# Funktion des Transkriptionsfaktors CbfA in *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-Trophologin Annika Bilzer
geboren am 08. August 1976
in Georgsmarienhütte

Jena
Januar 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Winckler

2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

3. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der öffentlichen Verteidigung: 2. Mai 2011

Inhaltsverzeichnis.....i

Abbildungsverzeichnis.....v

Abkürzungsverzeichnis.....ix

1 Einleitung.....1

1.1 Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum*.....1
1.1.1 Taxonomie und phylogenetische Stellung.....1
1.1.2 Organisation des Genoms.....4
1.1.3 Das Proteom.....5
1.1.4 Multizelluläre Entwicklung.....6
1.1.5 Regulation der multizellulären Entwicklung.....9
1.2 Transposons (mobile genetische Elemente).....13
1.3 Transposons in *Dictyostelium discoideum*.....14
1.3.1 Nomenklatur und Einteilung.....14
1.3.2 Non-LTR-Retrotransposons.....15
1.3.2.1 TRE5-A.....16
1.3.2.2 Positions-spezifische Integration von TRE5-A.....17
1.4 Der C-Modul-bindende Faktor A.....19
1.4.1 Struktur des CbfA-Proteins und des kodierenden *cbfA*-Gens.....20
1.4.2 Weitere Jumonji-Proteine in *Dictyostelium discoideum*.....23
1.5 Epigenetik, Chromatinmodifikationen und ihr Einfluss auf die Genomexpression.....24
1.6 RNAi und *Antisense*-RNA in *Dictyostelium discoideum*.....27
1.7 Ziele der Arbeit.....30

2 Materialien und Methoden.....31

2.1 Materialien.....31
2.1.1 Laborgeräte.....31
2.1.2 Chemikalien.....32
2.1.3 Lösungen und Puffer.....33
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....33
2.1.5 Kits.....34
2.1.6 Enzyme.....34
2.1.7 Größenstandards.....34
2.1.8 Antikörper.....34

2.1.9 Mikroorganismen....35
2.1.9.1 *Escherichia-coli*-Stämme....35
2.1.9.2 *Dictyostelium-discoideum*-Stämme....35
2.1.9.3 Weitere Mikroorganismen....36
2.1.10 Nährmedien und Antibiotika....36
2.1.10.1 Flüssige Nährmedien....36
2.1.10.2 Agar-Nährmedien....36
2.1.10.3 Antibiotika und Additiva....37
2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden....37
2.2.1 Primer-gerichtete *In-vitro*-Mutagenese....37
2.2.1.1 Herstellung von Einzelstrang-DNA....38
2.2.1.2 Primer-Phosphorylierung....38
2.2.1.3 *In-vitro*-Mutagenese....38
2.3 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*....39
2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen....39
2.3.1.1 *Dictyostelium-discoideum*-Stamm AX2....39
2.3.1.2 *Dictyostelium-discoideum*-Stamm JH.D....39
2.3.1.3 *Dictyostelium-discoideum*-Stamm JH.D[ura$^-$]....39
2.3.2 Transformation von *Dictyostelium discoideum*....40
2.3.2.1 Elektro-Transformation (Elektroporation)....40
2.3.2.2 $CaCl_2$-Transformation....40
2.3.3 Herstellung von Gefrier-Konserven....41
2.3.3.1 DMSO-Konserven....41
2.3.3.2 Glycerin-Konserven....41
2.3.4 Herstellung von Zelllysaten (Pellets) ....42
2.3.5 Isolation von genomischer DNA....42
2.3.6 Isolation von RNA und Synthese von cDNA....43
2.3.7 Dokumentation der Entwicklung....43
2.3.7.1 Phänotypisierung auf Bakterienrasen....43
2.3.7.2 Phänotypisierung auf Phosphatagar-Platten....43
2.3.8 Pulsen von *Dictyostelium discoideum* mit cAMP....44
2.3.9 *In-vivo*-Retrotranspositionsassay (5-FO-Selektion) ....44
2.3.10 Herstellung von Kernextrakten....45
2.4 SDS-PAGE....46
2.5 *Western Blot*....46
2.6 *Northern Blot*....48
2.7 DNA-Protein-Interaktionsassay (*Pulldown-Assay*)....48

2.8 Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) ....49
2.9 Primerliste....50
2.10 Plasmidliste....52

3 Ergebnisse....53

3.1 Der CbfA-Suppressionsstamm JH.D....53
3.2 Untersuchung der Expression von CbfB....57
3.3 Komplementation von JH.D mit rekombinantem CbfA....59
3.4 Komplementation von JH.D[ura$^-$] mit rekombinantem CbfA....64
3.5 Genregulation in Abhängigkeit von CbfA....69
3.5.1 Festlegung eines neuen Referenzgens für die qRT-PCR....69
3.5.2 Einteilung CbfA-abhängiger Gene in Cluster....70
3.5.3 Regulation CbfA-abhängiger Gene durch TAP-CbfA in JH.D....71
3.5.4 Regulation CbfA-abhängiger Gene durch TAP-CbfA in JH.D[ura$^-$]....72
3.5.5 Zusammenfassung Komplementation durch TAP-CbfA....73
3.6 Vergleich der Funktionalität und Expressionsstärke von TAP-CbfA in JH.D und JH.D[ura$^-$]....74
3.7 Einfluss von Mutationen in CbfA auf die multizelluläre Entwicklung....77
3.7.1 Mutationen in der Jumonji-Domäne (JmjC)....78
3.7.2 Mutation und Deletionen im Bereich der Zinkfinger-Motive....82
3.7.3 Mutationen im Bereich des AT-Hakens....85
3.8 Einfluss von cAMP-Pulsen auf die Expression der Entwicklungsgene *acaA* und *csaA*....89
3.9 Einfluss von CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A....94
3.10 Einfluss von TAP-CbfA / mutiertem TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A....104
3.11 Einfluss von CbfA auf die Expression von RNAi-Komponenten....106

4 Diskussion....108

4.1 Einfluss von CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A....108
4.2 Einfluss von CbfA auf die PTGS-Maschinerie der Zelle....110
4.3 Funktionen der CbfA-Domänen....113
4.3.1 Komplementation von JH.D und JH.D[ura$^-$] mit Gesamt-CbfA....113
4.3.2 Auswirkungen von Mutationen in der JmjC-Domäne in CbfA....116
4.3.3 Auswirkungen von Mutationen der Zinkfinger-Motive in CbfA....119
4.3.4 Auswirkungen von Mutationen des AT-Hakens in CbfA....121
4.4 Ausblick....123

5 Zusammenfassung.....125

6 Summary.....127

7 Literaturverzeichnis.....129

Wissenschaftliche Publikationen und Tagungsbeiträge.....142

Ehrenwörtliche Erklärung.....143

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteom-basierende Phylogenie der Eukaryoten....2

Abbildung 2: Phylogenie der *Dictyosteliidae*....3

Abbildung 3: Darstellung der multizellulären Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* (schematisch und elektronenmikroskopisch)....8

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von Proteinkinase A zur Initiation der multizellulären Entwicklung....11

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Transpositionsmechanismen von DNA-Transposons und Retrotransposons....14

Abbildung 6: Übersicht aller Transposons in *Dictyostelium discoideum*....15

Abbildung 7: Darstellung der Integrationsorte tRNA-Gen-assoziierter Retrotransposons....16

Abbildung 8: Aufbau von TRE5-A Retrotransposons....17

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Transkriptionsinitiation an einem tRNA-Gen....18

Abbildung 10: Darstellung der Domänenstruktur des CbfA-Proteins....20

Abbildung 11: Darstellung der Domänenstruktur der Proteine CbfB und RbbB....23

Abbildung 12: Reaktionsmechanismus der Demethylierung an Arginin- und Lysinresten von Histonen durch JmjC-haltige Proteine....25

Abbildung 13: Modell der Funktionsweise von *Antisense*-RNA und RNAi in *Dictyostelium*....28

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Entstehung von JH.D und des *cbfA*-Locus in JH.D....54

Abbildung 15: Schematische Darstellung der *amber*-Stopcodon-Suppression in JH.D....55

Abbildung 16: Gelelektrophorese der Genotypisierung von AX2, JH.D und JH.D[ura$^-$] zum Nachweis von Wildtyp-*cbfA* bzw. des eingeführten *amber*-Stopcodons....56

Abbildung 17: Alignment der Aminosäurensequenzen von CbfA und CbfB....57

Abbildung 18: Gelelektrophorese der PCR-Analyse zur Untersuchung der Expression von *cbfB* in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Dictyostelium discoideum*....58

Abbildung 19: Schematische Darstellung der zur Doppeltransformation von JH.D verwendeten Plasmide TAP-CbfA und pISAR....60

Abbildung 20: Fließschema zum zeitlichen Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse positiver Transformanten in JH.D....60

Abbildung 21: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA]....61

Abbildung 22: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] im Vergleich zu AX2, JH.D und JH.D[pPB4c]....62

Abbildung 23: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[neo$^{R}$/TAP-CbfA] nach Kultivierung über mehrere Generationen.....63

Abbildung 24: Schematische Darstellung der zur Doppeltransformation von JH.D[ura$^{-}$] verwendeten Plasmide TAP-CbfA und pUiVi.....65

Abbildung 25: Fließschema zum zeitlichen Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse positiver Transformanten in JH.D[ura$^{-}$].....66

Abbildung 26: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA].....66

Abbildung 27: Entwicklungsphänotypisierung von JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA] im Vergleich zu AX2 und JH.D[ura$^{-}$].....67

Abbildung 28: Regulation differentiell exprimierter Gene in AX2, JH.D[pPB4c] und JH.D[pPB1] zu JH.D mittels qRT-PCR.....69

Abbildung 29: Einfluss auf Regulation der Cluster-Gene durch Komplementation von JH.D mit TAP-CbfA bzw. pPB4c.....71

Abbildung 30: Regulation differentiell exprimierter Gene in AX2 zu JH.D, JH.D[ura$^{-}$] und JH.D[uivi].....72

Abbildung 31: Einfluss auf Regulation der Cluster-Gene durch Komplementation von JH.D[ura$^{-}$] mit TAP-CbfA.....73

Abbildung 32: *Western-Blot*-Analysen der CbfA-Mengen verschiedener Stämme.....75

Abbildung 33: *Western-Blot*-Analyse des *Pulldown-Assays* von TAP-CbfA aus JH.D bzw. JH.D[ura$^{-}$].....76

Abbildung 34: Aminosäurensequenz von CbfA mit eingeführten Mutationen.....77

Abbildung 35: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA/H163A+D165A].....78

Abbildung 36: cDNA-Sequenz zweier Transformanten des Typs JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA/H163A+D165A].....79

Abbildung 37: *Western-Blot*-Analyse weiterer Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA/H163A+D165A].....80

Abbildung 38: cDNA-Sequenz eines JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA/H163A+D165A]-Klons.....80

Abbildung 39: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA/H163A+D165A] im Vergleich zu AX2, JH.D[ura$^{-}$] und JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA].....81

Abbildung 40: Alignment der Zinkfinger-Motive von CbfA und CbfB verschiedener *Dictyosteliidae* sowie von CbfA-ähnlichen Proteinen anderer Spezies.....82

Abbildung 41: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA] mit Mutationen bzw. Deletionen im Bereich der Zinkfinger.....83

Abbildung 42: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA] mit Mutation bzw. Deletionen im Bereich der Zinkfinger-Motive.....84

Abbildung 43: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA] mit Mutationen im Bereich des AT-Hakens....86

Abbildung 44: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[ura$^{+}$/TAP-CbfA] mit Mutationen im Bereich des AT-Hakens....87

Abbildung 45: Einfluss auf die Regulation der Entwicklungsgene durch Komplementation von JH.D mit pPB4c bzw. TAP-CbfA....90

Abbildung 46: Einfluss auf die Expression der Entwicklungsgene durch Komplementation von JH.D[ura$^{-}$] mit TAP-CbfA und mutiertem TAP-CbfA....92

Abbildung 47: *Northern-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[CbfA$^{724-998}$] und JH.D[CbfA$^{2-998}$]....94

Abbildung 48: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide zur Untersuchung der Retrotransposition von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA....95

Abbildung 49: Prinzip des *In-vivo*-Assays zur Bestimmung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A....96

Abbildung 50: Entstehung der Stämme zur Untersuchung der Retrotransposition von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA....98

Abbildung 51: Zeitlicher Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse positiver Transformanten in JH.D[ura$^{-}$]....99

Abbildung 52: PCR-Analyse von genomischer DNA der Transformanten JH.D[ui] und JH.D[uivi] nach zusätzlicher Transformation mit den Expressionsplasmiden pDXA-3H, pPB1 und pPB4c....100

Abbildung 53: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ui] und JH.D[uivi] nach zusätzlicher Transformation mit den Expressionsplasmiden pDXA-3H, pPB1 und pPB4c....101

Abbildung 54: Einfluss auf die Expression von TRE5-A durch Transformation von JH.D[ui] bzw. JH.D[uivi] mit CbfA$^{724-998}$ bzw. komplettem CbfA....102

Abbildung 55: 5-FO-Selektion zur Bestimmung des Einflusses von CbfA$^{724-998}$ bzw. vollständigem CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A....103

Abbildung 56: 5-FO-Selektion zur Bestimmung des Einflusses von TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A....104

Abbildung 57: 5-FO-Selektion zur Bestimmung des Einflusses von Mutationen in TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A....105

Abbildung 58: PCR-Analyse der Expression von PTGS-Komponenten in AX2....106

Abbildung 59: Expression von RNAi-Komponenten in Abhängigkeit von CbfA....107

Abbildung 60: Darstellung der JmjC-Domänen-Struktur von JMJD2....117

Tabelle 1: Übersicht der im *Microarray* festgelegten Cluster von CbfA-abhängig exprimierten Genen....70

Tabelle 2: Übersicht aller TAP-CbfA-Transformanten in JH.D[ura$^{-}$]....88

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| A, Ala | Alanin, Aminosäure |
| ACA | Adenylatcyclase A (AcaA) |
| APS | Ammoniumperoxisulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | *base pairs*, Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum-Albumin |
| cAMP | cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| CAR | cAMP-Rezeptor |
| CbfA | C-Modul-bindender Faktor A, Protein aus *Dictyostelium discoideum* |
| cDNA | *complementary deoxyribonucleic acid,* komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CRAC | *cytosolic regulator of adenylyl cyclase* |
| csA | *contact site A*, Glykoprotein zur Zell-Zell-Adhäsion, das vom Gen *csaA* kodiert wird; auch als gp80 bezeichnet |
| CTD | Carboxy-terminale Domäne (von CbfA) |
| D, Asp | Asparaginsäure, Aminosäure |
| Da (kDa) | Dalton, Maßeinheit der Masse ,1 Da = 1/12 der Atommasse von Kohlenstoff |
| dA | 2‘-Desoxyadenosin-5‘-monophosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure |
| dT | 2‘-Desoxythymidin-5‘-monophosphat |
| DTT | 1,4-Dithio-threitol |
| E, Glu | Glutaminsäure, Aminosäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ERK2 | *extracellular signal related kinase 2* (MAP-Kinase) |
| H, His | Histidin, Aminosäure |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRP | *horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase |
| IPTG | Isopropylthio-β-D-galactosid |
| ITS | *internal transcribed spacer* |
| K, Lys | Lysin, Aminosäure |
| L, Leu | Leucin, Aminosäure |
| JmjC | Jumonji-Domäne des Carboxy-terminalen Typs, Proteindomäne |
| MAP | *mitogen-activated phosphatase,* mitogen-aktivierte Phosphatase |
| Mb | Megabasen, 1000 bp |
| MES | 2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure |

| | |
|---|---|
| MQ-Wasser | entsalztes, ultrareines Wasser (hergestellt mittels Milli-Q®-Anlage) |
| mRNA | *messenger ribonucleic acid,* Boten-Ribonukleinsäure |
| m/v | Masse pro Volumen |
| NLS | *nuclear localization sequence*, Kernlokalisationssequenz |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | *open reading frame*, Offener Leserahmen |
| PCR | *polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion |
| PDE, PdsA | extrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase, kodiert von *pdsA* |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PKA | Proteinkinase A |
| Pst | *pre-stalk cell*, Prästielzelle |
| PTGS | *post-transcriptional gene-silencing,* Posttranskriptionelle Geninaktivierung |
| qRT-PCR | quantitative *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion an einer komplementären DNA |
| R, Arg | Arginin, Aminosäure |
| Ras | *rat sarcoma*, ein Protoonkogen |
| REGA | intrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase |
| RNA | *ribonucleic acid,* Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rpm | *rotations per minute*, Umdrehungen pro Minute |
| rRNA | *ribosomal ribonucleic acid*, ribosomale Ribonukleinsäure |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| siRNA | *short interfering ribonucleic acid* |
| TE | *transposable elements*, Transposable Elemente (Transposons) |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TPRT | *target primed reverse transcription* |
| tRNA | *transfer ribonucleic acid,* Transfer-Ribonukleinsäure |
| TSD | *target site duplication*, Zielsequenzverdopplung bei Integration eines Retrotransposons |
| UTR | *untranslated region*, untranslatierte Region auf einer Nukleinsäure |
| X-α-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranosid |

# 1 Einleitung

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion des Transkriptionsfaktors CbfA (C-Modul-bindender Faktor A) in *Dictyostelium discoideum* untersucht werden. Dieser besitzt sowohl eine Bedeutung für die multizelluläre Entwicklung des Organismus als auch für die Transkription des Retrotransposons TRE5-A. Zur Einführung in die Thematik sollen der verwendete Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*, seine grundlegenden Eigenschaften, sein Lebenszyklus, die phylogenetische Stellung sowie der Aufbau des Genoms und Proteoms vorgestellt werden. Es folgen eine Beschreibung von Aufbau und Funktion des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Retrotransposons TRE5-A sowie eine Zusammenfassung des bisherigen Forschungsstandes bezüglich CbfA. Abschließend wird ein Einblick in die Epigenetik und die RNAi-Maschinerie in *Dictyostelium discoideum* gegeben.

## 1.1 Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum*

### 1.1.1 Taxonomie und phylogenetische Stellung

Die Gattung *Dictyostelium* wurde erstmalig anhand der Art *Dictyostelium mucoroides* von Julius Oscar Brefeld im 19. Jahrhundert beschrieben [BREFELD 1869]. Mehr als 60 Jahre später entdeckte Raper die Art *Dictyostelium discoideum* in den Wäldern North Carolinas. Das Isolat NC 4 stellt den Vorläufer heutiger Laborstämme dar [RAPER 1935].

*Dictyostelium discoideum* gehört zur Ordnung der *Dictyosteliales*, die nur aus der Familie der *Dictyosteliidae* besteht. Diese Familie umfasst 89 Arten der Gattungen *Dictyostelium*, *Polysphondylium* und *Acytostelium* [ALVAREZ-CURTO *et al.* 2005; SCHAAP *et al.* 2006]. Aufgrund der Morphologie der Fruchtkörper wurde *Dictyostelium* zunächst den Pilzen zugeordnet [BREFELD 1869]. Durch Beobachtung des Wechsels zwischen einzelliger und multizellulärer Lebensphase kam Brefeld zu der Überzeugung, dass die Zellen während der Aggregation fusionieren und ein Plasmodium bilden. Daher ordnete er *Dictyostelium* den Echten Schleimpilzen (*Myxomycetae*) zu [BREFELD 1869]. Einige Jahre später wurde erkannt, dass die Einzelzellen nicht fusionieren und das Aggregat folglich als Pseudoplasmodium bezeichnet werden muss [VAN TIEGHEM 1880; BREFELD 1884]. Die Zuordnung zu den Pilzen wurde revidiert, da vegetative Hyphen fehlen und *Dictyostelium* nicht saprophytisch lebt, sondern sich durch Phagozytose von Bakterien ernährt [POTTS 1902].

Später wurden die Dictyosteliden zusammen mit den plasmoidalen Schleimpilzen (*Myxogastridae*) und den Protosteliden zu den Schleimpilzen (*Mycetozoa*) zusammengefasst [OLIVE & STOIANOVITCH 1975; LOOMIS & SMITH 1995; BALDAUF & DOOLITTLE 1997]. Hier hat die auch heute noch gebräuchliche Bezeichnung „zellulärer Schleimpilz“ ihren Ursprung.

Untersuchungen von mehr als 100 Proteinen deuteten später darauf hin, dass *Dictyostelium* nach der Abspaltung der Pflanzen, aber vor der Divergenz der Metazoen und Pilze, von der Entwicklungslinie der Eukaryoten abzweigte [BALDAUF *et al.* 2000]. Die neueste Proteom-basierende Phylogenie (Abbildung 1) bestätigt diese Annahme [EICHINGER *et al.* 2005]. Aufgrund der Fähigkeit einzelner Zellen, miteinander via cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) zu kommunizieren und im Rahmen der multizellulären Entwicklung zusammenzuarbeiten (siehe Kapitel 1.1.4), werden die *Dictyosteliidae* heute als „soziale Amöben“ bezeichnet.

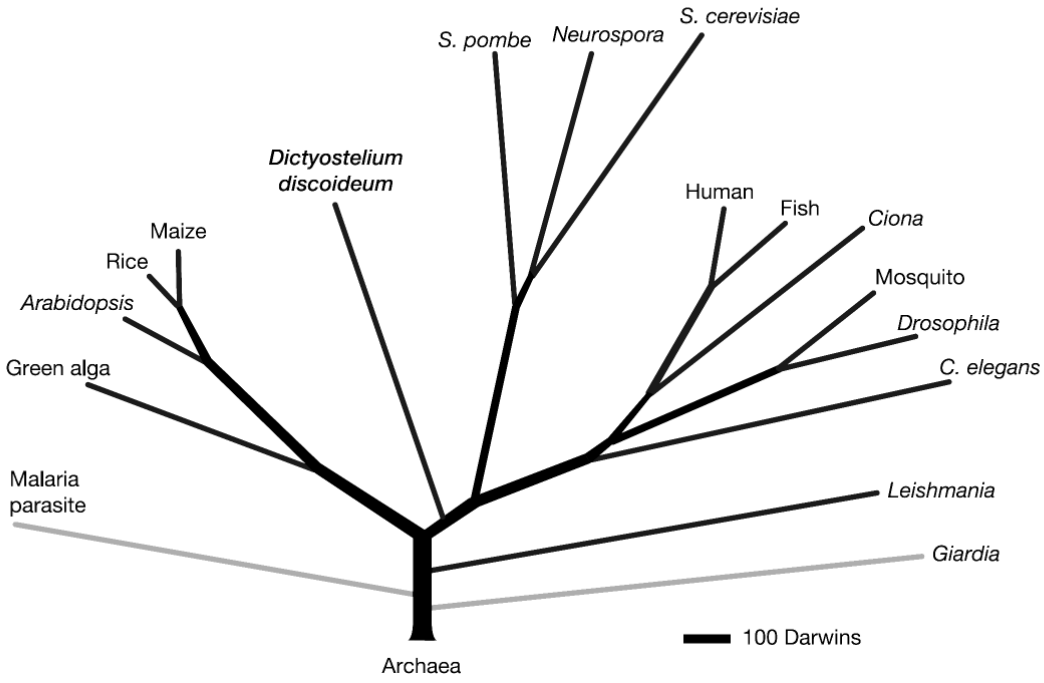



**Abbildung 1: Proteom-basierende Phylogenie der Eukaryoten.** Der Stammbaum wurde konstruiert aus 5279 orthologen Proteinclustern der 17 abgebildeten Eukaryoten und auf 159 Proteincluster aus sechs *Archaea*-Proteomen gewurzelt. Die relative Länge der Äste ist angegeben in Darwin (1 Darwin entspricht 1/2000 der Divergenz zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens*). Abbildung aus EICHINGER *et al.* 2005.

