriented polymerase II promoters direct convergent transcription of a LINE-like retroelement, the Dictyostelium repetitive element, from Dictyostelium discoideum. *Mol. Cell. Biol.* **14(5)**:3074-3084.
- Schumann G., Zündorf I., Schmidt A. et al.** (1994) Characterization of transcripts from the Dictyostelium discoideum retrotransposable genetic element DRE. *Pharmazie* **49(12)**:923-925.
- Schumann G. G.** (2007) APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem. Soc. Trans.* **35(3)**:637-642.
- Seckler J. M., Barkley M. D., Wintrode P. L.** (2011) Allosteric Suppression of HIV-1 Reverse Transcriptase Structural Dynamics upon Inhibitor Binding. *Biophys. J.* **100(1)**:144–153.
- Sijen T., Plasterk R. H.** (2003) Transposon silencing in the Caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi. *Nature* **426(6964)**:310-314.
- Simões I., Faro R., Bur D. et al.** (2011) Shewasin A, an active pepsin homolog from the bacterium Shewanella amazonensis. *FEBS J.* **278(17)**:3177-3186.
- Siol O., Boutliliss M., Chung T. et al.** (2006) Role of RNA polymerase III transcription factors in the selection of integration sites by the dictyostelium non-long terminal repeat retrotransposon TRE5-A. *Mol. Cell. Biol.* **26(22)**:8242-8251.
- Siol O., Spaller T., Schiefner J. et al.** (2011) Genetically tagged TRE5-A retrotransposons reveal high amplification rates and authentic target site preference in the Dictyostelium discoideum genome. *Nucleic Acids Res.* **39(15)**:6608-6619.
- Stephenson S. L., Landolt J. C.** (1992) Vertebrates as vectors of cellular slime moulds in temperate forests. *Mycological Research* **96(8)**:670–672.
- Sussman R., Sussman M.** (1967) Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29(1)**:53-55.
- Suthers H. B.** (1985) Ground-feeding migratory songbirds as cellular slime mold distribution vectors. *Oecologia* **65**:526–530.
- Swanson A. R., Vadell E. M. and Cavender J. C.** (1999) Global distribution of forest soil dictyostelids. *J. Biogeogr.* **26**:133-148.
- Swanson A. R., Spiegel F. W., Cavender J. C.** (2002) Taxonomy, slime molds, and the questions we ask. *Mycologia* **94(6)**:968-979.

- Swergold G.** (1990) Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **10**:6718–6729.
- Szafranski K., Glöckner G., Dinger T. et al.** (1999) Non-LTR retrotransposons with unique integration preferences downstream of Dictyostelium discoideum tRNA genes. *Mol. Gen. Genet.* **262(4-5)**:772-780.
- Szafranski, K.** (2002) Dissertation „Die Transposons im Genom von *Dictyostelium discoideum*“, Jena
- Szak S. T., Pickeral O. K., Makalowski W. et al.** (2002) Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biol.* **3(10)**:research0052.
- Takeuchi T., Yamazaki Y., Katoh-Fukui Y. et al.** (1995) Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev.* **9(10)**:1211-1222.
- Thomason P. A., Brazill D. T., Cox E. C.** (2006) A series of Dictyostelium expression vectors for recombination cloning. *Plasmid* **56(3)**:145-152.
- Tieghem P. H. van** (1880) Sur quelques Myxomycetes a plasmode agrege. *Bull. Soc. Bot.* **27**:317-322.
- Tresse E., Kosta A., Luciani M. F. et al.** (2007) From autophagic to necrotic cell death in Dictyostelium. *Semin. Cancer Biol.* **17(2)**:94-100. Review.
- Trewick S. C., McLaughlin P. J., Allshire R. C.** (2005) Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep.* **6**:315–320.
- Tronnorsjö S., Hanefalk C., Balciunas D. et al.** (2007) The jmjN and jmjC domains of the yeast zinc finger protein Gis1 interact with 19 proteins involved in transcription, sumoylation and DNA repair. *Mol. Genet. Genomics* **277(1)**:57-70.
- Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H. et al.** (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439(7078)**:811-816.
- Tutar Y.** (2012) Pseudogenes. *Comp. Funct. Genomics.* **2012**:424526.
- Vannini A.** (2013) A structural perspective on RNA polymerase I and RNA polymerase III transcription machineries. *Biochim. Biophys. Acta.* **1829(3-4)**:258-264. Review.
- Vitte C., Panaud O.** (2005) LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenet Genome Res.* **110(1-4)**:91-107.
- Waterston R. H., Lindblad-Toh K., Bimney E. et al.** (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**:520–562.
- Watts D. J., Ashworth J. M.** (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119(2)**:171-174.

**Weber K., Mock U., Petrowitz B. et al.** (2010) Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Therapy* **17**:511-520.

**Wei W., Gilbert N., Ooi S. L. et al.** (2001) Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol. Cell. Biol.* **21**(4):1429-1439.

**West C. M.** (2003) Comparative analysis of spore coat formation, structure, and function in Dictyostelium. *Int. Rev. Cytol.* **222**:237-293. Review.

**White R. J.** (2011) Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat. Rev. Genet.* **12**(7):459-463. Review.

**Wiegand S., Meier D., Seehafer C. et al.** (2013) 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.* doi: 10.1093/nar/gkt1337.

**Wilhelm M., Wilhelm F. X.** (2001) Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:1246–1262.

**Wilson M. H., Coates C. J., George A. L. Jr.** (2007) PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol. Ther.* **15**(1):139-145.

**Winckler T.** (1998) Retrotransposable elements in the Dictyostelium discoideum genome. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**(5):383-393. Review.

**Winckler T., Trautwein C., Tschepke C et al.** (2001) Gene function analysis by amber stop codon suppression: CMBF is a nuclear protein that supports growth and development of Dictyostelium amoebae. *J. Mol. Biol.* **305**(4):703-714.

**Winckler T., Dingermann T., Glöckner G.** (2002) Dictyostelium mobile elements: strategies to amplify in a compact genome. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**(12):2097-2111. Review.

**Winckler T., Iranfar N., Beck P. et al.** (2004) CbfA, the C-module DNA-binding factor, plays an essential role in the initiation of Dictyostelium discoideum development. *Eukaryot. Cell* **3**(5):1349-1358.

**Winckler T., Szafranski K., Glöckner G.** (2005) Transfer RNA gene-targeted integration: an adaptation of retrotransposable elements to survive in the compact Dictyostelium discoideum genome. *Cytogenet. Genome Res.* **110**(1-4):288-298. Review.

**Winckler T., Schiefner J., Spaller T. et al.** (2011) Dictyostelium transfer RNA gene-targeting retrotransposons: Studying mobile element-host interactions in a compact genome. *Mob. Genet. Elements* **1**(2):145-150.

**Wolfe S. A., Nekludova L., Pabo C. O.** (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**:183-212. Review.

**Wolkow C. A., DeBoy R. T., Craig N. L.** (1996) Conjugating plasmids are preferred targets for Tn7. *Genes Dev.* **10**(17):2145-2157.

- Wootton J. C., Federhen S.** (1996) Analysis of compositionally biased regions in sequence databases. *Methods Enzymol.* **266**:554-571.
- Xie W., Gai X., Zhu Y. et al.** (2001) Targeting of the yeast Ty5 retrotransposon to silent chromatin is mediated by interactions between integrase and Sir4p. *Mol. Cell. Biol.* **21(19)**:6606-6614.
- Yang J., Malik H. S., Eickbush T. H.** (1999) Identification of the endonuclease domain encoded by R2 and other site-specific, non-long terminal repeat retrotransposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96(14)**:7847-7852.
- Yant S. R., Wu X., Huang Y. et al.** (2005) High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol. Cell. Biol.* **25(6)**:2085-2094.
- Yatherajam G., Gayatri, Zhang L. et al.** (2003) Protein–protein interaction map for yeast TFIIID. *Nucl. Acids Res.* **31 (4)**:1252-1260.
- Yieh L., Kassavetis G., Geiduschek E. P. et al.** (2000) The Brf and TATA-binding protein subunits of the RNA polymerase III transcription factor IIIB mediate position-specific integration of the gypsy-like element, Ty3. *J. Biol. Chem.* **275(38)**:29800-29807.
- Yieh L., Hatzis H., Kassavetis G. et al.** (2002) Mutational analysis of the transcription factor IIIB-DNA target of Ty3 retroelement integration. *J. Biol. Chem.* **277(29)**:25920-25928.
- Zuker C., Cappello J., Chisholm R. L. et al.** (1983) A repetitive Dictyostelium gene family that is induced during differentiation and by heat shock. *Cell* **34(3)**:997-1005.



## 8. Anhang

### 8.1. Aufstellung der verwendeten Oligonukleotide

Restriktionsschnittstellen, welche durch die Oligonukleotide in das PCR-Produkt eingefügt wurden, sind unterstrichen und Basen, welche durch Einzelstrangmutagenese ausgetauscht wurden, sind fett und vergrößert dargestellt.

**Tabelle 8.1. Verwendete Oligonukleotide.**

Oligonukleotid	Sequenz	Gen
BSR 3`Seq	GTGTAGGGAGTTGATTTCAGACTATGCACC	<i>mbsrl</i>
bsr-01	CTGCCGAAATGATTTCTCC	<i>mbsrl</i>
bsr-02	AAAGATCTGGATCAATTTAACATTTCTC	<i>mbsrl</i>
bsr-05	GGAATTCGGCTGCAGGTCGACGGATCCTC	<i>mbsrl</i>
bsr-06	AAAGCTTAAAGCTTTTTATTAATTTCTGGGTATA TTTGAGTGG	<i>mbsrl</i>
DdBdp1-01	GGCCATGGATAAAGAAAAATCAGATAATGAAG	TFIIIB Bdp1
DdBdp1-02	GGGGATCCTAATATTCATAATCATTGTATTATA ATTATC	TFIIIB Bdp1
DdBrf1-C-01	GGCCATGGATTTAGAGGATCAATGTGATCC	TFIIIB Brf1
DdBrf1-C-02	GGGGATCCTAATTACGACTTAATAAACTACCAGA TTG	TFIIIB Brf1
DdBrf1-N-01	GGCCATGGATTCAAAAAATTGTGGAAATTGTGGA AATG	TFIIIB Brf1
DdBrf1-N-02	GGGGATCCTAACCATTGAATTCATCGAATCTAAG GG	TFIIIB Brf1
DdTBP-01	GGCCATGGAAAGCACCGCAACCACTACATCTACA CC	TFIIIB TBP
DdTBP-02	GGGGATCCTATTGAGTAATTGCATTAACCTTTTTTA AAG	TFIIIB TBP
DdTBP-32	GATGGTTGATGATGATGGATGATGAATGG	TFIIIB TBP
DdTFC1 (22-401)-01	CCATGGGTTTCAGCATTAGTATTAGTTGATAATG	Tfc1
DdTFC1 (22-401)-02	GGATCCTATGAAGGTTGATTTGAAGGATAATG	Tfc1
DdTFC1 (420-865) -01	CCATGGAAGATAATAGTAACAAAGAAGATAAAG	Tfc1
DdTFC1 (420-865) -02	GGATCCTATTCACTTTCTTCAAATTCAAAATC	Tfc1
DdTFC4 (219-478)-01	CCATGGTGTTTTATTCAACAAGAGATTAGAATT C	Tfc4
DdTFC4 (2-219)-02	GGATCCTAAAATCTTTTCTTTTCTTTTCTTTGG	Tfc4