Spezies der sozialen Amöben zeigen Unterschiede in der Größe und dem Verzweigungsmuster ihrer Fruchtkörper. Außerdem können sie sich in Charakteristika der Sporen (Größe, Form), ihrem Aggregationsmuster, der *Slug*-Migration sowie der An- oder Abwesenheit alternativer Lebenszyklen wie der Microcystenbildung oder eines sexuellen Lebenszyklus unterscheiden. Traditionell werden die sozialen Amöben vorrangig nach der Morphologie ihrer Fruchtkörper eingeteilt, aber auch nach der Morphologie der Sporen. Dabei wurden drei *Genera* postuliert: *Dictyostelium* mit unverzweigten oder lateral verzweigten Fruchtkörpern, *Polysphondylium* mit sich regelmäßig wiederholenden Seitenverzweigungen und *Acytostelium*, deren Stiele sich durch einen azellulären Aufbau auszeichnen. Neuere Untersuchungen von Sequenzen der kleinen Untereinheit der rRNA

von über 100 kultivierbaren Isolaten der *Dictyosteliales* führten zur Einteilung in vier große Gruppen (Abbildung 2). Diese Einteilung konnte ebenfalls durch den Vergleich von α-Tubulin bestätigt werden [SCHAAP *et al.* 2006].

**Abbildung 2: Phylogenie der *Dictyosteliidae*.** Der Stammbaum ist entstanden durch *Bayesian inference* von 1655 Nucleotiden der 18S-rRNA. Vier große taxonomische Gruppen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Gruppe 4 ist in anderem Maßstab dargestellt und durch Analyse von 300 zusätzlichen Nucleotiden untermauert. Abbildung aus SCHAAP *et al.* 2006.

Gruppe 1 umfasst morphologisch sehr unterschiedliche *Dictyostelium*-Spezies, die sich nur in der Ausbildung kleiner Sporen ähneln. Gruppe 2 beinhaltet eine Mischung aus Vertretern aller drei ursprünglichen *Genera*. In dieser Gruppe befinden sich alle Arten von *Acytostelium*, mindestens zwei Arten von *Dictyostelium* und alle Vertreter von *Polysphondylium (*außer *P. violaceum*). Unterschiedliche *Dictyostelium*-Arten, inklusive der einzigen kannibalistischen Art *D. caveatum*, sind in Gruppe 3 zusammengefasst. Gruppe 4 stellt die größte aller Gruppen dar und besteht fast ausschließlich aus *Dictyostelium*-Arten sowie einer Minderheit von violett gefärbten Vertretern, die ursprünglich aus zwei verschiedenen *Genera* stammen (*P. violaceum*; *D. laterosorum*). Außer den beiden letztgenannten ist diese Gruppe sehr homogen. Es treten große, robuste Fruchtkörper auf. Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* ist ebenfalls der Gruppe 4 zuzuordnen. Keine der Gruppen entspricht den früheren *Genera* und von diesen ist nur *Acytostelium* monophyletisch. Diese Tatsache zeigt, dass die Morphologie der Fruchtkörper für eine taxonomische Zuordnung ungeeignet ist [SCHAAP *et al.* 2006].

Die Einteilung in die vier beschriebenen Gruppen basiert auf der Untersuchung von 18S-rRNA-Sequenzen. Da diese einer relativ langsamen Evolution unterworfen sind, konnten die einzelnen Äste innerhalb der Gruppen nicht zufriedenstellend aufgelöst werden. Als Erweiterung der Arbeiten von SCHAAP *et al.* (2006) wurden vor kurzem ITS-Sequenzen (*internal transcribed spacer*) der rDNA fast aller im Stammbaum aufgeführten Spezies untersucht. Phylogenetische Analysen dieser Daten in Kombination mit den zuvor bestimmten 18S-rRNA-Sequenzen führten zu einer nahezu vollständigen Auflösung der Äste innerhalb der großen Gruppen des Stammbaums [ROMERALO *et al.* 2010].

### 1.1.2 Organisation des Genoms

*Dictyostelium discoideum* besitzt ein haploides Genom von 34 Mb Größe, das in sechs Chromosomen aufgeteilt ist [LOOMIS *et al.* 1995; EICHINGER *et al.* 2005]. Die Chromosomengröße reicht von 3,5 bis 8,6 Millionen Basenpaaren. Das Genom ist generell sehr AT-reich und weist in Exons bis zu 73 %, in Bereichen zwischen den Genen bis zu 85 % und in Introns bis zu 88 % Adenin und Thymin auf. Ein durchschnittliches *Dictyostelium-discoideum*-Gen ist 1756 bp lang. Im Mittel werden 518 Aminosäuren kodiert. 69 % aller Gene besitzen Introns, deren Länge im Schnitt 146 bp beträgt. Dabei sind 67 % des Genoms kodierend und es gibt nur kurze intergenische Bereiche. Es treten viele einfache Sequenzwiederholungen auf, die 11 % der vorhandenen Basen ausmachen [EICHINGER *et al.* 2005].

Das Genom ist reich an transposablen Elementen [GLÖCKNER *et al.* 2001, 2002], von denen jeweils Elemente desselben Typs in Clustern vorkommen. Dabei integriert jedoch kein Transposon in spezifische Sequenzen, sondern entweder in gleichartige Elemente oder wie im Falle der Non-LTR-Retrotransposons (LTR: *long terminal repeat*) Positions-spezifisch in der Nähe von tRNA-Genen [MARSCHALEK *et al.* 1989; SZAFRANSKI *et al.* 1999]. Das Genom kodiert für 390 tRNA-Gene [EICHINGER *et al.* 2005], von denen 20 % als Paare oder Dreiergruppen (insgesamt 41 Gruppen im Genom) mit identischen Anticodons und normalerweise einhundertprozentiger Sequenzidentität auftreten. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass solche Gene durch Genduplikationen entstanden sind [EICHINGER *et al.* 2005].

Die ribosomalen RNA-Gene liegen in *Dictyostelium discoideum* auf einem 88 kb großen extrachromosomalen, palindromischen Element [SUCGANG *et al.* 2003], von dem pro Zellkern ca. 100 Kopien vorhanden sind [EICHINGER *et al.* 2005]. Vermutlich gibt es eine chromosomale Kopie, da die zentralen 3,2 kb von diesem Element auf Chromosom 4 zu finden sind [SUCGANG *et al.* 2003]. Jedes *Dictyostelium*-Chromosom besitzt ein Cluster von

DIRS-1-Retrotransposons (*Dictyostelium intermediate repeat sequence 1*) [CAPELLO *et al.* 1984, 1985] an einem Ende [LOOMIS *et al.* 1995]. Die strukturelle Konsistenz könnte darauf hinweisen, dass diese Cluster als Centromere dienen [GLÖCKNER *et al.* 2002; EICHINGER *et al.* 2005]. Die Identifikation von Centromeren ist aufgrund der großen Variabilität in Struktur und Organisation [EICHLER & SANKOFF 2003] schwierig, jedoch spricht die eingeschränkte Verteilung von DIRS-1 in *Dictyostelium* für eine funktionelle Bedeutung [EICHINGER *et al.* 2005]. Die Telomer-Struktur wird vermutlich von rDNA-ähnlichen Elementen geformt [EICHINGER *et al.* 2005].

Auf Chromosom 2 tritt in den Stämmen AX3 und AX4 eine 1,51 Mb lange Duplikation auf [KUSPA *et al.* 1992; GLÖCKNER *et al.* 2002], die 608 Gene enthält [EICHINGER *et al.* 2005]. Im Wildtyp-Isolat NC4 und auch in dessen Abkömmling AX2 ist sie nicht enthalten [KUSPA *et al.* 1992]. Diese Duplikation entstand vermutlich durch einen *Breakage-Fusion-Bridge*-Zyklus, wie er zuerst in Mais beschrieben [MCCLINTOCK 1938] und dann in vielen anderen Genomen beobachtet wurde [EICHINGER *et al.* 2005]. Da Chromosom 2 das größte der Chromosomen ist, besteht eine erhöhte Gefahr des Auseinanderbrechens [COX *et al.* 1990].

### 1.1.3 Das Proteom

Das Genom kodiert für etwa 12500 Proteine [EICHINGER *et al.* 2005]. Sein AT-Reichtum beeinflusst sowohl die Codon-Verwendung als auch die Aminosäure-Zusammensetzung der Proteine. Aminosäuren, die ausschließlich von Codons codiert werden, die an erster und zweiter Stelle jeweils ein A oder T besitzen, kommen in *Dictyostelium*-Proteinen viel häufiger vor als in menschlichen, im Gegensatz zu Codons, die an erster und zweiter Stelle je ein G oder C tragen. Es treten viele Genduplikationen auf, so dass ca. 20 % bzw. 2774 Proteine durch Duplikationen entstanden sind, wobei die meisten zweimal, einige jedoch weitaus häufiger vorhanden sind. Dafür verantwortlich sind Tandem-Duplikationen, lokale Inversionen und interchromosomale Austausche. Neben Genduplikationen treten häufig Wiederholungen von Aminosäuren auf. Am wichtigsten zu erwähnen sind Poly-Asparagin- und Poly-Glutamin-Bereiche von mehr als 20 Einheiten, die in 2091 der vorausgesagten Proteine vorkommen. Des Weiteren wurden Wiederholungen von jeweils zwei sich abwechselnden Aminosäuren mit mehr als 15 Einheiten in 2379 Proteinen nachgewiesen. Insgesamt treten solche Wiederholungen in 34 % aller Proteine auf. Proteine mit Poly-Asparagin- oder Poly-Glutamin-Bereichen sind in den Klassen der Proteinkinasen, Lipidkinasen, Transkriptionsfaktoren, RNA-Helicasen und mRNA-Binde-Proteine überrepräsentiert. Obwohl *Dictyostelium discoideum* im Vergleich zu anderen Eukaryoten weniger Transkriptionsfaktoren zu besitzen scheint, sind fast alle gängigen Familien außer den sonst ubiquitären Helix-Loop-Helix-Proteinen vertreten [EICHINGER *et al.* 2005].

### 1.1.4 Multizelluläre Entwicklung

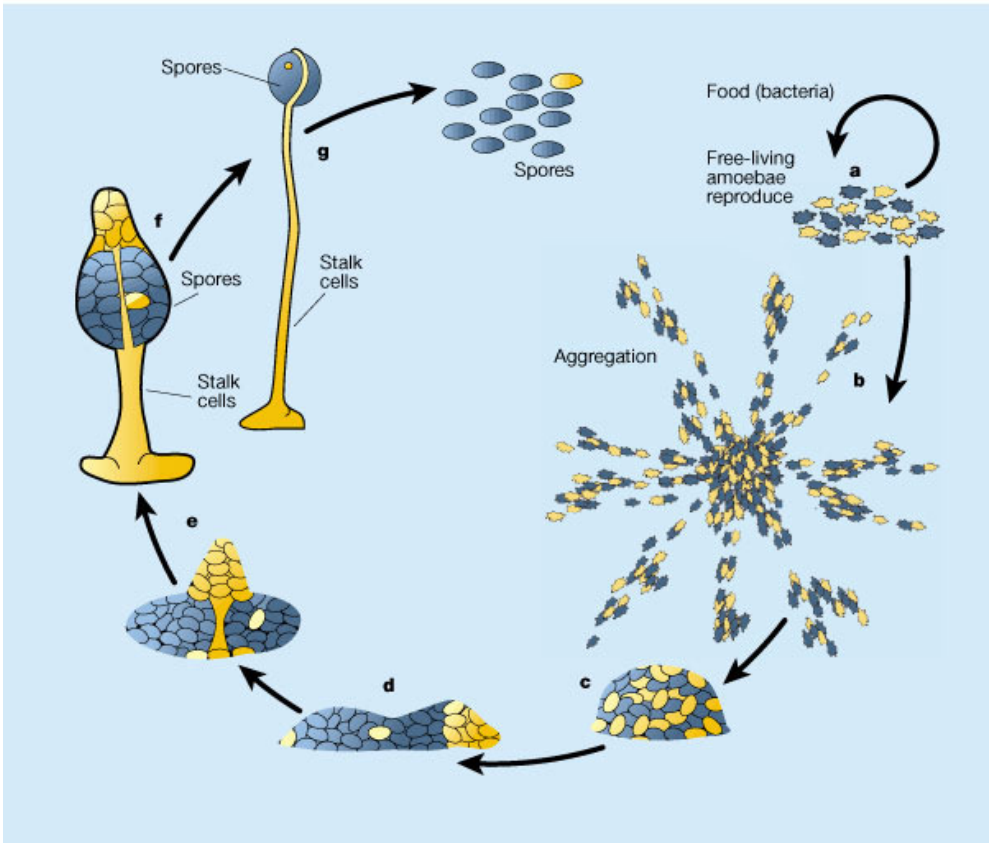
*Dictyostelium discoideum* ist ein einzelliger Organismus, der natürlicherweise im Waldboden lebt. Er ernährt sich durch Phagozytose von Bakterien und anderen Mikroorganismen [Bozzarro & Ponte 1995]. Die einzelnen Zellen sind 8 bis 12 µm groß, können sich durch Aktin- und Myosinfilamente amöboid fortbewegen und teilen sich etwa alle 3 bis 4 Stunden [ASHWORTH & WATTS 1970; ESCALANTE & VICENTE 2000].
Sind die Zellen jedoch Umweltbedingungen ausgesetzt, die ungünstig für ein vegetatives Wachstum sind, zum Beispiel einer zu hohen Zelldichte, Nahrungsmangel oder zu geringen Temperaturen, beginnen sie, miteinander mittels cAMP zu kommunizieren [FIRTEL 1995; WILLIAMS 1995]. In der Folge bewegen sie sich auf den Punkt des ersten Signals zu [FIRTEL 1995; PARENT & DEVREOTES 1996]. Diese Phase wird als *Streaming* bezeichnet (Abbildung 3). Nach etwa 10 Stunden bilden sich Aggregate von ca. 100.000 Zellen aus [PARENT & DEVREOTES 1996]. Eine komplexe extrazelluläre Matrix aus Proteinen, Cellulose und Polysacchariden umgibt die Zellen scheidenförmig, um die sich entwickelnde Struktur, die nun als *Mound* bezeichnet wird, zu schützen [FREEZE & LOOMIS 1977a,b; WILKINS & WILLIAMS 1995; ZHOU-CHOU *et al.* 1995].

Nach der Aggregation fusionieren die einzelnen Zellen jedoch im Gegensatz zu den plasmoidalen Schleimpilzen nicht zu einem Plasmodium, sondern es wird unter Aufrechterhaltung der Einzelzellen ein sogenanntes Pseudoplasmodium gebildet. In diesem differenzieren sich verschiedene Zelltypen aus [BONNER 1952; ESCALANTE & VICENTE 2000] und es entsteht eine Spitze (*Tip*), die sich verlängert und zu einer fingerförmigen Struktur (*Finger*) führt [CLOW *et al.* 2000; ESCALANTE & VICENTE 2000]. Alternativ kann es auch zur Bildung einer nacktschneckenartigen Form (*Slug*) kommen, die sich photo- und thermotaktisch bewegen kann und die Fortsetzung der Entwicklung an einer anderen, geeigneteren Stelle zulässt [SPUDICH 1987; ESCALANTE & VICENTE 2000; Kessin 2001]. Dabei bewegt sich der *Slug* anhand von Licht- oder Wärmegradienten und entgegen der Ammoniumkonzentration, da Ammonium-Ionen als Stoffwechselprodukt entstehen und damit ein Indiz für die Zelldichte sind. Im natürlichen Lebensraum orientiert sich der *Slug* gesteuert durch das einfallende Tageslicht in Richtung der oberen Schichten des Waldbodens.

Sowohl *Finger* als auch *Slug* bestehen zu 15 % aus Prästielzellen, zu 75 % aus Präsporenzellen und zu 10 % aus *anterior-like-cells* (ALC) [PARENT & DEVREOTES 1996]. Die Zelltypen können sich ineinander umwandeln, das prozentuale Verhältnis bleibt im Verlaufe der Entwicklung jedoch konstant. Zellen, die am Ende der Entwicklung den Stiel bilden werden (Präs*t*iel- oder *pst*-Zellen), befinden sich am vorderen Ende des *Fingers* bzw. *Slugs* [ESCALANTE & VICENTE 2000]. Sie bestehen im wesentlichen aus zwei Zelltypen: *pstA*-Zellen, die EcmA, ein extrazelluläres Matrixprotein, als Markergen exprimieren und sich im

vordersten Bereich befinden, sowie *pst0*-Zellen, die kein EcmA exprimieren und im hinteren Bereich der Prästiel-Region lokalisiert sind [EARLY *et al.* 1993]. Im Zentrum der Prästiel-Region kommen auch sogenannte pstAB-Zellen vor, die zusätzlich das Protein EcmB exprimieren [CECCARELLI *et al.* 1991; JERMYN & WILLIAMS 1991]. Vor kurzem wurde eine neue Gruppe von Prästielzellen entdeckt. Diese *pstU*-Zellen befinden sich weder im vorderen noch im hinteren Teil des *Slugs*. Dennoch tragen sie zur Bildung des *Upper Cups,* eines zellulären Motors, der den Sporenkopf anhebt, bei [YAMADA *et al.* 2010].

**A**




**B**

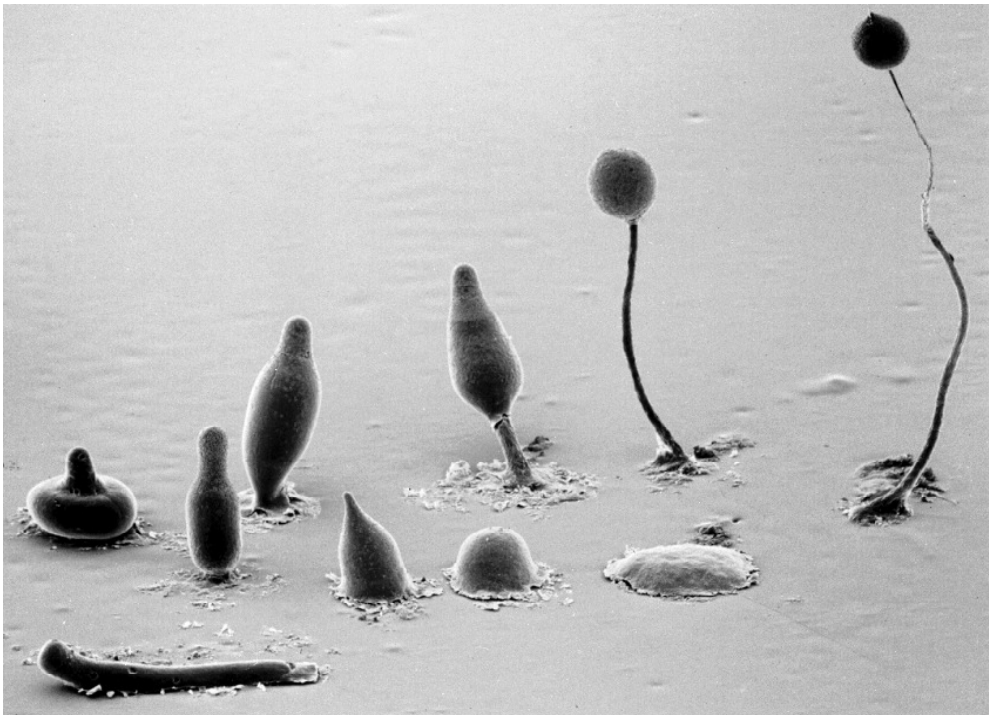


**Abbildung 3: Darstellung der multizellulären Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*. A:** Schematische Darstellung nach KESSIN 2000; **B:** Mikroskopische Aufnahmen, Copyright Grimson und Blanton, Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University.

Die *anterior-like-cells* (ALC) sind über die gesamte Struktur verteilt und exprimieren entweder EcmA, EcmB, beide Proteine oder keines von beiden [GASKELL *et al.* 1992]. Zellen, die sich zu Sporen entwickeln werden, befinden sich im hinteren Teil und exprimieren spezifische Genprodukte wie die Sporenhüllproteine, die von *cotA*, *cotB* und *cotC* kodiert werden [FOSNAUGH & LOOMIS 1989a,b, 1991]. Im weiteren Verlauf der Entwicklung durchstoßen die Prästielzellen von der Spitze aus die Struktur und dringen bis zum Substrat vor, um den Stiel auszubilden und die Präsporenzellen anzuheben. Dadurch soll eine bessere Verteilung der Sporen gewährleistet werden [ESCALANTE & VICENTE 2000]. Während der terminalen Differenzierung bilden einige ALC den oberen Abschluss des Sporenkopfes (*Upper Cup)*, während andere den *Lower Cup* bilden, der den Sporenkopf umgibt [JERMYN & WILLIAMS 1991]. Außerdem tragen die ALC zur Bildung der Basalplatte bei, die den Stiel auf dem Substrat fixiert [JERMYN *et al.* 1996]. Der fertig ausgebildete Fruchtkörper besteht zu 20 % aus vakuolisierten, abgestorbenen Stielzellen und zu 80 % aus Sporenzellen. Diese gehen unter Wasserverlust und Ausbildung einer Mukopolysaccharidkapsel in das dormante Stadium über und können bei günstigeren Umweltbedingungen erneut auskeimen und als Einzeller leben [BONNER 1947; COTTER *et al.* 1992].
Um die Kultivierung unter Laborbedingungen zu erleichtern, wurden durch Mutation entstandene Stämme ausgewählt, die axenisch in definiertem Medium wachsen können [WATTS & ASHWORTH 1970]. Der in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Stamm AX2 ist über die Zwischenstufe AX1 [SUSSMAN & SUSSMAN 1967] aus NC 4 [RAPER 1935] hervorgegangen.

### 1.1.5 Regulation der multizellulären Entwicklung

Die multizelluläre Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* ist von vielen Faktoren abhängig und wird durch komplexe genregulatorische Netzwerke gesteuert. Im Folgenden soll ein Überblick über die ablaufenden Prozesse gegeben werden (Abbildung 4).
Wenn die Umweltbedingungen für ein vegetatives Wachstum ungünstig sind, zum Beispiel bei zu hoher Zelldichte, beginnen sogenannte Schrittmacherzellen, den Botenstoff cAMP zu sezernieren [DURSTON 1974]. Außerdem kommt es zur Sekretion der *Quorum-Sensing*-Faktoren PSF (*prestarvation factor*) und CMF (*conditioned medium factor*), welche die Aggregationsfähigkeit der Zellen vermitteln [RATHI *et al.* 1991; CLARKE & GOMER 1995].

PSF induziert Gene der frühen Entwicklung, wie z. B. gp24 (DdCad-1) und Discoidin I [CLARKE *et al.* 1987; KNECHT *et al.* 1987] sowie den cAMP-Rezeptor CAR1 [SUN & DEVREOTES 1991]. CAR1 besitzt sieben Transmembrandomänen und ist auf der cytoplasmatischen Seite mit einem heterotrimeren G-Protein gekoppelt. Durch die Interaktion mit diesem können einige intrazelluläre Effektoren durch Phosphorylierung aktiviert werden, z. B. die Adenylatcyclase A (AcaA), die Guanylatcyclase und die Phosholipase C

[LOOMIS 1996; PARENT & DEVREOTES 1996]. Die extrazelluläre Akkumulation von PSF induziert zudem die Expression der Proteinkinase YakA, die den Zellzyklus unterbricht und den Translationsblock von der mRNA der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) durch indirekte Interaktion mit dem RNA-Bindeprotein PufA entfernt [SOUZA *et al.* 1998, 1999; PARIKH *et al.* 2010]. Der Zellzyklus wird gestoppt. Die Zellteilung hört abrupt auf, ebenso die Expression vieler Gene, die für das Wachstum essentiell sind [SINGLETON *et al.* 1988; FIRTEL 1991].

CMF wird im Gegensatz zu PSF nicht von vegetativen Zellen gebildet, sondern unmittelbar, nachdem die Zellen zu hungern beginnen [JAIN *et al.* 1992; YUEN *et al.* 1995]. Dieses Protein moduliert die Signaltransduktion vom cAMP-Rezeptor CAR1 zur aggregationsspezifischen Adenylatcyclase AcaA. Wenn die CMF-Konzentration gering ist, kann die Liganden-induzierte Aktivierung von CAR1 selbst bei hoher cAMP-Konzentration nicht an AcaA weitergegeben werden [BRAZILL *et al.* 1997, 1998].

Das *acaA*-Gen, welches die aggregationsspezifische AcaA kodiert, wird sehr schnell induziert, wenn die Zelle anfängt, auf cAMP-Signale zu reagieren [PITT *et al.* 1992]. Für die Aktivierung von AcaA werden u.a. der G$\beta\gamma$-Komplex des heterotrimeren G-Proteins, der cytosolische Regulator der AcaA namens CRAC [LILLY & DEVREOTES 1994], der Faktor *Pianissimo* [CHEN *et al.* 1997] und Komponenten des Ras-Signalweges benötigt [LOOMIS 1996; PARENT & DEVREOTES 1996; AUBRY & FIRTEL 1999]. Wenn cAMP an CAR1 bindet, wird das GDP im trimeren G-Protein durch GTP ersetzt und das trimere G-Protein dissoziiert in eine $\alpha$- und eine $\beta\gamma$-Untereinheit [SNAAR-JAGALSKA *et al.* 1988; JOHNSON *et al.* 1992]. Die $\beta\gamma$-Untereinheit bindet an das Adaptorprotein CRAC, welches die AcaA durch einen Prozess aktiviert, der von der MAP-Kinase ERK 2 abhängig ist [LILLY & DEVREOTES 1994; SEGALL *et al.* 1995]. Dieser Prozess wird vom Faktor *Pianissimo* beeinflusst, dessen genaue Funktion jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte.

Nach Bindung von cAMP an den Rezeptor CAR1 wird dieser phosphoryliert und seine Affinität für cAMP sinkt stark ab. Erst, wenn cAMP im Umfeld durch eine Phosphodiesterase abgebaut wird, ist die Zelle wieder sensibilisiert und kann erneut aktiviert werden. Dieser Zyklus dauert ca. 5-6 Minuten und erklärt die pulsatile Sekretion von cAMP [VAUGHAN & DEVREOTES 1988; DEVREOTES 1994]. Extrazelluläres cAMP wird vom Produkt von *pdsA*, einer cAMP-spezifischen Phosphodiesterase, abgebaut. Deren Expression steigt stark an, wenn die Entwicklung initiiert wird [MALCHOW *et al.* 1972; FAURE *et al.* 1990]. Dabei wird *pdsA* von einem spezifischen Inhibitor (PDI) kontrolliert, dessen Expression als Antwort auf cAMP reguliert wird [FRANKE & KESSIN 1981; FRANKE *et al.* 1991]. Die oszillatorische Perzeption und Sekretion von cAMP führt zum sternförmigen Einströmen der Zellen in

Aggregationszentren, da die einzelnen Zellen sich auf höhere cAMP-Konzentrationen zu bewegen und selbst cAMP an der dem Signal abgewandten Seite sezernieren [LOOMIS 1996; AUBRY & FIRTEL 1999].

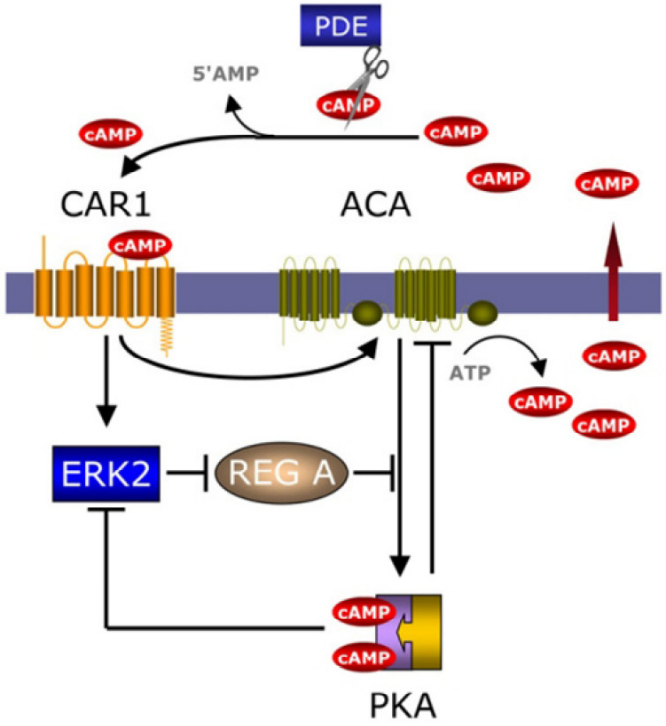



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von Proteinkinase A zur Initiation der multizellulären Entwicklung.** Beschreibung siehe Text (Kapitel 1.1.5); cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; CAR1: cAMP-Rezeptor 1; ACA: Adenylatcyclase A; PDE: extrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase; ERK2: *extracellular signal related kinase* 2 (MAP-Kinase); REGA: intrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase; PKA: Proteinkinase A. Abbildung aus LUCAS 2009.

Die Proteinkinase A ist ein wichtiger Regulator in allen Stadien der Entwicklung [FIRTEL & CHAPMAN 1990; SCHULKES & SCHAAP 1995; MANN *et al.* 1997; PRIMPKE *et al.* 2000]. Ihre Aktivierung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Die PKA ist ein heterodimeres Protein, das aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit besteht [DE GUNZBURG & VERON 1982, DE GUNZBURG *et al.* 1984; LEICHTLING *et al.* 1984; MAJERFELD *et al.* 1984]. Von der Adenylatcyclase A erzeugtes, cytoplasmatisches cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der PKA, die daraufhin die katalytische Untereinheit freigibt [VERON *et al.* 1988]. Diese phosphoryliert nicht genauer definierte Substrate, wodurch eine Änderung der Genexpression hervorgerufen wird. Eine neue Komponente des PKA-Netzwerkes konnte vor kurzem identifiziert werden. Vermutlich handelt es sich bei dem Protein BzpF um ein CREB-Homolog (*cAMP-response element binding protein*) [PARIKH *et al.* 2010]. CREB ist ein Transkriptionsfaktor mit basischem Leucin-Zipper-Motiv, der in den meisten Eukaryoten die Schaltstelle zwischen cAMP-Signalen und Genexpression darstellt [MAYR & MONTMINY 2001]. Intrazelluläres cAMP wird von der Phosphodiesterase RegA abgebaut [SHAULSKY *et al.* 1998]. *pkaC*-Null-Mutanten können keine AcaA induzieren und daher die Rückkopplungs-

Schleife nicht aktivieren, die für die Expression entwicklungsrelevanter Gene notwendig ist [MANN & FIRTEL 1991].

Etwa vier Stunden nach Initiation der Entwicklung wird *csaA* exprimiert. Dessen Produkt, das Zell-Zell-Adhäsionsprotein gp80, akkumuliert [NOEGEL *et al.* 1986; WONG & SIU 1986] und übernimmt die Funktion von gp24 [SIU *et al.* 2004]. Gp80 wird in die Plasmamembran eingebaut, wo es eine EDTA-resistente Adhäsion vermittelt [GERISCH 1961; STADLER *et al.* 1989]. Zellen, die kein gp80 exprimieren, sind untereinander nicht ausreichend adhäsiv, um ausgewachsene *Slugs* zu bilden. Die Aggregationsströme reißen ab und es bilden sich mehrere kleine *Slugs* [Roisin-Bouffay *et al.* 2000], da die Zell-Substrat-Adhäsion erhöht und die Zellmotilität verringert ist [PONTE *et al.* 1998]. Eine Überexpression von gp80 beeinflusst die Morphogenese [FAIX *et al.* 1992] und führt zur Ausbildung größerer *Slugs* und größerer Fruchtkörper. Dies deutet auf eine Rolle von gp80 bei der Regulation der Aggregatstabilität und -größe hin [KAMBOJ *et al.* 1990; ROISIN-BOUFFAY *et al.* 2000]. Bei Überexpression von gp80 tritt zudem eine Verzögerung der Kulmination auf. Der Grund dafür ist vermutlich ein Anstieg der Zellkohäsion, der die Zellmotilität unterdrückt und damit den Zellsortierungsprozess behindert [SIU *et al.* 2004].

Durch die Aktivierung vieler Genprodukte, die an Bildung, Aufnahme und Weitergabe der periodischen cAMP-Wellen beteiligt sind, wie z. B. AcaA, CAR1, PKA, PdsA und RegA, etabliert sich eine positive Rückkopplungs-Schleife [KIMMEL & FIRTEL 1991; MAEDA *et al.* 2004]. Sechs Stunden nach Beginn der Entwicklung haben die meisten Zellen ein Maximum der Expression von Puls-induzierten Genen erreicht. Sie verstärken das Signal, bewegen sich in Richtung der Signalquelle und bilden *Mounds*. In diesen *Mounds* erhöht sich das cAMP-Level signifikant und ist nicht mehr pulsatil [KIMMEL & FIRTEL 1991]. Damit ist die Phase der Aggregation abgeschlossen.

Es schließt sich die Postaggregationsphase an, die zur Ausbildung der Hauptzelltypen, Präsporenzellen und Prästielzellen, führt. Die Expression der meisten frühen Entwicklungsgene lässt stark nach. CAR1 wird jedoch durch zwei verschiedene Promotoren und alternatives Spleißen nicht nur durch cAMP-Pulse, sondern auch durch konstante cAMP-Level aktiviert, wenn auch in geringerem Ausmaß [LOUIS *et al.* 1993]. Außerdem werden in der Postaggregationsphase der Transkriptionsfaktor GBF (*G-Box binding factor*) [HJORTH *et al.* 1989, 1990; SCHNITZLER *et al.* 1994] und die Cystein-Protease CP2, die vom Gen *cprB* kodiert wird, exprimiert [PEARS *et al.* 1985]. GBF induziert viele Prästiel- und Präsporen-Gene im *Mound*, wie z. B. *lagC*, das für das Adhäsionsprotein gp150 kodiert [DYNES *et al.* 1994; IRANFAR *et al.* 2006]. LagC (gp150) ist notwendig zur Bildung der extrazellulären Matrix, welche die *Mounds* umgibt und verfestigt, sowie zur Expression von

zelltypspezifischen Genen wie *ecmA* und *cotC* [DYNES *et al.* 1994]. Die Morphogenese wird somit koordiniert durch die Sekretion von verschiedenen Faktoren, die Zelladhäsion, -migration und -differenzierung regulieren. Neben cAMP spielt hierbei auch das chlorierte Alkylphenon DIF-1 (*differentiation inducing factor*) eine wichtige Rolle, besonders bei der Stielzelldifferenzierung [BERKS & KAY 1990]. Weitere Zellsignalfaktoren sind Peptide oder kleine Proteine, die von einigen Zellen sezerniert werden, um die Aktivität benachbarter Zellen zu regulieren, wie z. B. Countin und AmpA [ROISIN-BOUFFAY *et al.* 2000; VARNEY *et al.* 2002]. Zwei sezernierte Peptide namens SDF-1 und SDF-2 (*spore differentiation factor*) induzieren die Differenzierung der Sporen während der Kulmination [ANJARD & LOOMIS 2005], die die terminale Phase der Entwicklung darstellt.

Der in dieser Arbeit beschriebene Transkriptionsfaktor CbfA greift ebenfalls entscheidend in die Regulation der multizellulären Entwicklung ein, indem er an den Promotor des *acaA*-Gens binden und diesen aktivieren kann [WINCKLER *et al.* 2001, 2004; SIOL *et al.* 2006a]. Zellen, die CbfA konstitutiv nur zu etwa 5 % des Wildtyp-Levels exprimieren (Stamm JH.D), sind nicht in der Lage zu aggregieren und Fruchtkörper zu bilden. Sie zeigen zwar eine Antwort auf die Hungersituation und exprimieren Discoidin, eine Induktion der AcaA bleibt jedoch aus. Künstliche cAMP-Pulse bzw. die Zugabe einer geringen Menge von Wildtyp-Zellen führen in JH.D zur Induzierung der frühen Entwicklungsgene einschließlich *acaA*. Dies weist darauf hin, dass die Blockade in der Entwicklung nach Erkennung der Hungersituation, aber vor der Etablierung der positiven cAMP-Rückkopplungs-Schleife auftritt [WINCKLER *et al.* 2004].

## 1.2 Transposons (mobile genetische Elemente)

Mobile genetische Elemente (*transposable element*, TE) wurden erstmalig in den 1940er Jahren von Barbara McClintock in *Zea mays* beschrieben [MCCLINTOCK 1948]. Sie stellen genetische Einheiten dar, auch als molekulare Parasiten bezeichnet, die sich innerhalb des Genoms von einem Ort zum anderen bewegen können und in nahezu jedem Organismus vorkommen. Sie beeinflussen den Wirtsorganismus durch Expansion der Genomgröße und -komplexität, Umorganisation der genomischen DNA, Einführen von Mutationen in Wirtsgene oder die Änderung des Transkriptionslevels nahe gelegener Gene [MORAN *et al.* 1999; Kazazian & Goodier 2002; DEININGER *et al.* 2003]. Die Auswirkungen auf den Wirt können sowohl positiver als auch negativer Natur sein. So kann eine Umorganisation der genomischen DNA bereits vorhandenen Genen neue Exons hinzufügen oder neue Gene schaffen [MILLER *et al.* 1999; MORAN *et al.* 1999; SMIT 1999]. Andererseits kann eine Rekombination zwischen homologen TEs an weit voneinander entfernten Stellen im Genom auftreten [EICKBUSH & FURANO 2002], deren Folge eine Deletion der dazwischen liegenden

DNA-Sequenzen ist. Um negative Auswirkungen der Transposition zu vermeiden, muss die Amplifikation der TEs vom Wirt kontrolliert werden. Meistens ist eine positive Korrelation zwischen Genomgröße und Anteil der mobilen genetischen Elemente zu beobachten [BOEKE & DEVINE 1998]. So kodieren zum Beispiel beim Menschen nur 1,1 % der Sequenzen für Exons, während 45 % von Transposons stammen [LANDER *et al.* 2001; VENTER *et al.* 2001], wohingegen bei *Saccharomyces cerevisiae* 71 % für Exons kodieren, eine Expansion der TEs jedoch nur bis zu etwa 3 % toleriert wird [KIM *et al.* 1998].

## 1.3 Transposons in *Dictyostelium discoideum*

Die Besiedlung kompakter Genome stellt eine große Herausforderung für mobile genetische Elemente dar [WINCKLER *et al.* 2005]. Im 34 Mb großen und zu 67 % kodierenden Genom von *Dictyostelium discoideum* konnten sich Transposons trotzdem soweit ausbreiten, dass sie zu etwa 10 % am gesamten Genom beteiligt sind [GLÖCKNER *et al.* 2001]. Zur Vermeidung der Integration in essentielle Wirtsgene, die ein Überleben für Wirt und Transposon unmöglich machen würde, gibt es zwei verschiedene Mechanismen. Entweder erfolgt eine spezifische Integration in flankierende Bereiche von tRNA-Genen und damit ein verteiltes Vorkommen über das gesamte Genom, oder es kommt zur Integration in bereits vorhandene Transposons und damit zu einer Bildung von Transposon-Clustern in bestimmten Bereichen der Chromosomen, z. B. an den Centromeren.

### 1.3.1 Nomenklatur und Einteilung

Transposons werden aufgrund ihres strukturellen Aufbaus und ihres Transpositions-Mechanismus in zwei Gruppen unterteilt: DNA-Transposons (Klasse-II-Transposons) und Retrotransposons (Klasse-I-Transposons) [CRAIG *et al.* 2002].

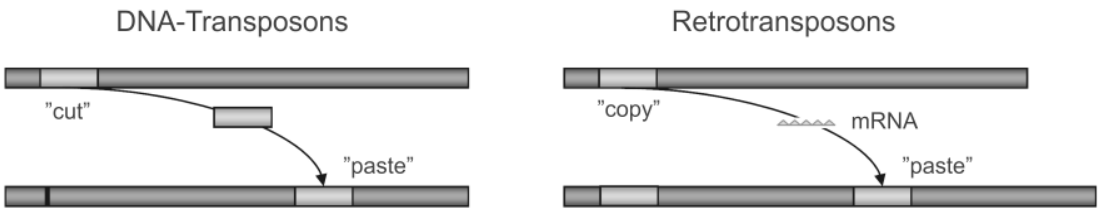



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Transpositionsmechanismen von DNA-Transposons (links) und Retrotransposons (rechts).** Beschreibung siehe Text; Abbildung aus CHUNG 2007.

DNA-Transposons transponieren nach einem Exzisions-Integrations-Mechanismus (*cut and paste*), d. h. die DNA wird an einer Stelle des Genoms ausgeschnitten und an anderer Stelle integriert, sodass die Genomgröße konstant bleibt (Abbildung 5). Eine Vermehrung von Transposons kann ausschließlich in der Phase der Zellteilung auftreten, wenn es zur

Transposition des mobilen Elementes von einer Schwesternchromatide auf die andere kommt. Katalysiert wird dieser Vorgang durch eine Transposase.
Retrotransposons hingegen werden mittels eines Kopier-Integrations-Mechanismus (*copy and paste*) über eine intermediäre mRNA transponiert, die von einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und an anderer Stelle ins Genom integriert wird. Dabei vergrößert sich das Genom mit jedem Transpositionsvorgang.
Retrotransposons werden aufgrund ihrer Struktur in LTR- und Non-LTR-Retrotransposons eingeteilt (LTR: *long terminal repeat*). Einen Überblick über alle in *Dictyostelium discoideum* vorkommenden mobilen genetischen Elemente bietet Abbildung 6.

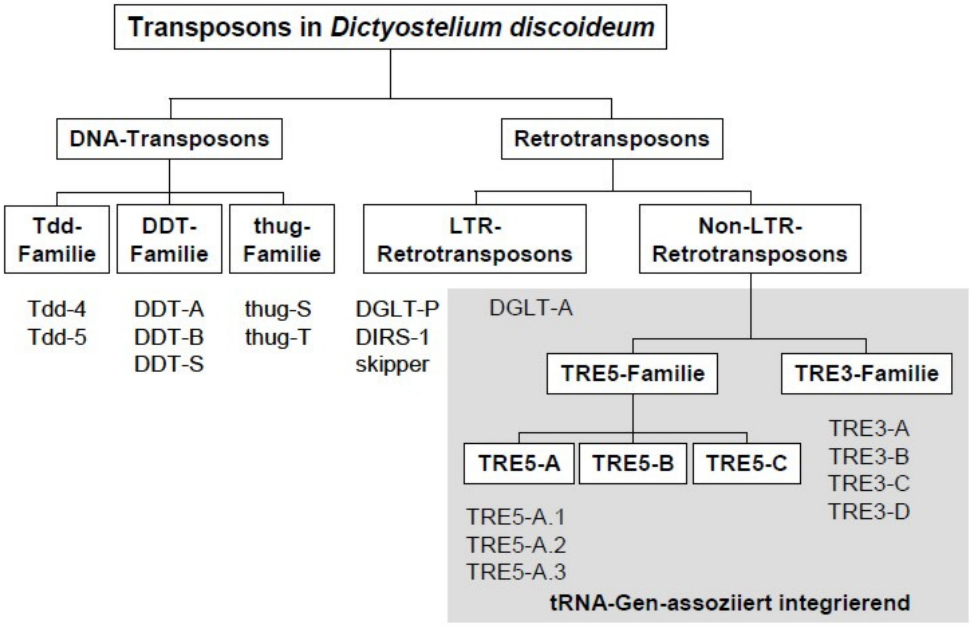



**Abbildung 6: Übersicht aller Transposons in *Dictyostelium discoideum*.** Abbildung verändert nach BECK 2002.

Da das in dieser Arbeit untersuchte TRE5-A zu den Non-LTR-Retrotransposons gehört, wird diese Familie im Folgenden ausführlicher vorgestellt.

### 1.3.2 Non LTR-Retrotransposons

In *Dictyostelium discoideum* existiert eine Familie phylogenetisch verwandter Non-LTR-Retrotransposons (siehe Abbildung 6), von denen drei vor und vier nach tRNA-Genen integrieren. Sie werden als TREs (*tRNA gene-targeted retrotransposable elements*) bezeichnet und machen ein Drittel der transposablen Elemente bzw. 3,7 % des Genoms aus [WINCKLER *et al.* 2002, 2005]. Dabei integrieren TRE5 *upstream* bzw. in 5´-Position von tRNA-Genen, TRE3 integrieren *downstream* bzw. in 3´-Position von tRNA-Genen (Abbildung 7). Beide verursachen Zielsequenzverdopplungen von 12 bis 16 bp [MARSCHALEK

*et al*. 1993; SCHUMANN *et al.* 1994]. tRNA-Gene können sowohl *upstream* als auch *downstream* mehrere Male als Integrationsziel angesteuert werden. Dabei integrieren aber weder TRE5 noch TRE3 in bereits vorhandene TREs. TRE-Tandems sind entsprechend der Verteilung von tRNA-Genen in allen Chromosomen zu finden [WINCKLER *et al.* 2002, 2005]. Phylogenetische Analysen unterstützen die Theorie, dass alle TREs von einem einzigen Vorgänger mit unbekannter Integrationspräferenz abstammen, der nur einmal in das Genom eindrang [GLÖCKNER *et al.* 2001]. TREs haben keine Präferenz für bestimmte tRNA-Gene [WINCKLER *et al.* 2005]. Von den vorhandenen 390 tRNA-Genen [EICHINGER *et al.* 2005] sind jedoch nur ca. 54 % mit einem oder mehreren TREs assoziiert. Der Grund dafür ist vermutlich die Einstellung eines evolutionären Gleichgewichts zwischen Genomexpansion und Genomstabilität, das maximale Fitness des Wirts und maximale Amplifikation der TREs ermöglicht [WINCKLER *et al.* 2005].

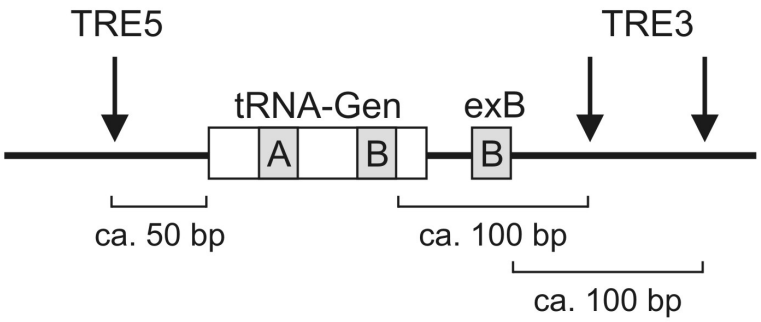



**Abbildung 7: Darstellung der Integrationsorte tRNA-Gen-assoziierter Retrotransposons.** Abbildung modifiziert nach WINCKLER *et al.* 2005. Abkürzungen: A: A-Box; B: B-Box; exB: externe B-Box; bp: Basenpaare.