DdTFC4 (2-478)-01	<u>CCATGGTGACAACAGAAAAAGTAAAGATTTAAAA</u> G	Tfc4
DdTFC4 (2-478)-02	<u>GGATCCTATGGTAACAATCTTAAGTG</u>	Tfc4
DdTFC4 (446-608)-01	<u>CCATGGCTTTTGATTTGGTTTTCAATGCTTG</u>	Tfc4
DdTFC4 (446-608)-02	<u>CCATGGCTAATAAGCATTTCTTTTGAATTTAACTC</u>	Tfc4
DdTFC4 (628-997)-01	<u>CCATGGGAGGAGCAACCAATACAACATCAAC</u>	Tfc4
DdTFC4 (628-997)-02	<u>GGATCCTACACAACAATATATTTTTTTAAGATTTTC</u>	Tfc4
DGLTA_IN-01	<u>GGCCATGGGTTTAAAAACATACTTTATCAAG</u>	DGLT-A
DGLTA_IN-02	<u>GGGGATCCTATTTTTTCAATCTTTCAATATTGACTAC</u>	DGLT-A
DGLTA_NRD-01	<u>GGCCATGGGTAATAATGAAAACATAATTTTTTCGG</u>	DGLT-A
DGLTA_NRD-02	<u>GGGGATCCTATACTTGATTTTGTGGTGCTTTATAAG</u>	DGLT-A
DGLTA_PR-01	<u>CCCCATGGCACCACAAAATCAAGTAAATTCAATC</u>	DGLT-A
DGLTA_PR-02	<u>GGGGATCCTAATCAATTTTGCAAACAATTGGTTTGG</u>	DGLT-A
DGLTA_RH-01	<u>GGCCATGGGTGTTAATTTCAAATGGACTGATG</u>	DGLT-A
DGLTA_RH-02	<u>CCGGATCCTAATGTTTTAAACCGTGACAAAGAAATC</u>	DGLT-A
DGLTA_RT-01	<u>CCCCATGGAACCAATTGTTTGCAAATTTGATC</u>	DGLT-A
DGLTA_RT-02	<u>CCGGATCCTACAATTCATCAGTCCATTTGAAATTA</u> C	DGLT-A
DGLTA-01	<u>CAATCGAAGTTCGAATTTAGTGAAATTTCTAAAAA</u> G	DGLT-A
DGLTA-02	<u>GGAAATAAACGTAATGGTGCAAAAATATTTTC</u>	DGLT-A
DGLTA-02A	<u>ATTACATATCCCCCTTTTAGTTG</u>	DGLT-A
DGLTA-03	<u>CGCGGCCGCAATGGCACCACAAAATCAAGTAAATT</u> C	DGLT-A
DGLTA-06	<u>CGCGGCCGCTAATGTTTTAAACCGTGACAAAGAA</u> ATCC	DGLT-A
DGLTA-07	<u>GGCGGCCGCAATGGGTTTAAAAACATACTTTATCAA</u> GTAAG	DGLT-A
DGLTA-08	<u>CGCGGCCGCCTTTTAGTTGAAAATTTTTTCAATCT</u> TTCAATATTGAC	DGLT-A
DGLTA-09	<u>GGCGGCCGCAATGAGTAATAATGAAAACATAATTT</u> TTTCG	DGLT-A
DGLTA-10	<u>GGCGGCCGCTATACTTGATTTTGTGGTGCTTTATAA</u> GG	DGLT-A
DGLTA-11	<u>CGCATGCGTGCCAACCTTGATGATTCTTTAAAC</u>	DGLT-A
DGLTA-12	<u>GAGGTTATTATTTACAATTTGGGCG</u>	DGLT-A
DGLTA-13	<u>CGCGGCCGCTTTATAAGGGGATGATTGTGGTGAC</u>	DGLT-A
DGLTA-14	<u>GGCGGCCGCTAATCAATTTTGCAAACAATTGGTTTG</u> G	DGLT-A
DGLTA-15	<u>CGCGGCCGCAATGAAACCAATTGTTTGCAAATTTGA</u> TC	DGLT-A
DGLTA-16	<u>CGCGGCCGCTACAATTCATCAGTCCATTTGAAATTA</u> CACC	DGLT-A

DGLTA-17	<u>GGCGGCCGCAATGGGTGTTAATTTCAAATGGA</u> CTGATG	DGLT-A
DGLTA-18	AAAAAAAAAAAAaGctTAATAATGAAACGTAA TTTTTTCGGG	DGLT-A
DGLTA-19	<u>ACCGTTCGAAAAATTACGTTTTTCATTATTACTC</u>	DGLT-A
DGLTA-21	<u>GCATGCACCGGTGGATCCTAAAAGGGGGGGAT</u> ATGTAATAAAG	DGLT-A
DGLTA-24	ATATTATTCATAATGAGTTGACAG	DGLT-A
DGLTA-25	CCCCTTTTAG GATCCTCTAG	DGLT-A
DGLTA-27	AAAAAATGGTATATCCATATGATGTACCAG <u>ATTATGCA</u> AGTAATAATGAAAACATAATTTTT CGG	DGLT-A
DGLTA-30	CTTTATTACATATCCCCCCTTTTAG	DGLT-A
DGLTA-31	GATTTTGTGGTGCTTTCATGGGGATGATTGTGG TG	DGLT-A
DGLTA-32	CACCACAATCATCCCATGGAAAGCACCACAAAA TC	DGLT-A
DGLTA-35	CCGACCGGTGGAAAGGGTTTATCATTTCGTAAAT TC	DGLT-A
DGLTA-36	GGCACCGGTTTTAGTTGAAAATTTTTTCAATC	DGLT-A
DGLTA-37	ACTCGTAGACACAGGAAGTAG	DGLT-A mod
DGLTA-38	TGTCTCACGTGAATAAGACGA	DGLT-A mod
DGLTA-39	<u>CCATGGATAATATTAATACAACA</u> ACTCCACAA	DGLT-A
DGLTA-40	<u>GGATCCTTAAGATTTCTTACTTGATAA</u> AGTATG	DGLT-A
dTBP_HA_SG-01	AGCGCGTCTCCAATGCGGCCGCAATTTACTTAA TTGTG	TFIIIB TBP
dTBP_HA_SG-04	AGCGCGTCTCCGTTGAATTAGAATCAAAAGAACC AACAC	TFIIIB TBP
dTBP-20	GCATTAACTTTTTAAAGGCCTTAAGTACAGGATA AATATTTTC	TFIIIB TBP
dTBP-24	GGCCCATGGAATGAGCACCAGCAACCACTACATC	TFIIIB TBP
dTBP-25	GCTCGAGTTATTGAGTAATTGCATTAAC	TFIIIB TBP
dTBP-28	TATTAATTATGCATAATCTGGTACATCATATGGAT ATTG	TFIIIB TBP
dTBP-29	CAATATCCATATGATGTACC	TFIIIB TBP
dTBP-31	GCATAATCTGGTACATCATATGGATATTGAG	TFIIIB TBP
Leu(TAA) rev	GCAAGAGGCGAGATTCGAACTC	Leucin
mhygl-01	ATGAAAAAACCAGAATTAACAGCAAC	<i>mhygl</i>
mhygl-02	CTTGTAATGTAACACCTTGTGCTCTTC	<i>mhygl</i>
mhygl-03	GCAATTATCAGAAGGTGAAGAATCAAG	<i>mhygl</i>
oligo(dT) <sub>18</sub>	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	
Q-GAPDH-01	GGTTGTCCAATTGGTATTAATGG	<i>gpdA</i>
Q-GAPDH-02	CCGTGGGTTGAATCATATTTGAAC	<i>gpdA</i>