### 1.3.2.1 TRE5-A

Vom Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A existieren drei Subtypen. TRE5-A.1 (früher als DRE bezeichnet) ist das erste in *Dictyostelium discoideum* entdeckte Retrotransposon mit Präferenz für die Integration in der Nähe von tRNA-Genen [MARSCHALEK *et al.* 1989] und stellt gleichzeitig das am besten untersuchte Mitglied der TREs dar. TRE5-A.1 weist eine Größe von 5,7 kb auf [MARSCHALEK *et al.* 1992a,b]. Es besitzt zwei offene Leserahmen (ORF, *Open Reading Frame*), die sich um 22 bp überlappen (siehe Abbildung 8). ORF1 kodiert für ein Protein mit einer Molekülmasse von 51 kDa, das vermutlich über Protein-Protein-Interaktionen mit Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIIIB die Positions-spezifische Integration steuert [SIOL *et al.* 2006b; CHUNG *et al.* 2007]. ORF2 kodiert für eine Reverse Transkriptase, eine Endonuclease und eine Histidin-und-Cystein-reiche Domäne [FENG *et al.* 1996; WINCKLER 1998; MALIK *et al.* 1999; YANG *et al.* 1999]. Da TRE5-A.1 für beide ORFs kodiert, wird es als autonom bezeichnet.

Das Element wird in beide Richtungen transkribiert, so dass Plus-Strang- und Minus-Strang-RNA gebildet werden. Als interner Promotor für die Synthese der Plus-Strang-RNA fungiert das A-Modul, das zusammen mit einem B-Modul auf der 5´-Seite von ORF1 lokalisiert ist [SCHUMANN *et al.* 1994]. Im B-Modul befindet sich der Transkriptionsstart von ORF1 [MARSCHALEK *et al.* 1992a]. Auf der 3´-Seite schließen sich ein weiteres B-Modul und das als Promotor für die Bildung der Minus-Strang-RNA verantwortliche C-Modul an [SCHUMANN *et al.* 1994]. Die Regionen aus A-, B- und C-Modul werden als UTRs (*untranslated regions*) bezeichnet (Abbildung 8).

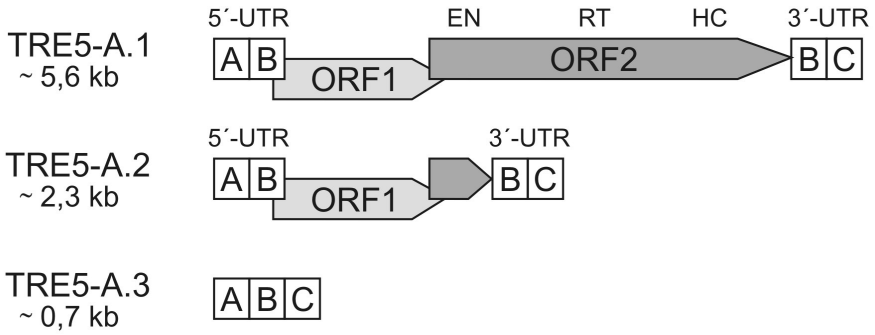



**Abbildung 8: Aufbau von TRE5-A Retrotransposons.** Dargestellt sind alle drei Subtypen; Abkürzungen: UTR: *untranslated region* (untranslatierte Region); ORF1 bzw. 2: *open reading frame* 1 bzw. 2 (Offener Leserahmen), EN: Endonuclease; RT: Reverse Transkriptase; HC: Histidin-und-Cystein-reiche Domäne; A: A-Modul; B: B-Modul; C: C-Modul.

TRE5-A.2 ist strukturell ähnlich wie TRE5-A.1 aufgebaut. Es weist jedoch eine große Deletion im Bereich des ORF2 auf, ist daher nicht autonom und kann ausschließlich durch die in TRE5-A.1 kodierten Proteine mobilisiert werden. Es besitzt eine Größe von ca. 2,6 kb (Abbildung 8). Zusätzlich zur ORF2-Deletion liegen mehrere kleinere Deletionen und Punktmutationen vor, die in allen genomischen Kopien identisch sind [MARSCHALEK *et al.* 1992b]. Diese Tatsache weist darauf hin, dass TRE5-A.2-Elemente noch Aktivität zeigen, obwohl sie nicht autonom sind. Diese *trans*-Mobilisierung wurde auch experimentell gezeigt [BECK *et al.* 2002; SIOL *et al.* 2006b].

TRE5-A.3 besteht ausschließlich aus je einem A-, B- und C-Modul und weist vermutlich keine Retrotranspositionsaktivität mehr auf [MARSCHALEK *et al.* 1993; WINCKLER *et al.* 2002].

### 1.3.2.2 Positions-spezifische Integration von TRE5-A

Alle *Dictyostelium-discoideum*-TREs integrieren innerhalb eines Fensters von ca. 50 bp oberhalb bis 100 bp unterhalb von tRNA-Genen [WINCKLER *et al.* 2005]. TRE5-As integrieren mit einem Abstand von 44 bis 54 bp oberhalb von tRNA-Genen, 33 von 35 untersuchten sogar mit einem Abstand von 48 +/- 2 bp [BECK *et al.* 2002].

Die Integration in der Nähe von tRNA-Genen bietet folgende Vorteile: Erstens handelt es sich bei den tRNA-Genen um eine Multi-Gen-Familie, die viele potentielle Integrationsziele bereithält. Zweitens kommen tRNA-Gene weit verteilt im Wirtsgenom vor und erlauben daher eine Verbreitung der Transposons über alle Chromosomen. Drittens scheint die tRNA-Gen-Expression durch RNA-Polymerase III mit der Expression von Protein-kodierenden Genen zu interferieren. So wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass es in der Nähe von tRNA-Genen ein sicheres Gen-freies Fenster von ca. 800 bp Länge gibt [BOLTON & BOEKE 2003]. Integrationen in diesem Bereich minimieren folglich das Risiko der Insertionsmutagenese.

In *Saccharomyces cerevisiae* kommen ebenfalls Retrotransposons mit einer Präferenz für die Integration in der Nähe von tRNA-Genen vor. Ty1 integriert in der Nähe von RNA-Polymerase-III-transkribierten Genen durch Interaktion des Prä-Integrationskomplexes mit Proteinen, die von einer einzigartigen Chromatinstruktur in der Nähe der tRNA-Gene exponiert werden [VOYTAS & BOEKE 1993; CURCIO & MORSE 1996; BOEKE & DEVINE 1998]. Ty3 zielt sehr genau auf den Transkriptionsstart von tRNA-Genen [CHALKER & SANDMEYER 1992; KIRCHNER *et al.* 1995]. Dabei wurde *in vitro* eine direkte Interaktion des Prä-Integrationskomplexes mit Transkriptionsfaktoren beobachtet, die an RNA-Polymerase-III-transkribierte Gene gebunden sind. Die Aufklärung dieses Transpositionsmechanismus lieferte eine Idee zum Verständnis des Ablaufes beim Retrotransposon TRE5-A.

In Abbildung 9 ist die Transkriptionsinitiation an einem tRNA-Gen, das ebenfalls von der RNA-Polymerase III transkribiert wird, schematisch dargestellt.

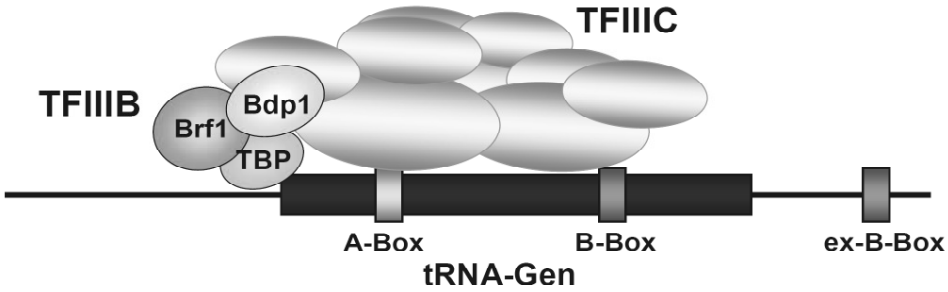



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Transkriptionsinitiation an einem tRNA-Gen.** Erläuterungen siehe Text; Abkürzungen: TFIIIB: Transkriptionsfaktor IIIB; TFIIIC: Transkriptionsfaktor IIIC; TBP: *TATA-box binding protein*; Brf1: *TFIIB-related factor 1*; Bdp: *B double prime*; ex-B-Box: externe B-Box. Abbildung aus SIOL 2006.

Nachdem der Transkriptionsfaktor TFIIIC an die interne B-Box des tRNA-Gens gebunden hat, rekrutiert er TFIIIB. Dieser bleibt während der gesamten Transkription und eventuell noch danach gebunden und verdeckt so die DNA bis ca. 50 bp *upstream* des Transkriptionsstarts. An dieser Stelle integriert nun TRE5-A [BECK *et al.* 2002]. Die Positions-spezifische Integration kommt vermutlich durch Interaktion des TRE5-A-kodierten ORF1-

Proteins mit den Untereinheiten TBP, Brf-1 und Bdp des Transkriptionsfaktors TFIIIB zustande [CHUNG *et al.* 2007]. Es konnte gezeigt werden, dass die interne B-Box allein zur Bestimmung des Integrationsziels ausreicht [SIOL *et al.* 2006b]. Die externe B-Box stellt die Funktion eines mutierten tRNA-Gens hingegen nur zu einem geringen Anteil wieder her.

## 1.4 Der C-Modul-bindende Faktor A

Im Rahmen der Forschung zur Funktion des Retrotransposons TRE5-A wurde eine Promotoraktivität für die Synthese von Minus-Strang-RNA in dessen C-Modul festgestellt [SCHUMANN *et al.* 1994]. Bei der Suche nach möglichen Regulatoren der C-Modul-Aktivität wurde ein Protein entdeckt, das als CMBF (C-Modul-bindender Faktor) bezeichnet wurde [GEIER *et al.* 1996]. Um Verwechslungen mit dem *conditioned medium factor* (CMF) zu verhindern und sich der allgemein gebräuchlichen Nomenklatur für Genbezeichnungen anzupassen, wurde die Bezeichnung später in CbfA (*C-module binding factor A*) geändert [WINCKLER *et al.* 2004]. CbfA konnte als monomeres Protein mit einer Molekülmasse von 115 kDa aufgereinigt werden [GEIER *et al.* 1996]. Es wurden zwei CbfA-Bindestellen im C-Modul von TRE5-A identifiziert, die sich durch nahezu homopolymere poly(dT)-Stretche auszeichnen [GEIER *et al.* 1996]. Nach Kompetitionsversuchen mit Distamycin, welches in der kleinen Furche AT-reicher DNA bindet [WEMMER & DERVAN 1997], wurde postuliert, dass CbfA weniger die Sequenz als vielmehr eine bestimmte, durch den hohen AT-Anteil und die homopolymeren poly(dT)-Stretche verursachte, Konformation seiner Ziel-DNA erkennt [HORN *et al.* 1999]. Dieses spezifische Bindungsverhalten von Proteinen ist von großer Bedeutung vor allem in AT-reicher DNA, deren Konformation sich von der zufälliger Sequenzen, z. B. durch eine engere kleine Furche, unterscheidet [NELSON *et al.* 1987; TRAVERS 1989].

Im CbfA-Suppressionsstamm JH.D tritt ein Entwicklungsdefekt auf. Nach einem gegenüber AX2 um etwa 24 Stunden verzögerten Entwicklungsbeginn bildet JH.D nur sehr kleine Fruchtkörper mit sehr dünnen Stielen und kleinen Sporenköpfen aus. Von diesen Beobachtungen leitete sich die These ab, dass es sich bei CbfA um einen Transkriptionsfaktor handelt, der für die Expression von Genen während Wachstum, Aggregation und Entwicklung der Zellen verantwortlich ist [WINCKLER *et al.* 2001]. Später konnte gezeigt werden, dass CbfA in der Lage ist, *in vitro* an den Promotor der aggregationsspezifischen Adenylatcyclase A zu binden, und diesen zu aktivieren. Damit spielt CbfA möglicherweise eine wichtige Rolle für die multizelluläre Entwicklung. Vermutlich vermittelt CbfA eine basale Transkriptionskompetenz von AcaA, während für die vollständige Induktion wahrscheinlich ein zweiter Faktor (evtl. Myb2) erforderlich ist [OTSUKA & VAN HAASTERT 1998]. Da bislang keine direkte Bindung von Myb2 an den *aca*A-Promotor nachgewiesen wurde [OTSUKA & VAN HAASTERT 1998], ist es denkbar, dass die Induktion von

AcaA durch einen bislang unbekannten, von Myb2 abhängigen Faktor, erfolgt oder die Bindestelle in einem anderen Bereich liegt [SIOL *et al.* 2006a].

Neben dieser Bedeutung für die multizelluläre Entwicklung kommt CbfA vermutlich eine weitere wichtige Aufgabe zu. Im CbfA-defizienten Stamm JH.D wurde eine Reduktion der Transkriptmenge des Retrotransposons TRE5-A beobachtet [BECK 2002]. Nach Expression von CbfA-Fragmenten unterschiedlicher Länge in JH.D zeigte sich im *Northern Blot* eine erhöhte Transkriptmenge von TRE5-A [BECK 2002]. Ob diese allerdings mit einer gesteigerten Retrotranspositionsfrequenz einhergeht, und wie bzw. ob CbfA direkt in die Regulation der Retrotransposition eingreift, konnte bislang nicht zufriedenstellend geklärt werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei CbfA vermutlich um einen Wirtsfaktor handelt, der für die Regulation der Retrotranspositionsfrequenz unerlässlich ist [WINCKLER, nicht publizierte Ergebnisse].

### 1.4.1 Struktur des CbfA-Proteins und des kodierenden *cbf*A-Gens

Das *cbfA*-Gen (DDB_G0279409; GenBank-Eintrag AF052006.2) befindet sich an der Position 2.308.619 bis 2.312.032 von Chromosom 3. Der kodierende Bereich hat eine Länge von 3003 bp und wird von einem 410 bp langen Intron unterbrochen. Das Intron beginnt an Position 181, nach dem für Aminosäure 60 kodierenden Basentriplett.

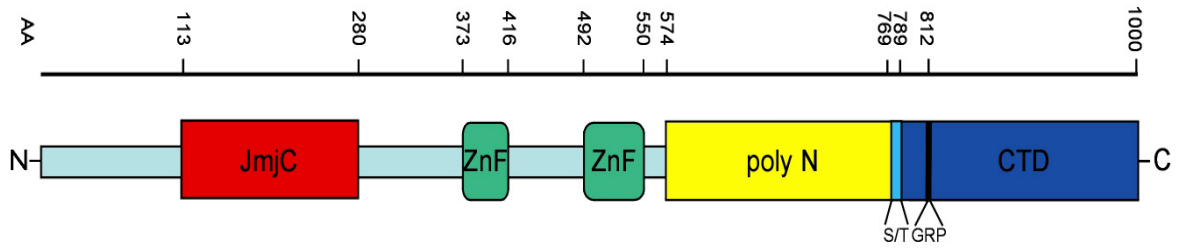



**Abbildung 10: Darstellung der Domänenstruktur des CbfA-Proteins.** Abkürzungen: JmjC: Jumonji-C-Domäne; ZnF: Zinkfinger; poly N: Poly-Asparagin-Domäne; S/T: Serin-Threonin-reiche Domäne; GRP: Glycin-Arginin-Prolin (AT-Haken); CTD: C-terminale Domäne; N: Amino-Terminus; C: Carboxy-Terminus. Abbildung verändert nach LUCAS 2009.

Das CbfA-Protein ist 1000 Aminosäuren lang und besitzt mehrere charakteristische Domänen (Abbildung 10), die sich von der Aminosäurensequenz ableiten lassen. Von N-terminal nach C-terminal betrachtet sind dies eine Jumonji-Domäne, zwei Zinkfinger-Motive, eine Poly-Asparagin-reiche Domäne sowie ein Serin- und Threonin-reicher Abschnitt und ein AT-Haken im Bereich der C-terminalen Domäne.

Jumonji-Domäne

Die Jumonji-Domäne erstreckt sich von Aminosäure 113-280 und konnte durch ihre signifikante Ähnlichkeit zur JmjC-Domäne des Maus-Jumonji-Proteins identifiziert werden [TAKEUCHI *et al.* 1995]. Jumonji-Domänen kommen in Proteinen vieler Organismen vor [BALCIUNAS & RONNE 2000] und wurden nach Sequenzähnlichkeit in 7 Klassen eingeteilt. Zusätzlich gibt es eine *Orphan*-Gruppe, der CbfA zugeordnet ist [CLISSOLD & PONTING 2001]. Die Bezeichnung N-terminale bzw. C-terminale Jumonji-Domäne ist nur für Proteine von Bedeutung, in denen mehrere solcher Domänen vorkommen. Gibt es nur eine Jumonji-Domäne, ist diese vom C-terminalen Typ [KLOSE *et al.* 2006].

Die JmjC-Domäne von CbfA enthält alle konservierten Aminosäuren, die vermutlich für die Komplexierung eines Zink-Ions innerhalb der β-Faltblattstruktur benötigt werden. Die Strukturähnlichkeit zu Cupinen führte zu Spekulationen, dass JmjC-Proteine Metalloenzymfunktionen haben könnten. Da die meisten Proteine mit JmjC-Domäne auch DNA- oder Protein-bindende Domänen enthalten, wurde früh vermutet, dass JmjC eine wichtige Komponente von Proteinen ist, die in die Regulation der Chromatin-Struktur eingreifen [CLISSOLD & PONTING 2001]. Diese Funktion wird ausführlicher in Kapitel 1.5 erläutert. Die JmjC-Domäne könnte zudem eine Plattform zur Protein-Protein-Interaktion in Chromatin-Remodeling-Komplexen darstellen. Diese Funktion wurde im Protein Gis1 aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben [TRONNERSJÖ *et al.* 2007].

Zinkfinger

Im CbfA-Protein folgen auf die JmjC-Domäne in C-terminaler Richtung zwei Zinkfingermotive von Aminosäure 373 bis 416 sowie 492 bis 550. Zinkfinger stellen ein Strukturmotiv zur Bindung von DNA [MILLER *et al.* 1985], RNA [BROWN 2005; HALL 2005] oder Proteinen [BRAYER & SEGAL 2008] dar. Es sind bislang zwanzig verschiedene Formen bekannt [MATTHEWS & SUNDE 2002; KRISHNA *et al.* 2003; BRAYER & SEGAL 2008]. Ein klassischer $Cys_2His_2$-Zinkfinger (entdeckt im Transkriptionsfaktor IIIA von *Xenopus laevis*) besteht aus jeweils zwei Cysteinen und Histidinen in einem Bereich von etwa 20 bis 26 Aminosäuren ($CX_{2-4}CX_{12}HX_{2-6}H$) und umfasst einen β-Faltblatt-Anteil sowie eine α-Helix. Diese beiden Strukturen bilden den Finger, der aus der Proteinoberfläche herausragt und durch die Cysteine und Histidine ein Zink-Ion komplexiert [MILLER *et al.* 1985]. Anderen Zinkfingern fehlen die Histidine und das Zink-Ion wird von vier, sechs oder acht Cysteinen gebunden. Zinkfinger können sich auch aus mehreren α-Helices zusammensetzen, ohne einen β-Faltblatt-Anteil zu besitzen. Es sind Proteine mit bis zu 40 Zinkfingern bekannt [BRAYER & SEGAL 2008]. Neben der Vermittlung von DNA-, RNA- oder Proteinbindung ist zudem eine

zentrale Bedeutung für die korrekte Konformation und damit die Funktionalität des Gesamtproteins möglich.

Der erste Zinkfinger in CbfA von *Dictyostelium discoideum* besitzt in einem Bereich von 44 Aminosäuren insgesamt acht Cysteine und ein Histidin. Eine Zuordnung zu bislang beschriebenen Klassen kann nicht erfolgen. Zudem ist unbekannt, welche Aminosäuren an der Ausbildung des Zinkfingers mitwirken. Der zweite Zinkfinger enthält elf Cysteine in einer Region von insgesamt 59 Aminosäuren und weist eine geringe Sequenzähnlichkeit zu einigen Klassen von Zinkfingern auf, unter anderem zum PHD-Typ, der in Histon-modifizierenden Proteinen vorkommt [AASLAND *et al.* 1995; BIENZ 2006].

Poly-Asparagin-Domäne

Die Region von Aminosäure 574 bis 769 des CbfA-Proteins, die zu mehr als 50 % aus Asparaginen besteht, trennt die Zinkfinger von der CTD. Die Asparagine sind in drei nahezu homopolymeren Abschnitten angeordnet und werden von zwei Serin-reichen Abschnitten unterbrochen. Die PolyN-Domäne dient möglicherweise als flexibler Spacer, der die Funktion der anderen Domänen des Gesamtproteins ermöglicht. Eine solche Aufgabe wird für Poly-Glutamin-Abschnitte in Proteinen beschrieben, die mit menschlichen neurodegenerativen Erkrankungen im Zusammenhang stehen. Dabei spielt die Anzahl an Glutaminen eine wichtige Rolle für die korrekte Funktionalität des entsprechenden Proteins [ZOGHBI & ORR 2000; RILEY & ORR 2006; FRIEDMAN *et al.* 2007].

C-terminale Domäne (CTD)

Die C-terminale Domäne (CTD) von CbfA (siehe Abbildung 10) ist 280 Aminosäuren lang und enthält ein Peptidmotiv, das einem AT-Haken der Klasse III ähnlich ist [ARAVIND & LANDSMAN 1998]. Ein AT-Haken ist definiert durch das Tripeptid GRP (Glycin, Arginin, Prolin) in einem Umfeld basischer Aminosäuren (vor allem Lysinen), wobei das zentrale Arginin essentiell für die Bindung in der kleinen Furche der DNA ist [HORN *et al.* 1999]. AT-Haken wurden zuerst in Mitgliedern der *High-Mobility-Group* (HMG) von Nicht-Histon-Chromatin-Proteinen entdeckt [JOHNSON *et al.* 1988; MANFIOLETTI *et al.* 1991]. Dort vermitteln sie DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen, die zu Veränderungen der Chromatinstruktur führen und Einfluss auf die Transkriptionsregulation haben [REEVES 2001; REEVES & BECKERBAUER 2001]. Auch in Nicht-HMG-Proteinen kommen AT-Haken-Motive vor. Hier stellen sie wichtige Elemente für die Kooperation von DNA-bindenden Aktivitäten in Transkriptionskomplexen dar [ARAVIND & LANDSMAN 1998]. Der AT-Haken von CbfA ist ausreichend, um *in vitro* die Bindung an das C-Modul von TRE5-A zu vermitteln, wie in

Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden konnte [HORN *et al.* 1999]. Neueste Untersuchungen zeigen, dass es sich bei der CTD um eine unabhängige genregulatorische Einheit handelt [LUCAS 2009]. Am Anfang der CTD befindet sich ein Bereich mit einem hohen Anteil an Serinen und Threoninen. Solche Proteinabschnitte sind aufgrund ihrer Phosphorylierbarkeit häufig posttranslationellen Regulationen durch Kinasen und Phosphatasen unterworfen [MARNEF *et al.* 2009].