Rep-173	<u>CCATGGAAATCACAAACAACACCACAAATATT</u> AAGC	ORF1 TRE5-A
Rep-174	<u>CTCGAGTTATAGTTTTATTTGGGGTAGATTTTT</u> ATC	ORF1 TRE5-A
Rep-24	CAGGGTCTCTAAAAGAGG	ORF1 TRE5-A
RNH(733-879) -02	<u>GGATCCTATAATGCATCAGCTAAAAAGTTTTCT</u> TTAC	DGLT-A
RNH(883-998) -01	<u>CCATGGGACCAGATAGAGATCAACAGCC</u>	DGLT-A
RNH(883-998) -02	<u>GGATCCTATGTATTAATATTATCATTGTTGATT</u> GAG	DGLT-A
TBP-10	<u>GCGGCCGCAATGAGCACC</u> GCAACCACTACA TC	TFIIIB TBP
TBP-15	CAAAAATTGGATTCTAG <u>GCGGCCGCTACAGA</u> TTTTAAGATTC	TFIIIB TBP
TBP-16 M	GACTCTCACAACACATAAAACAACAATTATTAC	TFIIIB TBP
Thr(AGU)rev	CTATGAGGATCGAACTCATGACC	Threonin
UIVi_SG-01	AGCGCGTCTCCCTTCTCGATTTTAAAGATTGG TTTTT	UMP-Synthase
UIVi_SG-02	AGCGCGTCTCTCCCCATGGTCTGAAAGTCA TTCGACTGG	UMP-Synthase

## 8.2. Aufstellung der verwendeten Plasmide

Die für Transformationen in *D. discoideum*- und *S. cerevisiae*-Stämme verwendeten Plasmide sind fett dargestellt.

**Tabelle 8.2. Verwendete Plasmide.**

Plasmid-Name	Nummer	Insert	Klonierung
<b>pGBKT7-IN 994-1437</b>	20607	DGLT-A IN 994-1437	PCR DGLTA-39 / DGLTA- IN-02 mit NcoI/BamHI verdaut und in 11255 kloniert
<b>pAct2-IN 994-1437</b>	20606	DGLT-A IN 994-1437	PCR DGLTA-39 / DGLTA- IN-02 mit NcoI/BamHI verdaut und in 20112 kloniert
pET42b-TFIIIC4 446-608	20605	TFIIIC4 446-608	mit NcoI aus 20528 ausgeschnitten und in pET42b kloniert
pET42b-RNH 883-998	20604	DGLT-A RNH 883-998	mit NcoI/ BamHI aus 20581 ausgeschnitten und in pET42b kloniert

pET42b-RNH 733-879	20603	DGLT-A RNH 733-879	mit NcoI/ BamHI aus 20584 ausgeschnitten und in pET42b kloniert
pET33b-RNH 994-1067	20598	DGLT-A RNH 994-1067	mit NdeI/BamHI aus 20569 ausgeschnitten und in pET33 kloniert
pET33b-RNH 883-998	20597	DGLT-A RNH 883-998	mit NdeI/BamHI aus 20581 ausgeschnitten und in pET33 kloniert
pET33b-RNH 733-879	20596	DGLT-A RNH 733-879	mit NdeI/BamHI aus 20586 ausgeschnitten und in pET33b kloniert
<b>pAct2-DGLTA RNH 883-998</b>	20595	DGLT-A RNH 883-998	mit NcoI/BamHI aus 20575 ausgeschnitten und in pAct2 20112 kloniert
pET33-TFIIC4 2-219	20587	TFIIC4 2-219	mit NdeI/ BamHI aus 20580 ausgeschnitten und in pET33 20103 kloniert
<b>pAct2-RNH 733-879</b>	20586	DGLT-A RNH 733-879	mit NcoI/ BamHI aus 20577 ausgeschnitten und in pAct2 kloniert
<b>pGBKT7-RNH 733-879</b>	20584	DGLT-A RNH 733-879	mit NcoI und BamHI aus 20577 ausgeschnitten und in pGBKT7 11255 kloniert
<b>pGBKT7-RNH 883-998</b>	20581	DGLT-A RNH 883-998	mit NcoI/ BamHI aus 20575 ausgeschnitten und in 11255 pGBKT7 kloniert
<b>pGBKT7-TFIIC4 2-219</b>	20580	TFIIC4 2-219	mit NcoI/ BamHI aus 20563 ausgeschnitten und in 20112 pAct2 kloniert
<b>pAct2-TFIIC4 2-219</b>	20579	TFIIC4 2-219	mit NcoI/ BamHI aus 20563 ausgeschnitten und in 20112 pAct2 kloniert
pGEMT-RNH 733-879	20577	DGLT-A RNH 733-879	PCR mit DGLTA-RH-01 und RNH 733-879_02 an 20423 und in pGEMT kloniert
pET33-C4 628-997	20576	TFIIC4 628-997	mit NdeI/BamHI aus 20526 ausgeschnitten und in pET33 20103 kloniert
pGEMT-RNH 883-998	20575	DGLT-A RNH 883-998	PCR mit RNH 883-998_01/_02 an 20423 und in pGEMT kloniert
pET33b-TFIIC4 446-608	20574	TFIIC4 446-608	mit NdeI/ NotI aus 20528 ausgeschnitten und in pET33b 20103 kloniert

pET42b-RNH 994-1067	20573	DGLT-A RNH 994-1067	mit NcoI/BamHI aus 20565 ausgeschnitten und in pET42b 20568 kloniert
pET33b-TFIIC4 219-478	20572	TFIIC4 219-478	mit NdeI /BamHI aus 20561 ausgeschnitten und in 20103 pET33b kloniert
<b>pAct2-TFIIC4 219-478</b>	20571	TFIIC4 219-478	mit NcoI/ BamHI aus 20564 ausgeschnitten und in 20112 pAct2 kloniert
<b>pGEMT_H3R-DGLTA mod-BSRi-H3R</b>	20570	DGLT-A mod Bsri	mit AgeI aus 20558 ausgeschnitten und in 20364 kloniert
<b>pGBKT7-DGLTA RNH1 (994-1067)</b>	20569	DGLT-A RNH 994-1067	mit NcoI/BamHI aus 20562 ausgeschnitten und in pGBKT7 kloniert
pET-42b(+)	20568		erworben, Original von Novagen
<b>pAct2-DGLTA RNH1 (994-1067)</b>	20565	DGLT-A RNH 994-1067	mit NcoI/BamHI aus 20562 ausgeschnitten und in pAct2 2.0112 kloniert
pGEMT-DdTFIIC4 219-478 (TRP1-5)	20564	TFIIC4 219-478 (TRP 1-5)	PCR mit DdTFIIC4 219-478_01 und DdTFIIC4 2-478_02 an 2.0518 und in pGEMT kloniert
pGEMT-DdTFIIC4 2-219	20563	TFIIC4 2-219	PCR mit DdTFIIC4 2-478_01 und DdTFIIC4 2-219_02 an 2.0518 und in pGEMT kloniert
pGEMT-DGLTA RNH1	20562	DGLT-A RNH 994-1067	PCR mit DGLTA 39/40 an 2.0530 und in pGEMT kloniert
<b>pGBKT7-DdTFIIC4 219-478</b>	20561	TFIIC4 219-478	NcoI/BamHI Fragment aus 20564 in 1.1255 kloniert
pCR-XL-Topo_DGLTA Orf mod	20558	DGLT-A Orf modifiziert	NdeI/ BglII Fragment aus 20549 ausgeschnitten und gegen Fragment in 20530 ausgetauscht
pGEMT-TBP S195K	20554	TBP S195KI	PCR mit dTBP-24/-25 an 1.1917 und in pGEMT kloniert
<b>pAct2-Orf1 neu</b>	20553	TRE5-A Orf1	Orf1 als NcoI/XhoI Fragment aus 20529 ausgeschnitten und in pAct2 2.0112 kloniert
<b>pAct2-TBP S195K</b>	20552	TBP S195K	PCR dTBP-24/-25 an 11917 und als NcoI/XhoI Fragment in 20112 pAct2 kloniert
pUC57-DGLTA mod	20549	NdeI/ BglII Fragment DGLT-A synthetisiert	GenScript synthetisiert

<b>pGBKT7-dTBP S195K</b>	20535	TBP S195K	mit NotI TBP S195K aus 1.1917 ausgeschnitten und in pGBKT7 kloniert
<b>H3R-DGLTA ORF-BSRI-H3R</b>	20534	DGLT-A-Bsri Element	mit AgeI DGLTA-Orf aus 20530 ausgeschnitten und in 20364 kloniert
pCR-XL-Topo_DGLTA Orf Age	20530	DGLT-A Orf mit Age Schnittstellen	PCR mit DGLTA-35/-36 an 2.0490 und in pCR-XL-Topo kloniert
pGEMT-TRE5A Orf1	20529	TRE5-A-Orf1	PCR mit Rep-173/Rep-174 an 20128 und in pGEMT kloniert
<b>pGBKT7-DdTFIIC4 446-608</b>	20528	TFIIC4 446-608	mit NcoI aus 20515 ausgeschnitten und in pGBKT7 1.1255 kloniert
<b>pAct2-DdTFIIC4 446-608</b>	20527	TFIIC4 446-608	mit NcoI aus 20515 ausgeschnitten und in pAct2 2.0112 kloniert
<b>pAct2-DdTFIIC4 628-997</b>	20526	TFIIC4 628-997	mit NcoI/BamHI aus 20508 ausgeschnitten und in pAct2 2.0112 kloniert
<b>pAct2-DdTFIIC4 2-478</b>	20525	TFIIC4 2-478	mit NcoI/BamHI aus 20505 ausgeschnitten und in pAct2 2.0112 kloniert
<b>pGBKT7-DdTFIIC4 628-997</b>	20519	TFIIC4 628-997	mit NcoI/BamHI aus 20508 ausgeschnitten und in pGBKT7 1.1255 kloniert
<b>pGBKT7-DdTFIIC4 2-478</b>	20518	TFIIC4 2-478	mit NcoI/BamHI aus 20505 ausgeschnitten und in pGBKT7 1.1255 kloniert
pGEMT-mhygl-01/-02 ohne Intron	20517	PCR Produkt mhygl-01/-02 ohne Intron	PCR Produkt mhygl-01/-02 an Hygro Pool von Trafo AX2 mit 20429 und in pGEMT kloniert
pGEMT-mhygl-01/-02 mit Intron	20516	PCR Produkt mhygl-01/-02 mit Intron	PCR Produkt mhygl-01/-02 an G418 Pool von Trafo AX2 mit 20429 und in pGEMT kloniert
pGEMT-DdTFIIC4 446-608	20515	TFIIC4 446-608	PCR mit DdTFC4 (446-608) -01/-02 an AX2 cDNA und in pGEMT kloniert
<b>pGBKT7-DdTFIIC1 420-865</b>	20514	TFIIC1 420-865	mit NcoI/ BamHI aus 20504 ausgeschnitten und in pGBKT7 kloniert
<b>pAct2-DdTFIIC1 420-865</b>	20513	TFIIC1 420-865	mit NcoI/BamHI aus 20504 ausgeschnitten und in pAct2 kloniert

<b>pGBKT7-DdTFIIIC1 22-401</b>	20509	TFIIIC1 22-401	mit NcoI/BamHI aus 20503 ausgeschnitten und in pGBKT7 11255 kloniert
<b>pAct2-DdTFIIIC1 22-401</b>	20508	TFIIIC1 22-401	mit NcoI/BamHI aus 20503 ausgeschnitten und in pAct2 20112 kloniert
<b>A6P-Orf1-HYGi-C L1</b>	20507	Hygromycin Element stem 1	Orf1 mit AgeI /HindIII aus 20128 geschnitten und gegen Orf1-optDd in 20494 ausgetauscht
pGEMT-DdTFIIIC4 628-997	20506	TFIIIC4 628-997	PCR mit DdTFIIIC4 628-997 -01/-02 an AX2 cDNA und direkt in pGEMT kloniert
pGEMT-DdTFIIIC4 2-478	20505	TFIIIC4 2.478	PCR mit DdTFIIIC4 2-478 -01/-02 an AX2 cDNA und direkt in pGEMT kloniert
pGEMT-DdTFIIIC1 420-865	20504	TFIIIC1 420-865	PCR mit DdTFIIIC1 420-865-01/-02 an AX2 cDNA und direkt in pGEMT kloniert
pGEMT-DdTFIIIC1 22-401	20503	TFIIIC1 22-401	PCR mit DdTFIIIC (22-401) -01/-02 an AX2 cDNA und in pGEMT kloniert
<b>pPT130-DGLTA ORF(HA)</b>	20495	DGLT-A-Orf mit HA-Tag	DGLTA-ORF über Gateway Klonierung aus 20490
<b>pKOSG-IBA-dicty1_TBP S195K(HA)+uivi</b>	20493	TBP S195K (HA) und uivi	PCR mit TBP SG-01/-04 an 20376 und Uivi-SG 01/-04 an 20376 und in Stargate Vektor kloniert
<b>pKOSG-IBA-dicty1_TBP(HA)+uivi</b>	20491	TBP (HA) und uivi	TBP(HA) aus 20375 und uivi aus 20375 mittels Stargate System in Vektor kloniert
pCR GW Topo_DGLTA ORF(HA)	20490	DGLT-A Orf mit HA-Tag	PCR mit DGLTA 27-31 und DGLTA 30-32; mit NcoI verdaut und zusammen ligiert; Produkt 27-30 direkt in Topo-Vektor kloniert
pCR GW Topo_DGLTA30-32	20489	DGLT-A-30-32 Orf ohne GAG	PCR mit DGLTA30-32 an PCR-Produkt DGLTA 01-02 mit A-Überhang in Topo-Vektor kloniert
<b>A6P-ORF1-BSRi-C stem1 remut</b>	20488	C-Modul Doppel-Mutante stem I aus 20455	C-Modul aus 20455 mit BamHI in 20128 kloniert-ausgetauscht
<b>A6P-ORF1-BSRi-C stem3 remut</b>	20487	C-Modul Doppel-Mutante stem III aus 20456	C-Modul aus 20456 mit BamHI in 20128 kloniert-ausgetauscht
<b>pGBKT7-DdBdp1</b>	20440	TFIIIB Bdp1	PCR mit dBdp1-01/-02 an 1.1822 und direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI)