### 1.4.2 Weitere Jumonji-Proteine in *Dictyostelium discoideum*

Neben CbfA gibt es in *Dictyostelium discoideum* zwölf weitere Jumonji-Proteine: Jcd-A bis Jcd-J, die ausschließlich durch eine JmjC-Domäne gekennzeichnet sind, sowie CbfB und RbbB, deren Domänenstrukturen in Abbildung 11 dargestellt sind. CbfB (Gen *cbf*B, DDB_G0293470) ist ein 1474 Aminosäuren langes hypothetisches Paralog von CbfA mit einer berechneten Molekülmasse von ca. 170 kDa. Es weist eine Aminosäurenidentität von 29 % im Bereich der JmjC-Domäne und der Zinkfinger auf, besitzt jedoch eine völlig andere CTD ohne AT-Haken. Zudem kommen ausgedehnte Poly-Asparagin- und Poly-Glutamin-Abschnitte vor. Bislang konnte kein Beweis für die tatsächliche Expression des Proteins erbracht werden. Daher ist auch die Funktion von CbfB zum heutigen Zeitpunkt noch ungeklärt. Eine Expression erscheint jedoch aufgrund des konservierten langen offenen Leserahmens und des Poly-Glutamin-Bereiches wahrscheinlich. Es sind mehrere menschliche neurodegenerative Erkrankungen bekannt, die im Zusammenhang mit einer fehlerhaften Länge von Poly-Glutamin-Abschnitten stehen [ZOGHBI & ORR 2000; RILEY & ORR 2006]. Eine Konservierung solcher Bereiche deutet auf eine wichtige Funktion des Proteins hin.

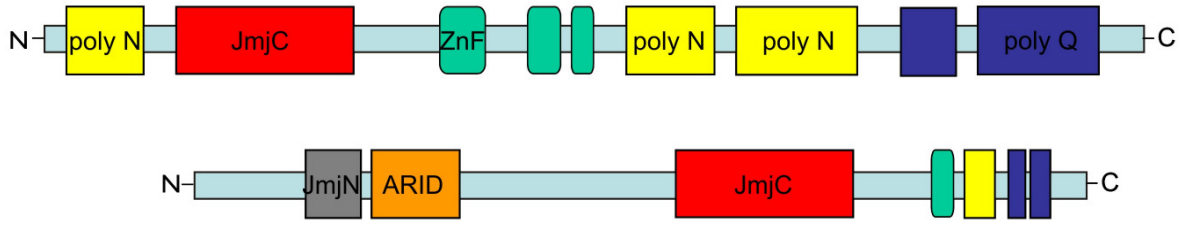



**Abbildung 11: Darstellung der Domänenstruktur der Proteine CbfB (oben) und RbbB (unten).** Abkürzungen: JmjC: Jumonji-C-Domäne; JmjN: Jumonji-N-Domäne; ZnF: Zinkfinger; ARID: *AT-rich interaction domain*; poly N: Poly-Asparagin-Domäne; poly Q: Poly-Glutamin-Domäne.

RbbB (Gen *rbb*B, DDB_G0268778), das über Sequenzähnlichkeit zum humanen Retinoblastom-bindenden Protein (RBBP2) definiert wurde, besitzt sowohl eine JmjN- als auch eine JmjC-Domäne. Über die ebenfalls vorhandene ARID-Domäne [KORTSCHAK *et al.* 2000; WILSKER *et al.* 2005] könnte eine DNA-Bindung vermittelt werden, allerdings ist die Funktion des Proteins bislang nicht erforscht.

## 1.5 Epigenetik, Chromatinmodifikationen und ihr Einfluss auf die Genomexpression

Die Epigenetik befasst sich mit phänotypischen Zelleigenschaften, die auf Tochterzellen vererbt werden, aber nicht in der DNA-Sequenz, also dem Genotyp, festgelegt sind. Zu den epigenetischen Prozessen gehören die genetische Prägung (*genetic imprinting*), das Gen-*Silencing*, die Regulation von Histon-Modifikationen und Heterochromatin, die DNA-Methylierung und weitere Prozesse. Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung sollen in diesem Kapitel ausführlicher erläutert werden. Beide haben Einfluss auf die Genomexpression eines Organismus [JENUWEIN & ALLIS 2001; JAENISCH & BIRD 2003].

Chromatin bezeichnet den Komplex aus DNA und Histon-Proteinen, um die die DNA gewunden ist [LUGER *et al.* 1997]. Ein Histon-*Core*-Oktamer besteht aus je zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4. In *Dictyostelium discoideum* kommen Homologe aller *Core*-Histone vor [KALLER *et al.* 2006]. Die Chromatinstruktur kann die Genomexpression zum einen durch das Ausmaß der Chromatinverpackung in einem Chromosomensegment beeinflussen. Heterochromatin ist hoch kondensiert, arm an Genen und wird kaum transkribiert. Euchromatin ist wenig kondensiert, reich an Genen und leicht zu transkribieren [HUISINGA *et al.* 2006]. Zum anderen spielen Beschaffenheit und Position der Nucleosomen in der Region, in der der Transkriptionsinitiationskomplex zusammengesetzt werden soll, eine Rolle für die Transkription eines Genes. Das sogenannte Nucleosom-*Remodeling* hat somit durch den Einfluss auf die Chromatinverpackung Auswirkungen auf die Transkription. In *Dictyostelium discoideum* wurden zwei potentielle ATP-abhängige Chromatin-*Remodeling*-Enzyme gefunden.

Die Chromatinverpackung kann beeinflusst werden durch die chemische Modifikation von Histonen, z. B. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Sumoylierung [JENUWEIN & ALLIS 2001; ZHANG & REINBERG 2001; TURNER 2002; DUTNALL 2003; LACHNER *et al.* 2003; SHIIO & EISENMAN 2003]. Am besten untersucht ist die Histon-Acetylierung. Dabei werden von Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) Acetylgruppen auf die N-terminalen Regionen jedes *Core*-Moleküls übertragen. Durch die Acetylierung wird die Affinität der Histone für DNA verringert. Die DNA ist nun zugänglich und kann transkribiert werden. HATs agieren zumeist in Multi-Enzym-Komplexen. Die Histon-Acetylierung kann durch sogenannte Histon-Deacetylasen (HDACs) rückgängig gemacht werden. Die entsprechenden Gene werden dadurch inaktiviert. HDACs sind ebenfalls in Multi-Enzym-Komplexen vorhanden. In *Dictyostelium discoideum* sind Homologe von Histon-Acetylasen vier verschiedener Klassen (GCN5, MYST, $TAF_{\alpha}250$ und HAT1) sowie Histon-Deacetylasen der Typen Rpd3, HdaI und Sir2 zu finden [KALLER *et al.* 2006]. Die Phosphorylierung von Histonen betrifft die Serinreste in den N-terminalen Regionen von H2A, H2B, H3 und H4. Die

Ubiquitinylierung beschreibt das Anhängen eines kleinen, ubiquitären Proteins an Lysinreste der C-Termini von H2A und H2B. Es ist auch das Anfügen eines verwandten Proteins, das SUMO genannt wird, möglich (Sumoylierung).

Die Histon-Methylierung findet an Lysin- und Argininresten in der N-terminalen Region von H3 und H4 statt. Sie wurde ursprünglich für irreversibel gehalten und damit für eine permanente Veränderung der Chromatinstruktur verantwortlich gemacht. Die Entdeckung der Histon-Demethylase-Aktivität von LSD1 zeigte, dass auch Histon-Methylierungen umkehrbar sind [SHI *et al.* 2004]. Mittlerweile wurden weitere Lysin- sowie Arginin-Demethylasen entdeckt [TSUKADA *et al.* 2006; CHANG *et al.* 2007; AGGER *et al.* 2008].

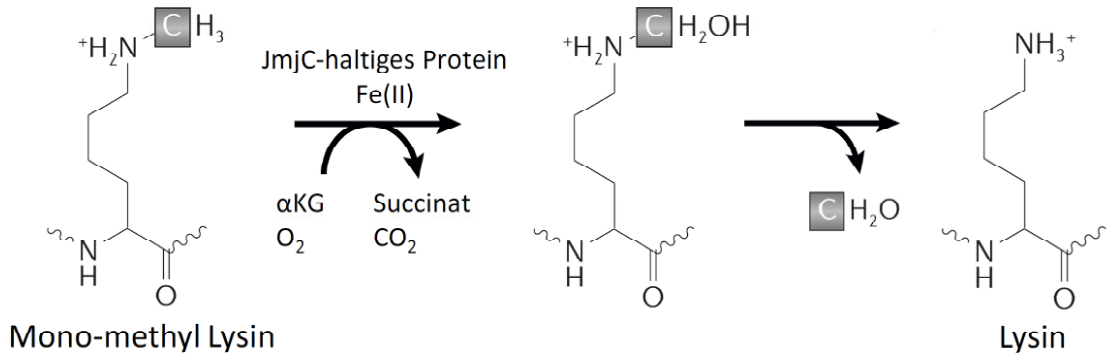



**Abbildung 12: Reaktionsmechanismus der Demethylierung an Arginin- und Lysinresten von Histonen durch JmjC-haltige Proteine.** Erläuterungen siehe Text. Abkürzungen: JmjC: Jumonji-C-Domäne; Fe(II): zweiwertiges Eisen-Ion; αKG: α-Ketoglutarat. Abbildung verändert nach KLOSE *et al.* 2006.

Die Demethylierung erfolgt dabei über einen oxidativen Mechanismus unter Verwendung von Fe(II) und α-Ketoglutarat als Co-Faktoren (Abbildung 12). Es entstehen Succinat, Kohlendioxid und Formaldehyd [KLOSE *et al.* 2006]. Bislang wurden im Menschen 16 Mitglieder aus der Familie der Jumonji-Proteine mit Histon-Demethylase-Aktivität identifiziert [AGGER *et al.* 2008]. 15 davon demethylieren Histon-Lysine und eines Histon-Arginine. Zum Beispiel kann JHDM2 mono- und dimethyliertes H3K9 demethylieren, während die aus JMJD2A-D bestehende Familie di- und trimethyliertes H3K9 modifiziert. JMJD2A und JMJD2C können zusätzlich das Lysin an Position 36 von Histon 3 demethylieren [TAKEUCHI *et al.* 2006; WHETSTINE *et al.* 2006; YAMANE *et al.* 2006]. Insgesamt konnte bislang in fast 100 Proteinen von der Hefe bis zum Menschen eine Histon-Demethylase-Aktivität nachgewiesen werden [SUGANUMA & WORKMAN 2010]. Eine Funktion als Histon-Demethylase wäre daher auch für das JmjC-Protein CbfA aus *Dictyostelium discoideum* denkbar.

In *Dictyostelium discoideum* kommen Homologe zu Histon-Lysin-Methyl-Transferasen aus den Klassen H3K4 (*setA*) [CHUBB *et al.* 2006], H3K9 (*suvA*), H3K36 und H3K79 vor. Des

Weiteren wurden zwei Homologe zu Histon-Arginin-Methyl-Transferasen gefunden. Ein Homolog zu LSD1 hat vermutlich H3K4-Demethylaseaktivität [KALLER *et al.* 2006].

Die Vielfalt der bekannten Modifikationen und die Art und Weise, wie diese zusammenwirken, führte zu der Annahme, dass ein „Histon-Code" existieren muss. Das Muster von spezifischen Histon-Modifikationen ist eng an die Genaktivität gekoppelt. *Dictyostelium discoideum* kann als Modellorganismus zur Untersuchung des Einflusses von Chromatinmodifikationen auf die Regulation entwicklungsrelevanter Gene dienen, da sich die Zellen differenzieren und spezialisieren [KALLER *et al.* 2006].

Eine bedeutende Veränderung der Genomaktivität kann ebenfalls durch chemische Veränderung der DNA selbst erreicht werden. Die DNA-Methylierung kann z. B. ein Genom-*Silencing* bewirken, die Organisation der Chromatinstruktur sowie die Zelldifferenzierung beeinflussen [NG & BIRD 1999; SINGAL & GINDER 1999; SALOZHIN *et al.* 2005]. Es gibt zwei Arten von Methylierungsaktivitäten: die Erhaltungsmethylierung und die *De-novo*-Methylierung [RIGGS 1975; GOLL & BESTOR 2005]. Beide Formen führen zu einer Repression der Genaktivität [ATTWOOD *et al.* 2002]. Häufig wird der modifizierte Zustand an die durch Zellteilung entstehenden Nachkommen weitergegeben.

Bei der DNA-Methylierung werden durch Enzyme, sogenannte DNA-Methyl-Transferasen, Methylgruppen an Cytosinbasen in den chromosomalen DNA-Molekülen angehängt. Dadurch wird Cytosin zu 5-Methylcytosin umgewandelt. Das Methylierungsmuster ist nicht zufällig, sondern in den meisten Eukaryoten auf das Motiv 5´-CG-3´ beschränkt. Nachdem lange postuliert wurde, dass in *Dictyostelium discoideum* keine DNA-Methylierung vorkommt [SMITH & RATNER 1991], konnte vor einigen Jahren auch in diesem Organismus die C5-Methylierung von Cytosinen nachgewiesen werden [KUHLMANN *et al.* 2005; PONGER & LI 2005]. Bislang ist eine DNA-Methyl-Transferase (*dnmA*) bekannt. Sie gehört zur Familie der dnmt2-Methyl-Transferasen und enthält alle für Cytosin-Methyl-Transferasen notwendigen katalytischen Motive. Dabei wurde jedoch keine CpG-Methylierung beobachtet, sondern eine asymmetrische Methylierung von Cytosinen in den Retrotransposons DIRS-1 und *Skipper* [KUHLMANN *et al.* 2005; KATOH *et al.* 2006].

Die Methylierung kann dazu dienen, die Transposition mobiler Elemente zu inhibieren [YODER *et al.* 1997]. In *Dictyostelium discoideum* führt die Methylierung von *Skipper* zur Inaktivierung des Retrotransposons [KUHLMANN *et al.* 2005]. Insgesamt zeigt *Dictyostelium discoideum* nur ein geringes Ausmaß der Methylierung (0,03 bis 0,2 % aller Cytosine), das aber während der multizellulären Entwicklung zunimmt [KUHLMANN *et al.* 2005; KATOH *et al.* 2006].

## 1.6 RNAi und *Antisense*-RNA in *Dictyostelium discoideum*

Ursprünglich wurde RNA-Interferenz (RNAi) als eukaryotischer Mechanismus zum Schutz vor viraler RNA entdeckt. Inzwischen sind weitere Funktionen bekannt: Kontrolle der Ausbreitung mobiler genetischer Elemente, Regulation der Genexpression und Chromatinstruktur, Festlegung der Zellidentität und Steuerung der Entwicklung in multizellulären Organismen [HOUSELEY & TOLLERVEY 2008; SHABALINA & KOONIN 2008; HARRISON *et al.* 2009]. Gentechnologisch wird die Methode zum gezielten Ausschalten von Genen verwendet. Sie basiert auf einer posttranskriptionellen Beeinflussung der Genexpression (*post**t**ranscriptional* *g**ene* *s**ilencing*, PTGS), bei der nicht das Gen selbst, sondern seine mRNA zerstört wird. Zelluläre mRNAs sind geschützt, da die Zielstruktur der RNAi doppelsträngige RNA (dsRNA) ist.

Beim Eindringen viraler dsRNA in die Zelle wird diese von speziellen Proteinen erkannt, die an sie binden und ihrerseits eine Bindung der Ribonuclease *Dicer* ermöglichen [BERNSTEIN *et al.* 2001]. *Dicer* schneidet das dsRNA-Molekül in siRNAs (*s**hort* *i**nterfering RNAs*) mit einer Länge von 21 bis 28 Nucleotiden und inaktiviert damit das Virusgenom [ARAVIN & TUSCHL 2005]. Die siRNAs werden in ihre Einzelstränge getrennt. Einer der Stränge gelangt bevorzugt zum RNA-induzierten *Silencing*-Komplex (*RNA-**i**nduced* *s**ilencing* *c**omplex*, RISC) [HAMMOND *et al.* 2000] und bindet dadurch spezifisch an die in der Zelle bereits vorhandene virale mRNA [HAMILTON & BAULCOMBE 1999; ZAMORE *et al.* 2000]. RISC enthält neben einem RNA-bindenden Protein auch eine Nuclease (Argonaute 2), welche die mRNA hydrolysiert [HAMMOND *et al.* 2000, 2001].

Die molekularen Prozesse der RNAi wurden in den 1990er-Jahren erstmals in *C. elegans* beschrieben [FIRE *et al.* 1998; MONTGOMERY *et al.* 1998]. Mittlerweile wurde RNAi in allen Eukaryoten außer *Saccharomyces cerevisiae* gefunden [HARRISON *et al.* 2009]. RNAi wurde auch als Kontrollmöglichkeit des Wirts zur Einschränkung der Transposonaktivität nachgewiesen [KETTING *et al.* 1999; TABARA *et al.* 1999; HARTIG *et al.* 2009]. Hier wird das bei der Mobilisierung des Transposons auftretende, doppelsträngige Intermediat abgebaut. Eine Variante ist die Bildung komplementärer *Antisense*-RNA zur einzelsträngigen Zwischenstufe und der anschließende Abbau der dsRNA. Diese Form wird als *antisense-mediated gene-silencing* (*Antisense*-vermittelte Geninaktivierung) bezeichnet.

In *Dictyostelium discoideum* konnten einige Proteine identifiziert werden, die in dem Prozess von *antisense*-RNA und RNAi eine Rolle spielen. Eine Nuclease (dsRNase), die spezifisch doppelsträngige RNA abbaut, produziert Bruchstücke von ungefähr 21 Nucleotiden Länge [NOVOTNY *et al.* 2001]. Wie in *Caenorhabditis elegans* und anderen Organismen ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) essentiell für die RNA-Interferenz [SMARDON *et al.*

2000]. Bislang konnten drei RdRP-Homologe (RrpA, RrpB und RrpC/DosA) in *Dictyostelium discoideum* identifiziert werden. Nur die Zerstörung von *rrpA* bewirkt jedoch einen Ausfall der RNA-Interferenz [MARTENS *et al.* 2002]. Des Weiteren wurden als Komponenten möglicher PTGS-Maschinerien zwei *Dicer*-Homologe (DrnA und DrnB) und eine Helicase (HelF) gefunden [POPOVA *et al.* 2006; HINAS *et al.* 2007]. Das Modell der *Antisense*-vermittelten Geninaktivierung in *Dictyostelium* ist in Abbildung 13 dargestellt [MARTENS & NELLEN 2002].

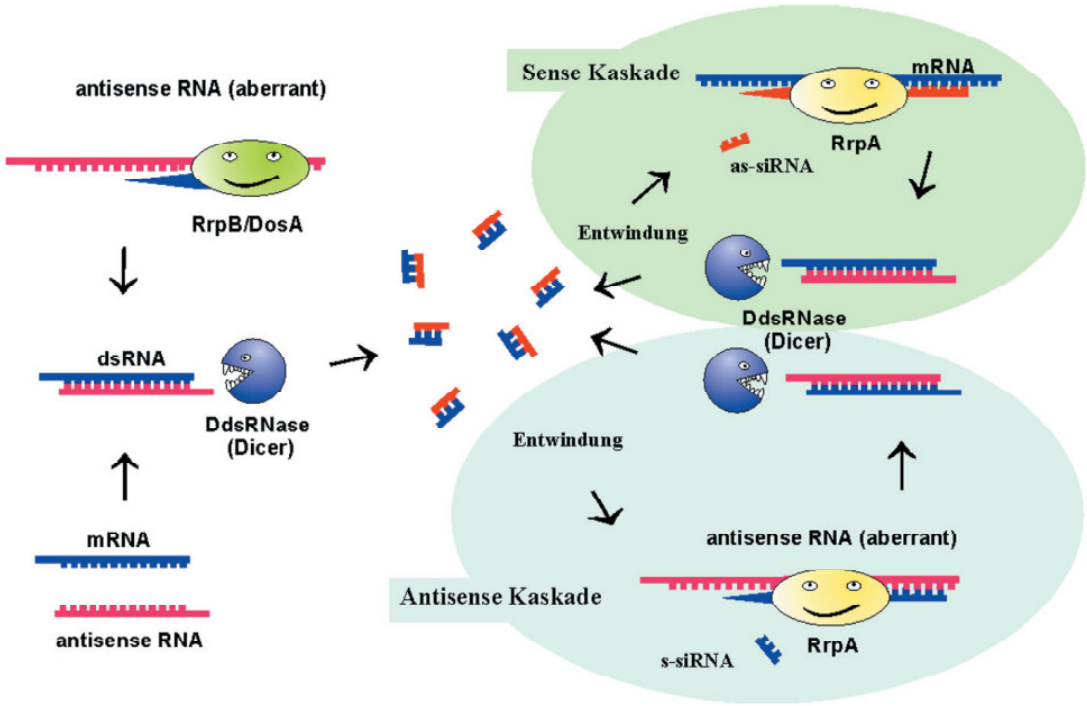



**Abbildung 13: Modell der Funktionsweise von *Antisense*-RNA und RNAi in *Dictyostelium*.** Abbildung aus MARTENS & NELLEN 2002.

*Antisense*-RNA wird durch RrpB und/oder RrpC erkannt und transkribiert. Im Gegensatz zu RrpA funktionieren diese beiden RNA-Polymerasen Primer-unabhängig. Die entstehende doppelsträngige RNA wird von *Dicer* in Abschnitte von 21 Nucleotiden Länge zerschnitten. Die beiden Stränge der Oligomere trennen sich, binden an komplementäre *Sense*- und *Antisense*-RNA und dienen dort als Primer für RrpA. *Antisense*-RNA interagiert somit nicht direkt mit der mRNA, sondern dient als Matrize zur Bildung von Oligomeren, deren Einzelstränge mit der mRNA interagieren. Die dsRNA wird daraufhin abgebaut [MARTENS & NELLEN 2002; KUHLMANN *et al.* 2006]. Es wurde postuliert, dass RISC, der in *Drosophila* beschriebene Komplex zum Abbau einzelsträngiger RNA, in *Dictyostelium* nicht benötigt wird. Ein Mechanismus, der auf einer Übertragung der Helicasedomäne auf die Rrp beruht und diesen ermöglicht, die RISC-Funktion zu übernehmen, wurde als Grund vermutet [MARTENS & NELLEN 2002; KUHLMANN *et al.* 2006]. Diese Theorie muss bezweifelt werden, da sechs Argonauthomologe vorhanden sind [WWW.DICTYBASE.ORG]. Argonautproteine sind

Bestandteil von RISC, besitzen eine Nucleasefunktion und wurden z. B. in *C. elegans* als essentiell für RNAi beschrieben [TABARA *et al.* 1999].

Die Helicase HelF in *Dictyostelium* weist starke Ähnlichkeit mit der Helicasedomäne von *Dicer*-Proteinen auf und wirkt als endogener Inhibitor der RNAi. Sie hat jedoch keinen Einfluss auf die *Antisense*-vermittelte Geninaktivierung. Die RNA-Helicase führt zum Abbau von dsRNA unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes, bevor die dsRNA von *Dicer* angegriffen wird. Im *helF-Knockout* ist eine erhöhte Effizienz der RNAi zu beobachten [POPOVA *et al.* 2006].

RNAi kommt in *Dictyostelium discoideum* auch zur Kontrolle der Transposition mobiler Elemente vor. Für das Retrotransposon *Skipper* konnte eine Abhängigkeit von RrpA, RrpB, RrpC und DrnA nachgewiesen werden. In allen *Knockout*-Stämmen war eine Überexpression zu beobachten. Ein Ausschalten von *rrpC* führte außerdem zu einer gesteigerten Expression von DIRS-1. Für die Mobilität von *Skipper* wurde zudem ein Zusammenhang mit der DNA-Methyltransferase DnmA beschrieben, die durch Methylierung Einfluss auf die epigenetische Genregulation ausübt [KUHLMANN *et al.* 2005].