<b>pAct2-DdTBP2</b>	20439	TFIIIB TBP	PCR mit dTBP1-01/-02 an 1.1821 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pAct2-DdBdp1</b>	20438	TFIIIB Bdp1	PCR mit dBdp1-01/-02 an 1.1822 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pAct2-DdBrfN</b>	20437	TFIIIB BrfN	PCR mit dBrfN-01/-02 an 1.1731 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pAct2-DdBrfC</b>	20436	TFIIIB BrfC	PCR mit dBrfC-01/-02 an 1.1730 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pGBKT7-DdTBP</b>	20435	TFIIIB TBP	PCR mit dTBP-01/-02 an 1.1821 und direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pGBKT7-DdBrfN</b>	20434	TFIIIB BrfN	PCR mit dBrfN-01/-02 an 1.1731 und direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pGBKT7-DdBrfC</b>	20433	TFIIIB BrfC	PCR dBrfC-01/-02 an 1.1730 direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pGBKT7-DGLTA_RH</b>	20432	DGLT-A-RH 733-1067	PCR mit DGLTA--RH-01/RH-02 an PCR Produkt DGLTA-01/-02 direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pGBKT7-DGLTA_NTD</b>	20431	DGLT-A-GAG 2-236	PCR mit DGLTA-NTD-01/-02 an DGLTA-11/-12 und direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>A6P-ORF1-HYGI-C_age</b>	20429	A6P-Orf1-Hygi-C	Hygromycin-Kassette aus 20418 mit AgeI/PstI herausgeschnitten und im Austausch gegen Blasticidin-Kassette in 20128 kloniert
<b>pGBKT7-DGLTA_IN</b>	20428	DGLT-A-IN 1057-1437	PCR mit DGLTA-IN-01/IN-02 an PCR-Produkt DGLTA-01/02 direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pGBKT7-DGLTA_RT</b>	20427	DGLT-A-RT 419-742	PCR mit DGLTA-RT-01/RT-02 an PCR Produkt DGLTA-01/-02 direkt in pGBKT7 Kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pGBKT7-DGLTA_Prot</b>	20426	DGLT-A-Prot 231-425	PCR mit DGLTA-PR-01/PR-02 an PCR Produkt DGLTA-01/-02 direkt in pGBKT7 Kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pAct2-DGLTA_RH</b>	20423	DGLT-A-RH 733-1067	PCR mit DGLTA-RH-01/RH-02 an PCR Produkt DGLTA-01/-02 direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)

<b>pAct2-DGLTA_RT</b>	20422	DGLT-A-RT 419-742	PCR mit DGLTA-RT-01/RT-02 an PCR Produkt DGLTA-01/-02 direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pAct2-DGLTA_Prot</b>	20421	DGLT-A-Prot 231-425	PCR mit DGLTA-PR-01/PR-02 an PCR Produkt DGLTA-01/-02 direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pAct2-DGLTA_NTD</b>	20420	DGLT-A-GAG 2-236	PCR mit DGLTA-NTD-01/NTD-02 an PCR Produkt DGLTA-11/-12 direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI)
<b>pAct2-DGLTA_IN</b>	20419	DGLT-A- IN 1057-1437	PCR mit DGLTA_IN-01 und DGLTA_IN-02 an PCR-Produkt DGLTA-01/02 direkt in pAct2 kloniert (BamHI/NcoI)
pUivi_TBP (HA) S195K	20376	Uivi (UMP32/33) aus 1.1365 und TBP (HA) S195K	ssMutagenese mit dTBP-28 an 2.0347; Prolin in HA-tag eingeführt
pUivi_TBP (HA)	20375	Uivi (UMP32/33) aus 1.1365 und TBP (HA)	ss Mutagenese mit dTBP-28 an 2.0339; Prolin in HA-tag eingeführt
<b>pAct2-dTBP</b>	20372	TBP	PCR-Produkt dTBP24/25 an 1.1821 als NcoI / XhoI Fragment in pAct2 (2.0112) kloniert
<b>pGEMT-H3R-BSRi-H3R</b>	20364	vorderer H3R vom DGLT-A, Bsri Kasette, hinterer H3R vom DGLT-A	vorderer H3R inkl. untranslatierter Region des 5'-Endes mit DGLTA 11/19 als SphI/ AgeI- Fragment in pGEMT-BSRi-H3R (20317) kloniert
pUivi-TBP (HA o.P) S195K	20347	Uivi (UMP32/33) aus 1.1365 und TBP (HA) S195K	ss Mutagenese mit dTBP-20 an 2.0339
pAct2-Orf1	20346	Orf1 von TRE5-A	PCR-Produkt Rep-173/ 174 an 1.1757 als NcoI/ XhoI Fragment direkt in pAct2 (2.0112) kloniert
pUivi-TBP (HA o.P)	20339	Uivi (UMP32/33) aus 1.1365 und TBP (HA)	ssMutagenese mit TBP-15 an 2.0318; HA-Tag am C-Terminus von TBP eingeführt
pGEMT-DGLTA (11-19)	20338	PCR Fragment DGLT-A (11-19) (vorderer H3R mit untranslatierter Region des 5'-Endes)	PCR mit DGLTA 11-19 an PCR Produkt DGLTA 01-02 und in pGEMT ligiert
pUivi_TBP	20318	Uivi (UMP32/ 33) aus 1.1365	Uivi als NcoI Fragment aus 2.0107 in pGEMT_TBP13M/ 14M 2.0033 kloniert
pGEMT_BSRi_H3R	20317	Bsri-Kasette	BSRi-Kasette aus 2.0128 mit AgeI/ BamHI in pGEMT_PPT-H3R 2.0254 kloniert
pGEMT_DGLTA-IN	20272	DGLT-A IN 1057-1437	IN-Fragment mit DGLTA-07/08 (1171 bp) an PCR-Produkt DGLTA-