Der Transkriptionsfaktor CbfA von *Dictyostelium discoideum* bindet spezifisch an das C-Modul des Retrotransposons TRE5-A [GEIER *et al.* 1996]. Vermutlich handelt es sich bei diesem Protein um den Wirtsfaktor, der die Aktivität des Transposons reguliert. Im CbfA konstitutiv unterexprimierenden Stamm JH.D konnte ein Abfall der Transkriptmenge des Retrotransposons beobachtet werden [BECK 2002]. Dabei nimmt sowohl die Menge der Plus-Strang- als auch der Minus-Strang-RNA ab (siehe Kapitel 3.9). Die Ursache dafür könnte ein Einfluss von CbfA auf die PTGS-Maschinerie sein (siehe Kapitel 3.11).

## 1.7 Ziele der Arbeit

Der C-Modul-bindende Faktor A (CbfA) ist ein genereller Transkriptionsfaktor in *Dictyostelium discoideum*. Er beeinflusst die Expression mehrerer hundert Gene. Durch Erzeugung einer CbfA-Suppressionsmutante (JH.D) konnte festgestellt werden, dass CbfA ein wichtiger Faktor für die multizelluläre Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* ist. Später wurde gezeigt, dass CbfA in der Lage ist, sequenzspezifisch an den Promotor des *acaA*-Gens zu binden. Damit wird vermutlich die basale Expression der Adenylatcyclase A erreicht. Diese erzeugt cAMP, welches intrazellulär die Expression entwicklungsspezifischer Gene bewirkt und extrazellulär für die Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit sollten die CbfA-unterexprimierenden Stämme JH.D und JH.D[ura$^-$] mit einem CbfA-Fusionsprotein (TAP-CbfA) komplementiert werden. Der spezifische Nachweis des im Vergleich zu endogenem CbfA größeren Fusionsproteins sollte eine Expression des Plasmid-kodierten CbfA sicherstellen. Dadurch sollte eine Rekombination zwischen genomischer und plasmidischer Kopie ausgeschlossen werden, die in der Wiederherstellung eines funktionalen *cbfA*-Gens resultieren könnte. In den Komplementationsstämmen sollten die multizelluläre Entwicklung, die Regulation CbfA-abhängiger Gene und die Expression entwicklungsspezifischer Gene nach Stimulation mit exogenem cAMP untersucht werden. Um den Einfluss wichtiger Proteindomänen von CbfA auf die genannten Faktoren untersuchen zu können, sollten Mutationen im Bereich der JmjC-Domäne, der Zinkfinger und des AT-Hakens eingeführt werden.

CbfA wurde durch seine Bindung an das C-Modul des Retrotransposons TRE5-A entdeckt. Das C-Modul stellt den Promotor für die Synthese der Minus-Strang-RNA von TRE5-A dar. Im CbfA-unterexprimierenden Stamm JH.D wurde eine sehr geringe Expression von TRE5-A beobachtet. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob CbfA nicht nur die Expression, sondern auch die Retrotranspositionsrate von TRE5-A reguliert. Zusätzlich sollten die Auswirkungen der oben genannten Mutationen in TAP-CbfA auf die Mobilisierung von TRE5-A bestimmt werden. In früheren Versuchen wurde beobachtet, dass die C-terminale Domäne von CbfA die Expression von TRE5-A wiederherstellen kann. Daher sollte ermittelt werden, ob die CTD allein in der Lage ist, auch die Retrotransposition von TRE5-A wiederherzustellen oder ob dafür weitere Domänen von CbfA erforderlich sind.

Da sowohl die Expression der Minus-Strang-RNA als auch der Plus-Strang-RNA von TRE5-A durch CbfA bzw. dessen CTD beeinflusst wurden, obwohl keine Bindung an den Promotor der Plus-Strang-RNA (A-Modul) nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob PTGS-Mechanismen in diesen Prozess eingreifen. Daher sollte die Expression PTGS-assoziierter Gene in Abhängigkeit von CbfA untersucht werden.

# 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Laborgeräte

| | |
|---|---|
| Autoklav: | Varioklav Dampfsterilisator (H + P Labortechnik) |
| | Hiclave® HV-85L (HMC) |
| Blot-Apparatur: | PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter SEDEK M (Peqlab) |
| Gewebe-Homogenisator: | Dounce Tissue Grinder (Wheaton) |
| Elektrophoresen DNA: | PerfectBlue Gelsystem Mini (Peqlab) |
| Elektrophoresen Protein: | PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M (Peqlab) |
| Elektroporator: | Gene Pulser Xcell mit ShockPod (BioRad) |
| Geldokumentation: | Gel Jet Imager 2004 (Intas) |
| Inkubatoren (Schränke): | TS606-G/4-i (WTW) |
| | B20 (Heraeus) |
| Inkubatoren (Schüttler): | Multitron 2 (HT-Infors) |
| Mikroskope: | Binokular-Mikroskop SZX9 (Olympus) |
| | Mikroskop CXX 41 (Olympus) |
| | Lichtquelle U-RFL-T (Olympus) |
| | Kamera Evolution® MP COLOR (Media Cybernetics) |
| PCR-Gerät: | Primus 96 advanced (Peqlab) |
| pH-Wert-Messgerät: | pH-Meter pH 526 MultiCal® (WTW) |
| *Real-Time*-PCR-System: | Mx3000P (Stratagene) |
| Sterile Werkbank (LAF): | MRF-B (Steag) |
| UV/VIS-Spektrometer: | BioPhotometer (Eppendorf) |
| | DU®640 Spectrophotometer (Beckman) |
| Vortexer: | VF2 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik) |
| Waagen: | E2000D, BA 6100 und PT 310 (Sartorius) |
| Waagen (Analyse): | A 210 P, BP 210 P und MC 210 P (Sartorius) |
| Wasseraufbereitung: | Seradest SD 2800 (SERAL Reinstwassersysteme) |
| | Serapur Delta (SERAL Reinstwassersysteme) |
| Zellzählsystem: | CASY-Zellzähler Modell DT (Innovatis, Schärfe System) |
| Zentrifugalevaporator: | Concentrator 5301 (Eppendorf) |
| Zentrifugen: | Centrifuge 5415 D (Eppendorf) |
| | Centrifuge 5810R (Eppendorf) |
| | J2-MC (Beckman) |
| | Labofuge 400R (Heraeus) |
| | Multifuge 1 L-R (Heraeus) |
| | Megafuge 1.0R (Heraeus) |

### 2.1.2 Chemikalien

| Substanzen | Hersteller / Lieferant |
|---|---|
| Acrylamid | Merck |
| 6-Amino-n-hexansäure | Fluka |
| Ammoniumacetat | Roth |
| Agar-Agar | Roth |
| Agarose (peqGold Universal-Agarose) | Peqlab |
| APS | Roth |
| ATP | Roth |
| Bacto-Pepton | BD Biosciences |
| Borsäure | Roth |
| Bromphenolblau | Roth |
| BSA Fraktion V (Blockierlösung) | Roth |
| BSA (Restriktionshydrolyse) | New England Biolabs |
| Calciumchlorid-Dihydrat | Roth |
| cAMP | Roth |
| Chlorophorm/Isoamylalkohol | Roth |
| DMSO | Roth |
| dNTPs | Roth |
| DTT | Roth |
| D-Glucose-Monohydrat | Roth |
| EDTA | Roth |
| Ethidiumbromid | Roth |
| FM-Medium | Formedium |
| Glycerin 86 % | Roth |
| Glycin | Roth |
| Hefeextrakt | Serva |
| HEPES | Roth |
| HL5-Medium | Formedium |
| IPTG | Roth |
| Kaliumacetat | Roth |
| Kaliumchlorid | Roth |
| Kalium-di-hydrogenphosphat | Prolabo |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat | Fluka |
| Laemmli-Puffer | Sigma |
| Leupeptin-Hemisulfat | Roth |
| Magnesiumacetat-Tetrahydrat | Merck |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Roth |
| β-Mercaptoethanol | Ferak Berlin |
| MES | Serva |
| Milchpulver | Roth |
| Natriumacetat-Trihydrat | Roth |
| Natriumazid | Riedel-de Haen |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumcarbonat | Roth |
| Natriumhydrogencarbonat | Roth |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Roth |
| Natriumhydroxid | Sigma |
| PEG 1000, 8000 | Roth |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) | Roth |

| | |
|---|---|
| Poly[dA-dT] | Sigma |
| D-(+)-Saccharose | Roth |
| Sammelgel-Puffer | BDH |
| SDS | Roth |
| TEMED | Roth |
| Trenngel-Puffer | Applichem |
| Tris | Roth |
| Trypton | Serva |
| Tween 20 | Roth |
| X-Gal | Roth |

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

| **Lösung/Puffer** | **Zusammensetzung** | |
|---|---|---|
| 1 × LowTE (pH 8): | Tris-HCl | 10 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| PBS 10 × (pH 7,2): | $Na_2HPO4$ | 80 mM |
| | $KH_2PO4$ | 15 mM |
| | KCl | 25 mM |
| | NaCl | 1,4 M |
| Phosphat-Puffer 50 × (pH 7): | $Na_2PO_4$ | 100 mM |
| | $KH_2PO_4$ | 735 mM |
| TBE 10 × (pH 8,3): | Tris | 1 M |
| | EDTA | 20 mM |
| | $H_3BO_3$ | 0,5 M |
| Tris-HCl (pH 8): | Tris | 1 M |
| | pH-Wert 8,0 einstellen mit HCl | |

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

| **Verbrauchsmaterial** | **Hersteller / Lieferant** |
|---|---|
| CL-Xposure® Film | Thermo Scientific |
| Costarplatten Cellstar | Greiner |
| Dialyseschläuche | Roth |
| Dynabeads® M-280 Streptavidin | Invitrogen |
| Film-Entwickler GBX developer and replenisher | Kodak |
| Film-Fixierer GBX fixer and replenisher | Kodak |
| Filterpapier 3 MM | Whatman |
| Küvetten für Elektroporation (2 mM, 4 mM) | MβP |
| Nitrozellulose-Membran Protran BA 85 | Whatman |
| Petrischalen (5 ml, 10 ml) | Greiner, Nunc |
| Pipettenspitzen, unsteril | Greiner |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 15 ml, 50 ml) | Greiner |
| Rotilabo®-Spritzenfilter steril 0,22 µM | Roth |

### 2.1.5 Kits

| Kit | Hersteller / Lieferant |
|---|---|
| Brilliant® II SYBR® Green qRT-PCR Kit (2-Step) | Stratagene |
| DNeasy® Tissue Kit | Qiagen |
| ECL® Advance Western Blotting Detection-Kit | Amersham Pharmacia Biotech |
| High Fidelity Polymerase Kit | Jena Bioscience |
| Omniscript Reverse Transcription Kit | Qiagen |
| PCR Extender System (zuvor: Triple Master Mix) | 5´-Prime |
| pGEM-T® Vector System | Promega |
| QIAGEN Plasmid Midi Kit | Qiagen |
| QIAquick® Gel Extraction Kit | Qiagen |
| QIAquick® PCR Purification Kit | Qiagen |
| RNase-Free DNase-Set | Qiagen |
| RNeasy® Mini Kit | Qiagen |
| Taq DNA Polymerase Kit | 5´-Prime |
| Taq DNA Polymerase Kit (Taq Pol) | Jena Bioscience |

### 2.1.6 Enzyme

| Enzyme | Hersteller / Lieferant |
|---|---|
| Antarktische Phosphatase (5 U/µl) | New England BioLabs |
| Proteinase K (1 U/µl) | Fermentas |
| Restriktionsendonukleasen (4 – 100 U/µl) | New England BioLabs |
| RNase A (2 U/µl) | New England BioLabs |
| T4-DNA-Ligase (5 U/µl bzw. 10 U/µl) | Invitrogen und Fermentas |
| T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) | New England BioLabs |
| T7-DNA-Polymerase (10 U/µl) | New England BioLabs |

### 2.1.7 Größenstandards

| Marker | Hersteller / Lieferant |
|---|---|
| DNA-Größenstandard pUC19 BsiSI (HpaII) | Jena Bioscience |
| DNA-Größenstandard λDNA/PstI | Fermentas |
| DNA-Größenstandard 0,1 kb | New England BioLabs |
| Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE (Page Ruler) | Fermentas |
| MagicMark™ für SDS-PAGE | Invitrogen |

### 2.1.8 Antikörper

7F3: Gegen die Carboxy-terminale Domäne von CbfA (Aminosäuren 795 bis 998) gerichteter, monoklonaler, primärer Antikörper aus Maus-Hybridomazellen [WINCKLER *et al.* 2001].
Einsatz im *Western Blot* 1 : 1 in 3 % (m/v) BSA in 1 × TBS-T.

Aktin: Gegen Gesamt-Aktin von *Dictyostelium discoideum* gerichteter, in Kaninchen entwickelter, polyklonaler Antikörper [FRANKEL *et al.* 1990].
Einsatz im *Western Blot* 1:3000 in 3 % (m/v) BSA in 1 × TBS-T.

| | |
|---|---|
| Anti-Mouse IgG, HRP gekoppelt: | Sekundärer, in Pferden entwickelter Antikörper zur Detektion von murinen primären Antikörpern. Cell Signaling #7076, über New England Biolabs bezogen. Einsatz im *Western Blot* 1 : 2000 in 5 % (m/v) Milchpulver in 1 × TBS-T. |
| Anti-Rabbit IgG, HRP gekoppelt: | Sekundärer, in Ziegen entwickelter Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern aus Kaninchen. Cell Signaling #7074, über New England Biolabs bezogen. Einsatz im *Western Blot* 1 : 2000 in 5 % (m/v) Milchpulver in 1 × TBS-T. |

### 2.1.9 Mikroorganismen

#### 2.1.9.1 *Escherichia-coli*-Stämme

Folgende *Escherichia-coli*-K12-Stämme wurden verwendet:

| Stamm | Genotyp |
|---|---|
| DH5α®: | F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17($rK^-$) Bezugsquelle: Life Technologies® |
| JM109: | *recA*1, *supE*44, *endA*1, *hsdR*17 (rK-, mK+), *gyrA*96, *relA*1, *thi*-1, (*lac-proAB*), [F', *traD*36, *proAB*, *lacIqZ̃ M*15] [YANISCH-PERRON *et al.* 1985] |
| RZ1032: | F', *cat* (pCJ105; m13s*, Cm*R) *dut*, *ung*1, *thi*-1, *relA*1, *spoT*1, *mcrA* [SAMBROOK *et al.* 1989] |

#### 2.1.9.2 *Dictyostelium-discoideum*-Stämme

| Stamm | Beschreibung |
|---|---|
| AX2: | Durch natürliche Selektion über den Zwischenschritt AX1 [SUSSMAN & SUSSMAN 1967] aus dem Isolat NC4 [RAPER 1935] hervorgegangener, axenisch wachsender Laborstamm [WATTS & ASHWORTH 1970]. *axeA, axeB, axeC* Bezugsquelle: *Dictyostelium*-Stock-Center |
| JH.D: | Aus AX2 entstandene *amber*-Suppressionsmutante des CbfA-kodierenden Gens [WINCKLER *et al.* 2001], die nur ca. 5 % der Wildtyp-Menge von CbfA exprimiert. *axeA, axeB, axeC,* cbfA(*amber*)[pJH1.2(am)-tetO:Glu(su)], *bsR* |

JH.D[ura$^-$]: Aus JH.D durch spontane Mutation in Gegenwart von 5-Fluoroorotat und Uracil hervorgegangener Stamm mit kompletter Deletion des UMP-Synthase kodierenden Gens *pyr5-6* [BECK 2002].
*axeA, axeB, axeC,* cbfA(*amber*)[pJH1.2(am)-tetO:Glu(su)], *bsR, ura*$^-$

#### 2.1.9.3 Weitere Mikroorganismen

Für die Untersuchung der Entwicklung verschiedener *Dictyostelium-discoideum*-Stämme wurden konfluent mit *Klebsiella planticola* (Bezugsquelle: *Dictyostelium*-Stock-Center) bewachsene Agar-Platten verwendet.

### 2.1.10 Nährmedien und Antibiotika

#### 2.1.10.1 Flüssige Nährmedien

| **Medium** | **Zusammensetzung** | |
|---|---|---|
| FM-Medium (Formedium): | FM-Granulat | 19,3 g |
| | $H_2O$ | *ad* 1 l |
| | Autoklavieren | |
| HL5-Medium (Formedium): | HL5-Granulat | 22,0 g |
| | $H_2O$ | *ad* 1 l |
| | Autoklavieren | |
| | Glucose | 1 % |
| SM-Medium: | Bacto-Pepton | 10 g |
| | Hefeextrakt | 1 g |
| | $KH_2PO_4$ | 2,2 g |
| | $K_2HPO_4$ | 1,3 g |
| | $H_2O$ | *ad* 1 l |
| | Autoklavieren | |
| LB-Medium: | Bacto-Pepton | 10 g |
| | Hefeextrakt | 5 g |
| | NaCl | 5 g |
| | $H_2O$ | *ad* 1 l |
| | Autoklavieren | |

#### 2.1.10.2 Agar-Nährmedien

| **Medium** | **Zusammensetzung** | |
|---|---|---|
| LB-Agar: | Agar | 12 g |
| | LB-Medium | *ad* 1 l |
| | Autoklavieren | |

| | | |
|---|---|---|
| SM-Agar: | Agar | 12 g |
| | SM-Medium | *ad* 1 l |
| | Autoklavieren | |
| | Glucose | 1 % |
| Phosphat-Agar: | Agar | 20 g |
| | Phosphatpuffer (50 x) | 20 ml |
| | $H_2O$ | *ad* 1 l |
| | Autoklavieren | |

#### 2.1.10.3 Antibiotika und Additiva

| Antibiotikum / Additivum | Konzentration | Hersteller / Lieferant |
|---|---|---|
| Ampicillin (Natriumsalz) | 100 µg/ml | Roth |
| Kanamycin (Sulfat) | 70 µg/ml | Serva |
| Blasticidin S | 5 µg/ml | Invitrogen |
| 5-Fluoroorotat | 150 – 250 µg/ml | WAK-Chemie Medical |
| G418 (Sulfat) | 5 – 20 µg/ml | Calbiochem |
| Uracil | 20 – 30 µg/ml | Fluka |

## 2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Alle gentechnischen Standardmethoden wurden in Anlehnung an SAMBROOK *et al.* 1989 und MÜHLHARDT 2003 durchgeführt. Enzyme zur molekularbiologischen Klonierung wurden wie in den Herstellerangaben empfohlen eingesetzt. Im Folgenden werden daher ausschließlich ausgewählte Methoden und die Kultivierung von *Dictyostelium discoideum* beschrieben.

### 2.2.1 Primer-gerichtete *In-vitro*-Mutagenese

| | | |
|---|---|---|
| Präzipitations-Lösung: | $NH_4Ac$ | 3,5 M |
| | PEG 8000 | 20 % |
| Annealing-Puffer (5 x): | Tris-HCl (pH 8) | 200 mM |
| | NaCl | 250 mM |
| Elongations-Puffer (10 x): | $MgCl_2$ | 100 mM |
| | ATP | 10 mM |
| | DTT | 10 mM |

Um die Primer-gerichtete *In-vitro*-Mutagenese durchführen zu können, muss die DNA einzelsträngig vorliegen. Dieses wurde mittels Helferphagen M13K07 (New England Biolabs) ermöglicht.

### 2.2.1.1 Herstellung von Einzelstrang-DNA

Das Plasmid mit der zu mutierenden DNA-Sequenz, das einen f1ori-Replikationsursprung aufweisen muss, wurde durch $CaCl_2$-Transformation in den *Escherichia-coli*-Stamm RZ1032 (*dut* $^-$, *ung* $^-$) eingebracht. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde aus einer Kolonie eine 3-ml-Vorkultur in LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angesetzt und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde eine 50-ml-Schüttelkultur angeimpft. Diese wuchs bei 37 °C bis zu einer OD von 0,3. Anschließend wurden 100 µl der Helferphagen-Suspension („*multiplicity of infection*“ von 20) zupipettiert. Nach 1 h wurden 70 µl Kanamycinlösung (Konzentration 50 mg/ml) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht.
Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 9000 x g für 15 min abzentrifugiert, der Überstand mit 20 µl RNase A (1 mg/ml) versetzt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit ¼ Volumen 3,5 M $NH_4Ac$ / 20 % PEG 8000 versetzt und 30 min auf Eis präzipitiert. Der erneuten Zentrifugation bei 9000 x g für 15 min schlossen sich die Resuspendierung des Pellets in 400 µl 1 x lowTE, eine Phenolfällung unter Zusatz von 40 µl 4 M NaCl sowie eine Ethanolfällung an. Das Präzipitat wurde in 30 µl 1 x lowTE aufgenommen und die Konzentration der einzelsträngigen Desoxyuridin-DNA durch Messung der $OD_{260}$ per Photometer bestimmt.

### 2.2.1.2 Primer-Phosphorylierung

Zur 5´-Phosphorylierung des Mutageneseprimers wurde folgender Ansatz pipettiert und 60 min bei 37 °C inkubiert:

| | |
|---|---|
| Primer (100 pmol/µl) | 2 µl |
| Polynucleotidkinase-Puffer (10 x) | 2 µl |
| ATP (100 mM) | 1 µl |
| MQ-Wasser | 15 µl |
| T4-Polynukleotidkinase (5 U/µl) | 0,5 µl |

Anschließend wurde der Reaktionsansatz einer Ethanolfällung unterzogen, in 20 µl MQ-Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.1.3 *In-vitro*-Mutagenese

Um den Mutageneseprimer an die DNA zu hybridisieren, wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert, 4 min bei 100 °C inkubiert und anschließend direkt auf Eis gekühlt.

| | |
|---|---|
| Primer (5´-phosphoryliert) | 5 µl |
| DNA (einzelsträngig) **1 µg** | **x** µl |
| Annealing-Puffer (5 x) | 4 µl |
| MQ-Wasser | *ad* 20 µl |

Zur Elongation des Mutageneseprimers wurden auf Eis zum obigen Ansatz folgende Reagenzien zugegeben und nacheinander 5 min auf Eis, 5 min bei Raumtemperatur und 2 h bei 37 °C inkubiert.

| | |
|---|---|
| Elongations-Puffer (10 x) | 4 µl |
| dNTP (25 mM) | 2 µl |
| MQ-Wasser | 10 µl |
| T7-DNA-Polymerase (10 U/µl) | 1 µl |
| T4-DNA-Ligase (4 U/µl) | 3 µl |

Nach anschließender Ethanolfällung wurde die DNA in 50 µl MQ-Wasser aufgenommen und im Verhältnis 1 : 20 bzw. 1 : 50 verdünnt mittels $CaCl_2$-Transformation in den *Escherichia-coli*-Stamm DH5$\alpha$ oder JM 109 eingebracht. Plasmid-DNA der Kolonien wurde extrahiert und mittels Restriktionshydrolyse oder PCR auf Vorhandensein der eingeführten Mutation überprüft.

## 2.3 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*

### 2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

#### 2.3.1.1 *Dictyostelium-discoideum*-Stamm AX2

Der *Dictyostelium-discoideum*-Wildtyp-Stamm AX2 kann sowohl in Petrischalen als auch axenisch wachsend in Schüttelkultur mit 150 rpm bei 22 °C kultiviert werden [ASHWORTH & WATTS 1970]. Hierbei ist darauf zu achten, dass eine Zelldichte von 4 bis 6 x $10^6$ Zellen / ml nicht überschritten wird, damit die Zellen nicht aus der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase übergehen. Die Generationszeit beträgt ca. 10 bis 12 Stunden. Untransformierte AX2 wachsen in HL5-Medium. Zur Selektion transformierter Zellen wurden dem Medium 10 bis 20 µg/ml G418 zugesetzt.