			01/02a von AX2 gDNA PCRt und in pGEMT ligiert
pGEMT_PPT-H3Rrev	20255	PCR Fragment DGLT-A 21-02 (hinterer H3R mit PPT)	PCR mit DGLTA (21-02) an AX2 gDNA und Ligation in pGEMT
pGEMT_PPT-H3R	20254	PCR Fragment DGLT-A 21-02 (hinterer H3R mit PPT)	PCR mit DGLTA(21-02) an AX2 gDNA und Ligation in pGEMT
<b>A6P-Orf1-BSri-C L2</b>	20238	A6 Promotor, Orf1, BSri; C-Modul mit Mutation Stamm 2	ssMutagenese mit Rep159 an pGEM A6-Orf1-Bsri-C (1.1777)
<b>A6P-Orf1-Bsri-C L1</b>	20237	A6 Promotor, Orf1, Bsri, C-Modul mit Mutation Stamm 1	ssMutagenese mit Rep158 an pGEM A6-Orf1-BSri-C (1.1777)
pGEMT_DGLTA_(11-13)	20220	PCR Fragment (11-13) von DGLT-A	mit DGLTA (11-13) an DGLTA (11-12) PCRt und in pGEMT ligiert
pGEMT_DGLTA_(11-12)mut	20209	PCR Fragment (11-12) von DGLT-A mutiert mit DGLT-A 18	Einzelstrangmutagenese mit DGLTA 18 an Plasmid 2.0195; HindIII Site eingefügt
pGEMT_DGLTA_(11-12)#1	20195	PCR Fragment (11-12) von DGLT-A	mit DGLTA(11-12) an AX2 gDNA PCRt und in pGEMT ligiert
pGEM-DGLTA-RH#16	20149	DGLT-A RH 733-1067	RH-Domäne von DGLTA mit DGLTA-17/06 (1009bp) an PCR-Produkt DGLT1/2a an AX2 gDNA PCRt und in pGEM-T ligiert
pGEM-DGLTA-RT#8	20148	DGLT-A-RT 419-742	RT-Domäne von DGLTA mit DGLTA-15/16 (999bp) an PCR-Produkt DGLT1/2a an AX2 gDNA PCRt und in pGEM-T ligiert
<b>A6P-Orf1-Bsri-C Age</b>	20128	A6 Promotor, Orf1, Bsri, C-Modul	ssMutagenese mit BSRmut-Age an pGEM A6-Orf1-Bsri-C (1.1777)



## 9. Tabellen und Abbildungen

### 9.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.	Phylogenetische Einteilung der <i>Dictyosteliidae</i> .	3
Abb. 1.2.	Entwicklungszyklus von <i>D. discoideum</i> .	5
Abb. 1.3.	Darstellung des RNA-Polymerase III-Komplexes, Typ II von <i>S. cerevisiae</i> .	10
Abb. 1.4.	Darstellung der Häufigkeit von DNA-Transposons und Retrotransposons in eukaryotischen Genomen.	12
Abb. 1.5.	Transpositionsmechanismen der DNA- und Retrotransposons.	13
Abb. 1.6.	Transpositionsmechanismen von Retrotransposons.	15
Abb. 1.7.	Genomische Organisation unterschiedlicher LTR-Retrotransposon-Familien.	18
Abb. 1.8.	Transposable Elemente des <i>D. discoideum</i> Genoms.	21
Abb. 1.9.	Strukturen der Retrotransposons in <i>D. discoideum</i> .	25
Abb. 1.10.	Die Proteinstruktur von CbfA.	30
Abb. 1.11.	Übersicht der Retrotranspositionssysteme in <i>D. discoideum</i> .	34
Abb. 3.1.	Integrationsstellen der Retrotransposons TRE5 und DGLT-A oberhalb eines tRNA-Gens.	63
Abb. 3.2.	Retrotranspositionsexperiment mit genetisch markierten TRE5-A <sup>BSR</sup> -Retrotransposons.	64
Abb. 3.3.	Darstellung der räumlichen RNA-Struktur des C-Moduls von TRE5-A.	66
Abb. 3.4.	Analyse der Retrotransposition und Transkription der C-Modul-Mutanten von TRE5-A <sup>BSR</sup> .	68
Abb. 3.5.	Vergleich des Codongebrauches des Gens der Hygromycin B-Phosphotransferase in <i>D. discoideum</i> vor und nach der Codon-Optimierung.	71
Abb. 3.6.	Vergleich der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A <sup>BSR</sup> und TRE5-A <sup>HYG</sup> .	73
Abb. 3.7.	Vergleich der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A <sup>HYG</sup> in den Stämmen AX2 und JH.D.	75

Abb. 3.8.	Lokalisation von mobilisierten TRE5-A <sup>HYG</sup> -Retrotransposons an tRNA-Genen.	77
Abb. 3.9.	Übersicht der zur Komplementation von CbfA und dessen CTD in JH.D verwendeten Plasmide.	79
Abb. 3.10.	Untersuchung der TRE5-A <sup>HYG</sup> -Retrotransposition in Abhängigkeit von CbfA.	81
Abb. 3.11.	Proteinstruktur von TBP aus <i>D. discoideum</i> .	83
Abb. 3.12.	Übersicht der <i>tbpA</i> (HA)-Konstrukte.	84
Abb. 3.13.	Charakterisierung der TBP(HA)- <i>knock-in</i> -Mutanten.	85
Abb. 3.14.	Expression der TBP(HA)- <i>knock-in</i> -Mutanten.	86
Abb. 3.15.	Untersuchung der TRE5-A <sup>HYG</sup> -Retrotransposition im Wildtyp und in TBP(HA)- und TBP(HA) S195K-Mutanten von DH1.	88
Abb. 3.16.	Struktur des LTR-Retrotransposons DGLT-A.	90
Abb. 3.17.	DNA-Motive innerhalb der LTR-Sequenz des Retrotransposons DGLT-A.	91
Abb. 3.18.	Domänen und DNA-Motive innerhalb der ORF-Sequenz des Retrotransposons DGLT-A.	92
Abb. 3.19.	Charakterisierung der DGLT-A-Retrotransposons im Stamm AX4 exklusive Solo-LTRs.	96
Abb. 3.20.	tRNA-Gen-Abstände der endogenen DGLT-A-Population.	97
Abb. 3.21.	tRNA-Gene als multiple Integrationsorte.	98
Abb. 3.22.	Analyse der Transkription des ORFs von DGLT-A.	100
Abb. 3.23.	Schematische Darstellung des nicht-autonomen aDGLT-A <sup>BSR</sup> 1-Retrotransposons.	102
Abb. 3.24.	Schematische Darstellung des nicht-autonomen aDGLT-A <sup>BSR</sup> 2-Retrotransposons.	103
Abb. 3.25.	Schematische Darstellung des autonomen aDGLT-A <sup>BSR</sup> 3-Retrotransposons.	103
Abb. 3.26.	Schematische Darstellung des autonomen aDGLT-A <sup>BSR</sup> 4-Retrotransposons.	104
Abb. 3.27.	Analyse der Transkription der artifiziellen DGLT-A <sup>BSR</sup> - Retrotransposons.	105
Abb. 3.28.	Nachweis der Transkription des ORF der artifiziellen DGLT-A <sup>BSR</sup> -Konstrukte.	107