#### 2.3.1.2 *Dictyostelium-discoideum*-Stamm JH.D

Der *Dictyostelium-discoideum*-Stamm JH.D ist ebenfalls in der Lage, in Schüttelkultur (150 rpm) oder in Petrischalen bei 22 °C zu wachsen. Die Generationszeit ist gegenüber AX2 leicht erhöht. Das HL5-Medium wurde für eine Zellpassage mit 5 µg/ml Blasticidin S versetzt.

#### 2.3.1.3 *Dictyostelium-discoideum*-Stamm JH.D[ura$^-$]

Der *Dictyostelium-discoideum*-Stamm JH.D[ura$^-$] kann ausschließlich in Petrischalen kultiviert werden. Dabei ist seine Generationszeit gegenüber dem Wildtyp-Stamm AX2 stark verlängert. Es wurde FM-Medium mit 20 µg/ml Uracil verwendet.

## 2.3.2 Transformation von *Dictyostelium discoideum*

*Dictyostelium-discoideum*-Zellen können mittels $CaCl_2$-Methode oder Elektroporation transformiert werden. Generell wird letztere Methode bei Transformationen mit einem Plasmid, erstere bei paralleler Transformation zweier Plasmide bevorzugt.

### 2.3.2.1 Elektro-Transformation (Elektroporation)

| | | |
|---|---|---|
| E-Trafo-Puffer (pH 6,1): | $KH_2PO_4$ | 10 mM |
| | Sucrose | 50 mM |

Pro Transformation wurden 2 - 4 x $10^7$ Zellen abzentrifugiert, je ein mal in 1 x Phosphatpuffer und E-Trafo-Puffer für 5 min bei 200 x g gewaschen (JH.D[ura$^-$] bei 130 x g), anschließend in 100 µl E-Trafo-Puffer pro 1 x $10^7$ Zellen resuspendiert und in eine Transformationsküvette mit 4 mM Elektrodenabstand überführt. Nach Zugabe von 5 bis 20 µg Plasmid-DNA wurde mit einem Abstand von 5 s zweimal für 1 ms mit 1000 Volt gepulst. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 22 °C, bevor je 1 mM $CaCl_2$ und $MgSO_4$ zugegeben wurden. Nach 15-minütiger Inkubation bei 150 rpm und 22 °C wurden die Zellen in eine Petrischale mit HL5-Medium überführt (JH.D[ura$^-$] in FM-Medium mit 20 µg/ml Uracil).
Am folgenden Tag wurde das Medium an einem markierten Punkt abgesaugt und durch Selektionsmedium, das anschließend alle 2 bis 3 Tage gewechselt wird, ersetzt.

### 2.3.2.2 $CaCl_2$-Transformation

| | | |
|---|---|---|
| HBS-Puffer (2 x): | HEPES (pH 7,5) | 20 mM |
| | NaCl | 140 mM |
| | KCl | 10 mM |
| | $NaH_2PO_4$ | 0,5 mM |
| | Glucose | 0,2 % |
| | Sterilfiltrieren | |
| Schock-Lösung: | HBS (2 x) | 1,0 ml |
| | Glyzerin (60 %) | 0,6 ml |
| | $H_2O$ | 0,4 ml |
| MES-Medium: | Bacto-Pepton | 10 g |
| | Hefeextrakt | 5 g |
| | MES | 1,3 g |
| | $H_2O$ | *ad* 1 l |
| | pH-Wert 7,1 einstellen mit NaOH | |
| | Autoklavieren | |
| | Glucose | 1 % |

Für die $CaCl_2$-Transformation wurden *Dictyostelium-discoideum*-Zellen eingesetzt, die eine Konfluenz von 80 bis 90 % in Petrischalen erreicht hatten. Das Kulturmedium wurde an einem markierten Punkt abgesaugt und für mindestens 45 min durch MES-Medium ersetzt.

Die Plasmid-DNA wurde mit 300 µl 2 x HBS versetzt und mit MQ-Wasser auf 600 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 38 µl einer 2 M $CaCl_2$-Lösung unter leichtem Vortexen folgte eine Inkubation über einen Zeitraum von genau 25 Minuten bei 22 °C. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurde das MES-Medium abgesaugt. Anschließend wurde die DNA-Mischung vorsichtig in die Mitte der Platte pipettiert und durch Schwenken verteilt. Nach 30 min wurde die Flüssigkeit abgesaugt und durch MES-Medium ersetzt. Die folgende dreistündige Inkubation wurde durch erneutes Absaugen des Mediums beendet. Danach wurde die Schock-Lösung vorsichtig auf die Platte gegeben und nach 6 bis 8 min gründlich abgesaugt.

AX2 und JH.D wurden mit HL5-Medium, JH.D[ura$^-$] mit FM-Medium mit 20 µg/ml Uracil versetzt. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch Selektionsmedium, das anschließend alle 2 bis 3 Tage gewechselt wurde, ersetzt. Nach 7 bis 10 Tagen bildeten sich in den Stämmen AX2 und JH.D Kolonien positiver Transformanten. In JH.D[ura$^-$] dauerte es aufgrund längerer Generationszeit und der Selektion über die Uracil-Prototrophie 6 bis 8 Wochen, bis Kolonien zu sehen waren. Diese wurden mit einer Pipette unter Aufnahme von ca. 70 µl Medium vom Boden der Petrischale abgekratzt und in eine 24-*Well*-Platte überführt. Nach dem Absetzen der Zellen, wurden vorsichtig ca. 0,5 ml Medium zugegeben. Wenn die *Wells* nahezu konfluent bewachsen waren (AX2 und JH.D nach ca. 3 bis 5 Tagen, JH.D[ura$^-$] nach ca. 7 bis 14 Tagen), konnten größere Petrischalen bzw. Schüttelkulturen angeimpft werden.

### 2.3.3 Herstellung von Gefrier-Konserven

#### 2.3.3.1 DMSO-Konserven

2 x $10^7$ *Dictyostelium-discoideum*-Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur oder die entsprechende Menge in Petrischalen wachsender Zellen wurden bei 200 x g (JH.D[ura$^-$] bei 130 x g) für 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1,5 ml HL5-Medium pro Konserve resuspendiert und in Cryo-Röhrchen überführt, die nun 5 min lang auf Eis inkubiert wurden. Nach Zugabe von 150 µl DMSO und leichtem Vortexen wurden die Konserven zwei Stunden lang bei -20 °C gekühlt, bevor sie bei -80 °C gelagert wurden.
Zum Animpfen einer neuen Kultur aus einer DMSO-Konserve wurde diese bei 37 °C aufgetaut und 30 s bei 1400 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Medium ohne Zugabe von Antibiotika resuspendiert und in eine vorbereitete Petrischale gegeben.

#### 2.3.3.2 Glycerin-Konserven

1 x $10^8$ *Dictyostelium-discoideum*-Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur oder die entsprechende Menge in Petrischalen wachsender Zellen wurden bei 200 x g (JH.D[ura$^-$] bei

130 x g) für 5 min abzentrifugiert, zweimal in je 20 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer gewaschen, in 5 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer aufgenommen und auf eine zuvor für einige Minuten unter der Sterilwerkbank getrocknete Phosphatagar-Platte gegeben. Nach mindestens 30 min wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die Platte für etwa 5 min getrocknet. Nach 2 Tagen Inkubation bei 22 °C bzw. nach Abschluss der multizellulären Entwicklung wurden die Sporen vorsichtig von der Platte abgeschabt, in 500 µl Glycerin 86 % gegeben, durchmischt und bei -80 °C gelagert.
Zum Animpfen einer neuen Kultur aus der Glycerin-Konserve wurde mit einem Zahnstocher ein kleines Volumen entnommen und auf einer vorbereiteten Petrischale mit Antibiotika-freiem Medium verteilt.

### 2.3.4 Herstellung von Zelllysaten (Pellets)

Für jedes Zellpellet wurden 2 x $10^7$ *Dictyostelium discoideum*-Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur oder die entsprechende Menge in Petrischalen wachsender Zellen bei 200 x g (JH.D[ura$^-$] bei 130 x g) für 5 min abzentrifugiert, zweimal in kaltem 1 x Phosphatpuffer gewaschen, in 1 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (10000 x g, 1 min) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bei -80 °C gelagert.
Diese Pellets mit definierter Zellzahl wurden zur Gewinnung von DNA, RNA oder zur Analyse im Proteingel und *Western Blot* eingesetzt.

### 2.3.5 Isolation von genomischer DNA

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde ein Pellet mit 2 x $10^7$ Zellen eingesetzt, das mindestens über Nacht bei -80 °C gelagert worden war. Die Extraktion von genomischer DNA für PCRs zum schnellen *Screening* einer großen Anzahl von Transformanten erfolgte nach folgenden Protokoll. Zum Zellpellet wurden

| | |
|---|---|
| MQ-Wasser | 336 µl |
| *Taq*-Puffer (10 x) | 40 µl |
| Triton 10 % | 20 µl |
| Proteinase K (10 mg/ml) | 4 µl |

pipettiert, durchmischt und der Reaktionsansatz 1 h bei 56 °C inkubiert. Zum Inaktivieren der Proteinase K wurde anschließend für 5 min auf 95 °C erhitzt, dann 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube mit 6 µl RNase A (1 mg/ml) überführt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung bei -20 °C. Pro PCR wurden 1 bis 3 µl der genomischen DNA eingesetzt.

Genomische DNA von höherer Qualität und Reinheit, z. B. für Sequenzierungen, wurde mit dem DNeasy® Tissue Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers gewonnen.

### 2.3.6 Isolation von RNA und Synthese von cDNA

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde ein Pellet mit $2 \times 10^7$ Zellen eingesetzt, das mindestens über Nacht bei -80 °C gelagert worden war. Die Extraktion erfolgte mit dem RNeasy® Tissue Kit (Qiagen) nach dem *Animal-Cell*-Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde nach Konzentrationsbestimmung bei -80 °C gelagert.
Zur Herstellung von cDNA wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die Synthese erfolgte unter Verwendung des Omniscript® Reverse-Transcription-Kits (Qiagen) und eines oligo$(dT)_{18}$-Primers.

### 2.3.7 Dokumentation der Entwicklung

Um die Fähigkeit von *Dictyostelium-discoideum*-Stämmen zur multizellulären Entwicklung zu untersuchen, dienten die nachfolgend beschriebenen Möglichkeiten.

#### 2.3.7.1 Phänotypisierung auf Bakterienrasen

Aus einer Glycerin-Konserve wurde eine Kultur von *Klebsiella planticola* in SM-Medium angeimpft und zwei Tage lang schüttelnd (150 rpm) bei 22 °C inkubiert. Von dieser Kultur wurden 500 µl abgenommen und auf einer SM-Agar-Platte ausgestrichen. Nach zwei weiteren Tagen Inkubation bei 22 °C wurden 50 µl einer *Dictyostelium-discoideum*-Kultur mit einer Zelldichte von $2 \times 10^6$ Zellen pro ml kreisförmig auf den Bakterienrasen aufgebracht. Anschließend wurde die Entwicklung in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop betrachtet und per Mikroskopkamera dokumentiert.

#### 2.3.7.2 Phänotypisierung auf Phosphatagar-Platten

$1 \times 10^8$ *Dictyostelium-discoideum*-Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur oder die entsprechende Menge in Petrischalen wachsender Zellen wurden bei 200 x g (JH.D[$ura^-$] bei 130 x g) für 5 min abzentrifugiert, zweimal in je 20 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer gewaschen, in 5 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer aufgenommen und auf eine zuvor für einige Minuten unter der Sterilwerkbank getrocknete Phosphatagar-Platte gegeben. Nach mindestens 30 min wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die Platte ca. 5 min getrocknet. In geeigneten Abständen wurde die Entwicklung unter der Stereolupe betrachtet und per Kamera dokumentiert.

### 2.3.8 Pulsen von *Dictyostelium discoideum* mit cAMP

Von logarithmisch in Schüttelkultur oder in Petrischalen wachsenden *Dictyostelium discoideum*-Zellen wurden 5 x $10^8$ Zellen wie unter Punkt 2.3.7.2 beschrieben abzentrifugiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 25 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer resuspendiert, sodass die Konzentration 2 x $10^7$ Zellen pro ml betrug. Davon wurden 5 ml sofort auf fünf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt, durch einminütige Zentrifugation bei 10000 x g pelletiert und sofort bei -80 °C gelagert. Diese Pellets wurden verwendet, um RNA für die cDNA-Synthese zum Zeitpunkt $t_0$ zu extrahieren.
Die restlichen 20 ml wurden zu gleichen Teilen auf zwei 250-ml-Erlenmeyerkolben verteilt und 2 h bei 120 rpm und 22 °C geschüttelt. Ein Kolben wurde anschließend weitere 4 h bei identischen Bedingungen kultiviert. Die Zellen im zweiten Kolben wurden ebenfalls für 4 h weitergeschüttelt und zusätzlich alle sechs Minuten mit 10 µl einer 30 µM cAMP-Lösung (Endkonzentration 30 nM) versetzt. Anschließend wurden von beiden Kulturen jeweils fünf Pellets zu 2 x $10^7$ Zellen hergestellt (Zeitpunkte $t_6$ ohne Pulsen und $t_6$ mit cAMP-Pulsen) und die restlichen Zellen auf einer Phosphatagar-Platte verteilt, um die Fähigkeit zur Entwicklung nach dem Pulsen bzw. nach Erhöhung der Aggregationskompetenz durch Schütteln in Phosphatpuffer zu beobachten.

### 2.3.9 *In-vivo*-Retrotranspositionsassay (5-FO-Selektion)

Um die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A *in vivo* zu untersuchen, wurde ein *Dictyostelium-discoideum*-Stamm verwendet, der eine Deletion des UMP-Synthase-Gens aufweist (hier: JH.D[ura$^-$]). In diesen wurden die Plasmide pUi (enthält *pyr5-6*-Gen mit Intron, dient als Kontrollstamm) oder pUiVi (enthält *pyr5-6*-Gen mit Intron und invers orientiertem Valin-Gen als Ziel für die Integration von TRE5-A) transformiert und die positiven Transformanten mit Uracil-freiem FM-Medium selektioniert. Um die Abhängigkeit der Retrotranspositionsfrequenz von CbfA zu untersuchen, wurden anschließend verschiedene Expressionsplasmide (pDXA-3H, pPB1 und pPB4c) [BECK 2002] bzw. ein Komplementationsplasmid, das CbfA fusioniert mit einem TAP-Tag enthält, in die ura$^+$-Zellen transformiert und mit 4 µg/ml G418 in HL5-Medium selektioniert. Positive Transformanten wurden nach Kontrolle der Proteinexpression mittels *Western Blot* erneut auf FM-Medium umgewöhnt.
Jeweils 5 x $10^5$ Zellen wurden auf drei parallele Petrischalen pro Stamm ausplattiert und mit FM-Medium versetzt, das 250 µg/ml 5-Fluoroorotat und 30 µg/ml Uracil enthielt. Nach einer Woche wurde das Medium abgesaugt und vorsichtig ersetzt. Weitere zwei Wochen später wurden Klone sichtbar und konnten ausgezählt werden. Jeder 5-FO-resistente Klon oberhalb der natürlichen Mutationsrate entspricht dabei einem Retrotranspositionsereignis.

### 2.3.10 Herstellung von Kernextrakten

Alle Arbeitsschritte zur Präparation von Zellkern-Extrakten müssen auf Eis und unter Verwendung gekühlter Puffer erfolgen.

| | | |
|---|---|---|
| Lyse-Puffer: | HEPES (pH 7,8) | 30 mM |
| | KCl | 10 mM |
| | Mg-Acetat | 10 mM |
| | Saccharose | 10 % |
| | Triton®X-100 | 2 % |
| | EDTA | 1 mM |
| GP 15/50/600 : | HEPES (pH 7,8) | 20 mM |
| | KCl | 15 mM / 50 mM / 600 mM |
| | $MgCl_2$ | 10 mM |
| | Glycerin | 15 % |
| | EDTA | 1 mM |

Mindestens 1 x $10^9$ Zellen einer *Dictyostelium-discoideum*-Schüttelkultur mit einer Zelldichte von 5-8 x $10^8$ Zellen pro ml oder die entsprechende Menge in Petrischalen wachsender Zellen (entspricht ca. 40 – 50 Platten) wurden bei 340 x g für 5 min abzentrifugiert und je einmal in 100 ml und einmal in 50 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 20 ml Lysepuffer unter Zusatz von 60 µg/ml Leupeptin und 1 mM DTT resuspendiert und 10 min lang auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in einem großen Wheaton-Homogenisator dreimal mit dem Stößel *„loose“* homogenisiert, 10 min auf Eis inkubiert, fünfmal mit dem Stößel *„tight“* homogenisiert, erneut auf Eis inkubiert und zur Sedimentation der Kerne bei 10000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets in 2 ml Lyse-Puffer mit 60 µg/ml Leupeptin und 1 mM DTT wurde die Suspension in einen kleinen Wheaton-Homogenisator überführt und mit dem Stößel *„tight“* dreimal homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen. Die Zellkerne wurden einmal mit GP 15 und dreimal mit GP 50 gewaschen. Dabei wurden 2 ml des jeweiligen Puffers unter Zusatz von 20 µg/ml Leupeptin und 1 mM DTT zugegeben, das Pellet darin vorsichtig mit abgeschnittener Pipettenspitze resuspendiert und erneut bei 10000 x g und 4 °C für jeweils 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Es folgten drei Extraktionen mit GP 600, welches ebenfalls mit 20 µg/ml Leupeptin und 1 mM DTT versetzt wurde und zur Lyse der Zellkerne führt. Dabei wurde nach jeder Zugabe von GP 600 zunächst 5 min auf Eis inkubiert, bevor erneut wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Die Überstände der GP 600-Fraktionen wurden gesammelt und zweimal 1,5 h gegen GP 15 mit 1 mM DTT dialysiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

## 2.4 SDS-PAGE

Um die Proteine einer Probe entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufzutrennen, kann ein Polyacrylamid-Gel verwendet werden [LAEMMLI 1970]. Dabei ist die Polyacrylamid-Konzentration umso geringer zu wählen, je größer die erwarteten Proteine sind. Zur Auftrennung von CbfA und dessen C-terminaler Domäne wurde ein 12,5%iges Gel gewählt, zur Trennung von CbfA und dem CbfA-Fusionsprotein mit TAP-Tag wurde ein Proteingel mit einer Konzentration von 10 % Polyacrylamid verwendet.

| | | |
|---|---|---|
| Trenngel (10 %): | $H_2O$ | 12,5 ml |
| | Trenngel-Puffer (4 x) | 7,5 ml |
| | Acrylamid (30 %) | 10,0 ml |
| | TEMED | 30 µl |
| | APS | 90 µl |
| Sammelgel: | $H_2O$ | 7,7 ml |
| | Sammelgel-Puffer (10 x) | 1,0 ml |
| | Acrylamid (30 %) | 1,3 ml |
| | TEMED | 15 µl |
| | APS | 30 µl |
| SDS-Laufpuffer (10 x): | Tris | 0,25 M |
| | Glycin | 2 M |
| | SDS | 1 % |

Sollten Kernextrakte mittels Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden, wurden sie mit einem entsprechenden Volumen 2 x Laemmli-Auftragspuffer versetzt, 7 min bei 95 °C inkubiert und anschließend 3 min bei 11000 x g zentrifugiert. Sollten Gesamtzelllysate eingesetzt werden, mussten diese zuvor in 1 x PBS resuspendiert werden, bevor sie wie oben beschrieben mit 2 x Laemmli-Puffer denaturiert, erhitzt und zur Abtrennung von Zelltrümmern zentrifugiert wurden. Die Proben wurden aufgetragen und in der mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 110 – 170 Volt aufgetrennt. Die Proteine können anschließend durch Färbung detektiert oder mittels *Western Blot* analysiert werden.

## 2.5 *Western Blot*

Die zuvor im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine können zur weiteren Analyse mittels *Semi-dry*-Elektroblotting auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Folgende Lösungen werden benötigt.

| | | |
|---|---|---|
| Anoden-Puffer I: | Tris (pH 10,4) | 300 mM |
| | Methanol | 20 % |

| | | |
|---|---|---|
| Anoden-Puffer II: | Tris (pH 10,4) | 25 mM |
| | Methanol | 20 % |
| Kathoden-Puffer: | Tris (pH 9,4) | 25 mM |
| | 6-Amino-n-Hexansäure | 40 mM |
| | Methanol | 20 % |
| TBS (10 x): | Tris (pH 7,5) | 0,1 M |
| | NaCl | 1,5 M |
| TBS-T (1 x): | TBS (10 x) | 100 ml |
| | Tween 20 | 500 µl |
| | $H_2O$ | *ad* 1000 ml |
| BSA-Blockierlösung: | BSA (Fraktion V) | 3 g |
| | $NaN_3$ (10 %) | 500 µl |
| | TBS-T (1 x) | *ad* 100 ml |
| Milch-Blockierlösung: | Milchpulver | 5 g |
| | TBS-T (1 x) | *ad* 100 ml |
| 1. Antikörper (7F3): | Hybridoma-Überstand | 10 ml |
| | BSA-Blockierlösung | 10 ml |
| | $NaN_3$ (10 %) | 150 µl |
| 1. Antikörper (Aktin): | gereinigter Antikörper | 6 µl |
| | BSA-Blockierlösung | 20 ml |
| | $NaN_3$ (10 %) | 150 µl |
| 2. Antikörper: | Anti-Mouse/Rabbit-HRP | 10 µl |
| | Milch-Blockierlösung | 20 ml |

Der *Western-Blot*-Aufbau begann mit vier auf Gelgröße zugeschnittenen und in Anoden-Puffer I getränkten Filterpapieren (3 MM), auf die zwei weitere in Anoden-Puffer II vorbehandelte Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran aufgelegt wurden. Anschließend wurde das Proteingel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und von vier in Kathoden-Puffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Geblottet wurde je nach Größe der Proteine für 1 bis 1,5 h mit 0,8 – 1,2 mA/cm$^2$.

Nach dem Blot wurde die Membran 1 h lang in BSA-Blockierlösung geschwenkt und über Nacht bei 4 °C im 1. Antikörper inkubiert. Es folgten vier Waschschritte (zweimal 1 min und zweimal 10 min) in 1 x TBS-T, bevor die Membran 30 min lang in Milch-Blockierlösung blockiert wurde. Der einstündigen Inkubation im 2. Antikörper schlossen sich erneut Waschschritte wie oben beschrieben in 1 x TBS-T an. Danach wurden beide Komponenten des ECL®-Systems (Amersham Pharmacia Biotech) zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gegeben. Nach kurzer Inkubation wurde ein Röntgen-Film zur Detektion der Chemolumineszenz aufgelegt. Die Expositionszeit ist unter anderem abhängig von der

Proteinmenge und kann wenige Sekunden bis einige Stunden betragen. Der Film wurde anschließend entwickelt und fixiert.

## 2.6 *Northern Blot*

Die RNA wurde auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarose-Gel wurde anschließend direkt und unverändert für den *Northern Blot* eingesetzt. Der Aufbau des *Northern Blots* erfolgte nach Sambrook [SAMBROOK *et al.* 1989] unter Verwendung einer Nylon-Membran (Hybond™-N) und 20 x SSC als Transferpuffer.

| | | |
|---|---|---|
| SSC (20 x): | NaCl | 3,0 M |
| | Natriumcitrat | 0,3 M |

Die Transferdauer betrug 16 Stunden. Anschließend wurde die Nylon-Membran 2 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank gebacken.