Abb. 3.29.	Analyse der Retrotransposition der aDGLT-A <sup>BSR</sup> -Konstrukte.	108
Abb. 3.30.	Untersuchung der Interaktion des ORF1-Proteins von TRE5-A mit TFIIIB im Hefe-Zweihybrid-System.	110
Abb. 3.31.	Analyse der Interaktionen des ORF-Proteins von DGLT-A mit TFIIIB und sich selbst.	112
Abb. 3.32.	Alignment der TFIIIC-Untereinheiten aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>D. discoideum</i> .	114
Abb. 3.33.	Analyse der Protein-Domänen von TFC4 in <i>D. discoideum</i> .	115
Abb. 3.34.	Untersuchungen zu Interaktionen von DGLT-A mit TFIIIC.	116
Abb. 3.35.	Darstellung der für die Analyse im Hefe-Zweihybrid-System verwendeten ORF-Fragmente von DGLT-A.	118
Abb. 3.36.	Auswertung der <i>Pulldown</i> -Experimente mit Tfc4.	119
Abb. 3.37.	Analyse der Interaktionen von RH-B- und der IN-Domäne von DGLT-A.	120
Abb. 4.1.	RNA-Strukturvorhersage des C-Moduls des Retrotransposons TRE5-A.	124
Abb. 4.2.	Vermutliche Alternativen bei der Translation des Blasticidin-Resistenzgens.	139

## 9.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.	Verwendete Geräte.	37
Tab. 2.2	Verwendete Chemikalien.	38
Tab. 2.3.	Verbrauchsmaterialien.	39
Tab. 2.4.	Verwendete Kits.	40
Tab. 2.5.	Verwendete Enzyme.	40
Tab. 2.6.	Verwendete Größenstandards.	41
Tab. 2.7.	Antibiotika und ihre eingesetzten Konzentrationen.	41
Tab. 2.8.	Verwendete Programme.	44
Tab. 2.9.	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer für die CaCl <sub>2</sub> -Transformation.	45
Tab. 2.10.	Zusammensetzung des Phosphatpuffers.	47
Tab. 2.11.	Zusammensetzung der Puffer zur Herstellung von genomischer DNA.	48
Tab. 2.12.	Zusammensetzung der Puffer für die <i>in vitro</i> -Mutagenese.	51
Tab. 2.13.	Zusammensetzung der Proteinaufreinigungspuffer.	54
Tab. 2.14.	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Protein-	

	<i>Pulldown.</i>	55
Tab. 2.15.	Zusammensetzung der Puffer und Gele für die SDS-PAGE.	57
Tab. 2.16.	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den <i>Western Blot</i> .	58
Tab. 2.17.	Zusammensetzung der Lösungen für das Hefe-Zweihybrid-System.	59
Tab. 3.1.	Untersuchung der Integrationsorte der endogenen DGLT-A-Retrotransposons in <i>D. discoideum</i> .	95
Tab. 8.1.	Verwendete Oligonukleotide.	169
Tab. 8.2.	Verwendete Plasmide.	172

## 10. Abkürzungen

5-FO	5-Fluoroorotat
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Bdp1	<i>B-double-prime 1</i>
Bicin	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin
bp	Basenpaare
Brf1/Brf2	<i>B-related-factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosinmonophosphat</i>
CbfA	C-Modul bindender Faktor A
CCD	katalytische <i>Core</i> -Domäne
cDNA	<i>complementary-DNA</i>
CTD	C-terminale Domäne
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
ddH <sub>2</sub> O	Aqua destilliert
DGLT-A	<i>Dictyostelium gypsy-like Transposon-A</i>
DGLT-A <sup>BSR</sup>	mit Blasticidin-Resistenzmarker markiertes DGLT-A
DIRS-1	<i>Dictyostelium intermediate repeat sequence-1</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4 Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G418	Geneticin
gag	<i>group specific antigen</i>
H3R	<i>Hind3-repeat</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LTR	<i>long terminal repeat</i> (lange endständige Wiederholung)
<i>mbsr1/ mhygl</i>	Blasticidin-/ Hygromycin-Resistenzmarker
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic Säure
mRNA	<i>messenger- RNA</i>
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PBS	<i>primer binding site</i> (tRNA-Primer-Bindestelle)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
pol	Polyprotein

PPT	<i>polypurine tract</i> (Polypurin-Bindestelle)
RH-B	Ribonuklease H-Bereich
RNA	Ribonukleinsäure
RNH	Ribonuklease H
RT (Kapitel 2)	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetraethylethylendiamin
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
Tfc1/ Tfc4	TFIIIC-Untereinheit
TFIIIA/ TFIIIB/ TFIIIC	Transkriptionsfaktor IIIA/ -B/ -C ( <i>transcription factor for polymerase III</i> )
TPR	Tetratricopeptid-Repeat Wiederholungen
TPRT-Mechanismus	<i>target prime reverse transcription</i>
TRE	tRNA <i>gene-targeted retroelement</i>
TRE5-A <sup>BSR/HYG</sup>	mit Blasticidin bzw. Hygromycin-Resistenzmarker markiertes TRE5-A
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
Ty	<i>transposon of yeast</i>
UMPS	Uridinmonophosphat-Synthase
Upm	Umdrehungen pro Minute
ura <sup>-</sup>	Uracil auxotroph
X- $\alpha$ -Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid
YR	Tyrosin-Rekombinase-Retrotransposons

## **11. Eigenständigkeitserklärung**

---

Hiermit erkläre ich, gemäß der Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena vom 04. Dezember 2012, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde oder Hochschule eingereicht.

Jana Schiefner

Ulm, den 28. Februar 2014