## 2.7 DNA-Protein-Interaktionsassay (*Pulldown-Assay*)

Der *Pulldown-Assay* bietet die Möglichkeit, *in vitro* die Bindung von Proteinen an DNA zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Sequenzen von Interesse mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM-T® ligiert. An diesem Konstrukt wurde eine PCR mit einem biotinylierten Vorwärts-Primer, der in pGEM-T® bindet und einem für die klonierte DNA spezifischen Rückwärts-Primer durchgeführt, um die zu untersuchende DNA mit Biotin zu markieren. Die amplifizierte DNA wurde mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration mittels photometrischer Messung der $OD_{260}$ bestimmt. Als Proteinprobe können aufgereinigtes, auch rekombinantes Protein oder der Kernextrakt eingesetzt werden. Die Durchführung erfolgte in Reaktionsgefäßen, die eine Oberfläche mit geringen Proteinbindungseigenschaften besitzen (Protein-*Low-Bind-Caps*).

50 bis 200 µl eines Kernextraktes wurden als *Input* abgenommen und mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt. Die gleiche Menge Kernextrakt wurde mit GP 50 (siehe 2.3.11 Herstellung von Kernextrakten) auf 500 µl aufgefüllt und mit 2,5 µg poly-dAdT-DNA sowie 5 µg eines Kompetitorplasmides (unspezifische DNA, ligiert in pGEM-T®) für 15 min rotierend inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 5 pmol des biotinylierten PCR-Produktes gegeben und das Gemisch für weitere 45 min rotiert. Um die Bindung der markierten DNA an (Kern)-Proteine nachzuweisen, wurden Streptavidin-gekoppelte magnetische *Beads* (Dynabeads® M-280, Invitrogen) verwendet, die spezifisch an Biotin binden und mittels eines Magneten aufgereinigt werden können. 20 µl der *Beads* wurden nach zweimaligem Waschen im doppelten Volumen GP 50 zur Mischung aus Kernextrakt und DNA gegeben und 30 min lang

rotierend inkubiert, bevor sie im Magneten abgetrennt wurden. Der Überstand wurde abgesaugt und die *Beads* fünf Mal in je 500 µl GP 50 gewaschen.

Mit dem letzten Waschschritt wurden die *Beads* in ein neues Protein-*Low-Bind-Cap* überführt, mittels Magnet abgetrennt und nach Entfernen des Überstandes durch 5 min Erhitzen auf 95 °C in 2 x Laemmli-Puffer eluiert. Der *Input* wurde ebenso erhitzt. Die magnetischen *Beads* wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei 10000 x g abgetrennt. Die Analyse der nun im Überstand befindlichen, zuvor an die *Beads* gebundenen Proteine erfolgte nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel und Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran mittels spezifischer Antikörper. Der Anteil gebundenen Proteins am eingesetzten Gesamt-Protein kann durch Vergleich mit dem *Input* bestimmt werden.

## 2.8 Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

Zum Vergleich der Expression von Genen in verschiedenen *Dictyostelium-discoideum*-Stämmen oder innerhalb eines Stammes bei unterschiedlichen Kulturbedingungen oder in verschiedenen Entwicklungsstadien wurde die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) zur Messung der jeweiligen mRNA-Mengen durchgeführt. Als Standards wurden die Gene *gpdA* (kodiert für die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, DDB_G0275153, Primer Q-GAPDH-01/-02) und *catA* (kodiert für eine Katalase, DDB_G0274595, Primer DDB_G0274595-01/-02) verwendet. Die Primer Q-GAPDH-01 und Q-GAPDH-02 überspannen ein Intron, sodass eine Verunreinigung mit genomischer DNA aufgrund unterschiedlicher Produktgrößen an gDNA und cDNA durch eine konventionelle Reverse-Transkriptase-PCR ausgeschlossen werden konnte. Die cDNA wurde im Verhältnis 1 : 10 verdünnt eingesetzt, die Endkonzentration der Primer im PCR-Ansatz beträgt 300 nM. Alle verwendeten Primer und deren Sequenzen sind in Kapitel 2.9 aufgeführt.
Die qRT-PCR wurde mit dem System MxPro 3000 von Stratagene unter Verwendung eines *Taq*-Polymerase-Kits (5´-Prime oder Jena Bioscience) in Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® (Jena Bioscience) oder mit dem Stratagene-Kit Brilliant® II SYBR® Green qRT-PCR Master-Mix (2-step) durchgeführt. Nach der ersten zehnminütigen Denaturierung folgten 40 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 95 °C, Primer-Anlagerung bei 60 °C und Elongation bei 72 °C. Zur Kontrolle der entstandenen Produkte schloss sich eine Bestimmung der Schmelztemperatur an. Die relativen Änderungen der Expression unter verschiedenen Bedingungen wurden mit der Delta-Delta-CT-Methode [PFAFFL 2001] berechnet und als *Fold Change* ausgegeben. Zur Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurden mindestens drei unabhängige Proben vermessen.

## 2.9 Primerliste

In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt. Gen- und Primerbezeichnung unterscheiden sich zum Teil aufgrund geänderter Nomenklatur in der Referenzdatenbank Dictybase. Zur Klonierung verwendete Schnittstellen von Endonukleasen sind in kleinen Buchstaben angegeben, zur Mutagenese vorgesehene Nukleotide unterstrichen.

| Gen | Primer | Sequenz 5´→ 3´ | Produkt |
|---|---|---|---|
| *cbfA* (Genotypisierung: Wildtyp / *amber*) | CMBF-12 / CMBF-46 | GGTGACAAGGGAGGTG / GCATGTCCACGCGAATGG | 782 bp / 1055 bp |
| | CMBF-44am | GTTGATTTGGTGATGATATCATCGACCTAT | |
| | CMBF-45wt | GTTGATTTGGTGATGATATCATCGACTTCC | |
| *cbfB* | cbfB-11 / cbfB-03 | GGGATCCATGTCCACCAGAATGGACAAAAT / GGCAGGATATGTCTGTAGGAGAGCTC | 520 bp |
| | KO-DDB0191959-for1 / KO-DDB0191959-rev1Hind | GAGAAGGGTGATTCAAGATGGTATGCC / caagcttGATTGGATTGAGTTTTAATACATTCATC (*HindIII*) | 1098 bp |
| | KO-DDB0191959-for2Hind / KO-DDB0191959-rev2Bam | gaagcttCACCCCCAACAGTTAAATCAGAGAAG (*HindIII*) / ggatccGGCAAATGATGGTTGAGGAGATATTTCTTG (*BamHI*) | 1044 bp |
| *cbfB*-Promotor | cbfB-22 / cbfB-23 | GggatccAGTATTTTTGTGTTGTAGTAACATTTATAGG (*BamHI*) / GggatccGGTGGTATTTGAAATTACAATTGGCATACCATC (*BamHI*) | 842 bp |
| *gpdA* | Q-GAPDH-01 / Q-GAPDH-02 | GGTTGTCCCAATTGGTATTAATGG / CCGTGGGTTGAATCATATTTGAAC | 156 bp / 247 bp |
| *catA* | DDB_G0274595-01 / DDB_G0274595-02 | GTTTCGCTGCTCGTCAACCATACAATC / GCACGAACTTGAATTTCTTTGATGGTG | 157 bp |
| *cbfA*-Promotor | CMBF-120 / CMBF-121 | GggatccAAATTATTTTGTACCGTGTATATACAATAATTG (*BamHI*) / GggatccATCCTCTACTATTTCTGGACTAGTTGTTTGGTATG (*BamHI*) | 600 bp |
| *cbfA* (Klonierung Plasmid TAP-CbfA) | cAK-01 / cAK-02 | agatctaccggtggatccGAAAGATATTCAGAAATGGAATTAATTAATTCACC (*BglII, AgeI, BamHI*) / accggtAATCAAGTTGGAAATTTGAAAAGAATACTCAAG (*AgeI*) | 3473 bp |
| | cAK-03 / cAK-04 | ccatggCAAATTATTTTGTACCGTGTATATACAATAATTG (*NcoI*) / agatctCATATTAAAATTAAGTATATTATCAACACTAGG (*BglII*) | 504 bp |
| | cAK-05 / cAK-06 | ggatcctctagaGCAGGCCTTGCGCAACACGATG (*BamHI, XbaI*) / CggatccAGTCTTGTACAGCTCGTCCATGC (*BamHI*) | 1270 bp |
| cDNA-Synthese | Oligo (dT) | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT | |
| DDB0169268 | DDB0169268-01 / DDB0169268-02 | CACCTCGTGTTGGTGATTCTGT / CGCATGTTTGGTCTTCACCACT | 204 bp |
| DDB0191305 (*clc*) | clc-01 / clc-02 | CCACAACATTTGACAACTCAAAC / GCTGGTGCAGTTTCTTTTGG | 130 bp |
| DDB0204558 | DDB0204558-01 / DDB0204558-02 | TCAACAGTTAGGTGGTGGCTGT / GGCGGGACTGTTACAAGCAAAT | 205 bp |
| DDB0187209 | DDB0187209-01 / DDB0187209-02 | TGGTTGTAATTGTGCACCAGCC / TTGGGCAAAGGTTAGCACATGG | 236 bp |
| DDB0214941 (*orfSGP*) | Q-DDB0214941-01 / Q-DDB0214941-02 | CACACATGGAAACAAACTCTCACTG / CACGATCTATTTGTTGGATATATCTC | 157 bp |

| Gen | Primer | Sequenz 5´→ 3´ | Produkt |
|---|---|---|---|
| DDB0167552 | DDB0167552-01 | GGATGTCACAATCAGAAAATGTTGC | 231 bp |
| | DDB0167552-02 | CTACCACCAGTGTATCCACC | |
| DDB0214895 | abcG10-01 | CACTTGGTCAAGTTGTATCTGC | 160 bp |
| (*abcG10*) | abcG10-02 | CGGCATGGATTTGAATGATAAACG | |
| DDB0191229 | abcG2-01 | CCATTCTTTTACCACTCCTTCATCTC | 175 bp |
| (*abcG2*) | abcG2-02 | TAGCGATTGAAGCTGGTGG | |
| DDB0206011 | DDB0206011-01 | ACATTTAGCATCCTCACCACC | 175 bp |
| | DDB0206011-02 | GTGAGCAATACCATAGAGATGATG | |
| DDB0189346 | DDB0189346-01 | TGATGGTACTCGTGTTCCAG | 193 bp |
| | DDB0189346-02 | GAGAGTTGAAGAGATACGCC | |
| TRE5-A.1 | Rep-110 | CGAAAGAATTATATCTTCCGAATGG | 288 bp |
| | Rep-181 | GAGACAAAGACCCTATCGATGG | |
| Biotinylierte PCR-Produkte (*acaA*P und C-Modul) | pGEM-for(biotin) | Biotin-GGCCCGACGTCGCATGCTCC | |
| | pGEM-rev | GGTCGACCTGCAGGCGGCC | 307 bp |
| | KO-bsr-rev | CCAACGCGTTGGGAGCTCTCCGGATC | 386 bp |
| *cbfA*-Mutation (H163A/D165A) | CMBF-141 | CCTATACACCAGGCGCTATCGCTATGTGTGGCAGTCTTAG | |
| | CMBF-143 | CACCAGGCGCTATCGC (Screening-Primer) | |
| *cbfA*-Mutation (H414L) | CMBF-179 | GGTTGTGAATTCCTTTTCAAGGTTATGGTACTC | |
| | CMBF-180_(sH414L) | GTATCGGTTGTGAATTCCT (Screening-Primer) | |
| *cbfA*-Mutation (R812A) | CMBF-142 | GATAAACCAAAAGGTGCACCACCAAAGAATTTAAAAG | |
| | CMBF-144 | AATGATAAACCAAAAGGTGC (Screening-Primer) | |
| *cbfA*-Mutation (K810A + R812A) | CMBF-183 | GATAATGATAAACCAGCAGGTGCACCACCAAAGAATTTAAAAG | |
| | CMBF-172_(sK810A) | AGATAATGATAAACCAGC (Screening-Primer) | |
| Sequenzierung JH.D[ura⁻/TAP-CbfA/ H163A+D165A] | GFP-01Xho/Bam | CCGGctcgagggatccGTGAGCAAGGGCGAGGAG (*XhoI, BamHI*) | 1422 bp |
| | CMBF-123 | GGCGGCCGCTATGTATGAGGTAATGATGAAAAGTAAGAG | |
| | YFP-3´seq | CACTACCTGAGCTACCAGTC | Sequenz. |
| | CMBF-150 | CGTTGTAAACGTCACCTCCCTTGTC | Sequenz. |
| *acaA* | acaA-04 | CATTCTAGAGGCGGTATTGGCAGTATCACC | 172 bp |
| | acaA-09 | GGAGAAAATGTCTGATTTCGCTTTGGATG | |
| *csaA* | csaA-05 | GAAAGCTGGTATCTCAAATGTTGTCAC | 181 bp |
| | csaA-06 | GGAATCTGGAGCACAAACTATATCAGTAG | |
| *pyr5-6* | UMP-19 | GGGAATTCGGTCGGATGGTGTAGTCGG | 420 bp |
| | UMP-20 | CACCACCATTGTTAGCAGCAATTGCAGAGATGATG | |
| | UMP-28 | CTTGCATCAAATCCAATGGCATC | 595 bp |
| | UMP-29 | GTTGACCCATAGCATCACCAG | |
| *rrpA* | Q-rrpA-01 | GAACGTCAAGAACTTGGTAAATTGTATCA | 182 bp |
| | Q-rrpA-02 | TAACCTACAGTTTGTAACCGAATGTTTAC | |
| *rrpB* | Q-rrpB-01 | GAACGTCAAGAACTTGGTAAAATGTATAA | 187 bp |
| | Q-rrpB-02 | GTGGATAACCTTTAGTTTTTAACCAAAC | |
| *rrpC* | Q-rrpC-01 | GGTGTTTATAGTAAAAAAGAATCATTC | 182 bp |
| | Q-rrpC-02 | CAACTATCCAAGAATTTATGAACATTTAC | |
| *dnmA* | Q-dnmA-01 | CACCAAAAGAGATTACAAGATTACATGG | 188 bp |
| | Q-dnmA-02 | GTTCTTGTTGTTCTTCTTCTTCATTTGG | |
| *drnA* | Q-drnA-01 | CAAGAAGAATCGGTTTCGATTATATCTTAC | 174 bp |
| | Q-drnA-02 | CACTACCATAATAACTATTATCAAAAATC | |
| *set1* | Q-set1-01 | GGTAAAAGAGGTGCTGCATCAAGTGCTAG | 170 bp |
| | Q-set1-02 | CTTGATTTTAATGATGCCAATGTAATTG | |
| *helF* | Q-helF-01 | GAAAGATATTTAGAAGAGGCTATTAATTTC | 163 bp |
| | Q-helF-02 | GAATAACCATCTCTTGAACCAAAGCACTAG | |

## 2.10 Plasmidliste

Die folgende Liste enthält alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Vektoren.

| Plasmid Name | Nummer | Inserts | Vektor | Insert |
|---|---|---|---|---|
| pJH1.2(am)tetO:Glu(su) | 11151 | cbfA(amber), bsr, glu(am), tetO | 3000 bp | 4400 bp |
| pGEM-T | | ampR, f1ori, lacZ, MCS, T7-Promotor, SP6-Promotor [Firma Promega] | 3000 bp | |
| pREMI:GFP | 11914 | gfp [FEY & COX 1997] | 6200 bp | |
| pGEM-cbfBp | 20050 | cbfB-Promotor; PCR-Fragment Primer cbfB-22/-23 an gDNA von AX2, in pGEM-T ligiert | 3000 bp | 842 bp |
| pREMI:GFP_cbfBp | 20068 | cbfB-Promotor aus Plasmid 20050 als BamHI-Fragment in pREMI:GFP (11914) kloniert | 6200 bp | 842 bp |
| pGEM-cbfAp_120/121 | 20005 | cbfA-Promotor; PCR-Fragment Primer CMBF-120/-121 an gDNA von AX2, in pGEM-T ligiert | 3000 bp | 600 bp |
| pREMI:GFP-cbfAp | 20043 | cbfA-Promotor aus Plasmid 2005 als BamHI-Fragment in pREMI:GFP (11914) kloniert | 6200 bp | 600 bp |
| pGEM-cbfAp | 20190 | cbfA-Promotor; PCR-Fragment Primer cAK-03/-04 an gDNA von AX2, in pGEM-T ligiert | 3000 bp | 504 bp |
| pGEM-cbfA_Ex2+Term | 20184 | cbfA Exon 2 + Terminator; PCR-Fragment Primer cAK-01/-02 an gDNA von AX2, in pGEM-T ligiert | 3000 bp | 3473 bp |
| pDVNTAP-NYFP | 20118 | TAPtag und yfp [MEIMA *et al.* 2007] | 8003 bp | |
| pGEM-NTAP-NYFP | 20186 | TAPtag und yfp; PCR-Fragment Primer cAK-05/-06 an Plasmid 20118, in pGEM-T ligiert | 3000 bp | 1270 bp |
| pGEM_CbfA-Ex1 | 20232 | cbfA Exon 1; PCR-Fragment Primer cAK-07/-08 an gDNA von AX2, in pGEM-T ligiert | 3000 bp | 186 bp |
| pGEM-cbfAP+Ex2+Term | 20228 | cbfA-Promotor, Exon 2 + Terminator; cbfAp als NcoI/BglII-Fragment aus Plasmid 20190 in BglII-Schnittstelle von 20184 kloniert | 3000 bp | 3977 bp |
| pGEM_cbfAp-NTAPNYFP+Ex2+Term | 20231 | TAP-CbfA: cbfA-Promotor, TAPtag, yfp, cbfA-Exon 2, cbfA-Terminator; NTAPNYFP als BamHI-Fragment aus Plasmid 20186 in 20228 kloniert | 3000 bp | 5247 bp |
| pISAR | 11339 | Expressionsvektor mit Neomycin-Resistenzkassette [MANIAK 1989] | 2750 bp | 2200 bp |
| pGEM_C_Sph_Hind | 20098 | C-Modul | 3000 bp | 230 bp |
| pGEM7-acaAP#1 | 11666 | acaA-Promotor | 3000 bp | 773 bp |
| cAK-Mut.141 | 20322 | wie 20231; Mutation H163A + D165A, Mutagenese mit Primer CMBF-141 | 3000 bp | 5247 bp |
| cAK-Mut.179 | 20325 | wie 20231; Mutation H414L, Mutagenese mit Primer CMBF-179 | 3000 bp | 5247 bp |
| cAK-Mut.142 | 20323 | wie 20231; Mutation K810A, Mutagenese mit Primer CMBF-142 | 3000 bp | 5247 bp |
| cAK-Mut.183 | 20327 | wie 20231; Mutation K810A + R812A, Mutagenese mit Primer CMBF-183 | 3000 bp | 5247 bp |
| pUi | 11549 | pyr5-6, cbfA-Intron | 3000 bp | 2234 bp |
| pUiVi | 11365 | pyr5-6, cbfA-Intron, Valin(UAC)-tRNA-Gen (invers) | 3000 bp | 2314 bp |
| pDXA-3H | 11637 | Expressionsvektor; ampR, neoR, Ddp2-ori, actin15-Promotor, MCS, C-terminaler His8-Tag [MANSTEIN *et al.* 1995] | 6085 bp | |
| pPB1 | 11604 | $cbfA^{(2579-3404)}$ in pDXA-3H [BECK 2002] | 6085 bp | 834 bp |
| pPB4c | 11831 | $cbfA^{(4-3403)}$ in pDXA-3H [BECK 2002] | 6085 bp | 3399 bp |

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Der CbfA-Suppressionsstamm JH.D

CbfA ist ein 1000 Aminosäuren langes Protein mit einer Molekülmasse von 115 kDa. Es wird von dem 3413 bp langen *cbfA*-Gen kodiert, das ein 410 bp langes Intron enthält. CbfA konnte aufgrund seiner Bindung an das C-Modul des Retrotransposons TRE5-A aufgereinigt werden [GEIER *et al.* 1996]. CbfA wird in vegetativ wachsenden Zellen und zu allen Zeitpunkten der multizellulären Entwicklung in gleichbleibender Menge gebildet [BECK 2002].

Zur Aufklärung der Funktion von *cbfA* sollte ein *Knockout* von *cbfA* durchgeführt werden. Dazu wurde AX2 mit einem Plasmid transformiert, das eine von 400 bp bzw. 900 bp der *cbfA*-Sequenz flankierte Blasticidin-Resistenz-Kassette (*bsr*) enthielt. Mittels homologer Rekombination sollte diese in *cbfA* eingeführt und das Gen dadurch zerstört werden. Trotz der Analyse mehrerer hundert Klone konnte keiner identifiziert werden, der die Fusion von *cbfA* und *bsr* trug [HORN 1999]. Dieses Ergebnis wurde als Hinweis darauf gewertet, dass es sich bei CbfA um ein für das Überleben der Zelle essentielles Protein handeln könnte.

In der Folge wurde deshalb versucht, eine Mutante zu erzeugen, in der das *cbfA*-Gen zwar nicht zerstört ist, CbfA jedoch stark unterexprimiert wird. Dieses wurde durch partielle Suppression eines *amber*(UAG)-Stopcodons im *cbfA*-Gen erreicht [BECK 2002]. Da der Suppressionsstamm JH.D die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet, soll seine Entstehung und das Prinzip der partiellen *cbfA*-Suppression ausführlich geschildert werden. Zur Erzeugung von JH.D wurde AX2 mit dem Plasmid pJH1.2(am)-tetO:Glu(su) transformiert (Abbildung 14). Dieses kodiert für das *cbfA*-Gen, welches an Position 1766-1768 ein *amber*-Stopcodon enthält, sowie für ein Blasticidin-Resistenz-Gen (*bsr*) und das *amber*-Suppressor-tRNA-Gen (*glu(su)*) unter Kontrolle des Tetracyclin-Operators (*tetO*). Durch homologe Rekombination wurde das *cbfA(amber)*-Gen (sowie *bsr* und *glu(su)*) in die genomische *cbfA*-Sequenz eingeführt. Die *cbfA*-Sequenz ab der KpnI-Schnittstelle wurde dadurch in 3´-Richtung verschoben. Der entstandene CbfA-Suppressionsstamm JH.D beinhaltet somit zwei Kopien des *cbfA*-Gens: Eine enthält das *amber*-Stopcodon, die andere besitzt kein Stopcodon, ist jedoch 5´-verkürzt. Theoretisch könnte diese Situation zu einer Instabilität des *cbfA-Locus* in JH.D führen. Es ist allerdings bislang keine Reversion zum Wildtyp beobachtet worden.

Um die *amber*-Stopcodon-Suppression durchführen zu können, mussten drei Bedingungen erfüllt sein: Erstens durfte das C-terminal-verkürzte Protein, das bei der partiellen *amber*-Suppression entsteht, keine biologische Wirkung haben. Daher wurde das *amber*-Stopcodon nach dem ersten Zinkfinger (AS 453) eingeführt, sodass die CTD mit dem für die DNA-Bindung wichtigen AT-Haken sowie die zweite Zinkfinger-Domäne im verkürzten Protein

fehlen. Zudem enthält es keine Kernlokalisierungssequenz mehr. Zweitens durfte die Expression der *amber*-Suppressor-tRNA zu keiner wesentlichen Veränderung des Phänotyps führen. Dieses konnte in Vorversuchen mit AX2-Transformanten gezeigt werden [DINGERMANN *et al.* 1990]. Der Grund für die geringe Beeinflussung des Phänotyps ist, dass nur ca. 4 % der Gene in *Dictyostelium discoideum* mit dem *amber*(UAG)-Stopcodon beendet werden [EICHINGER *et al.* 2005].

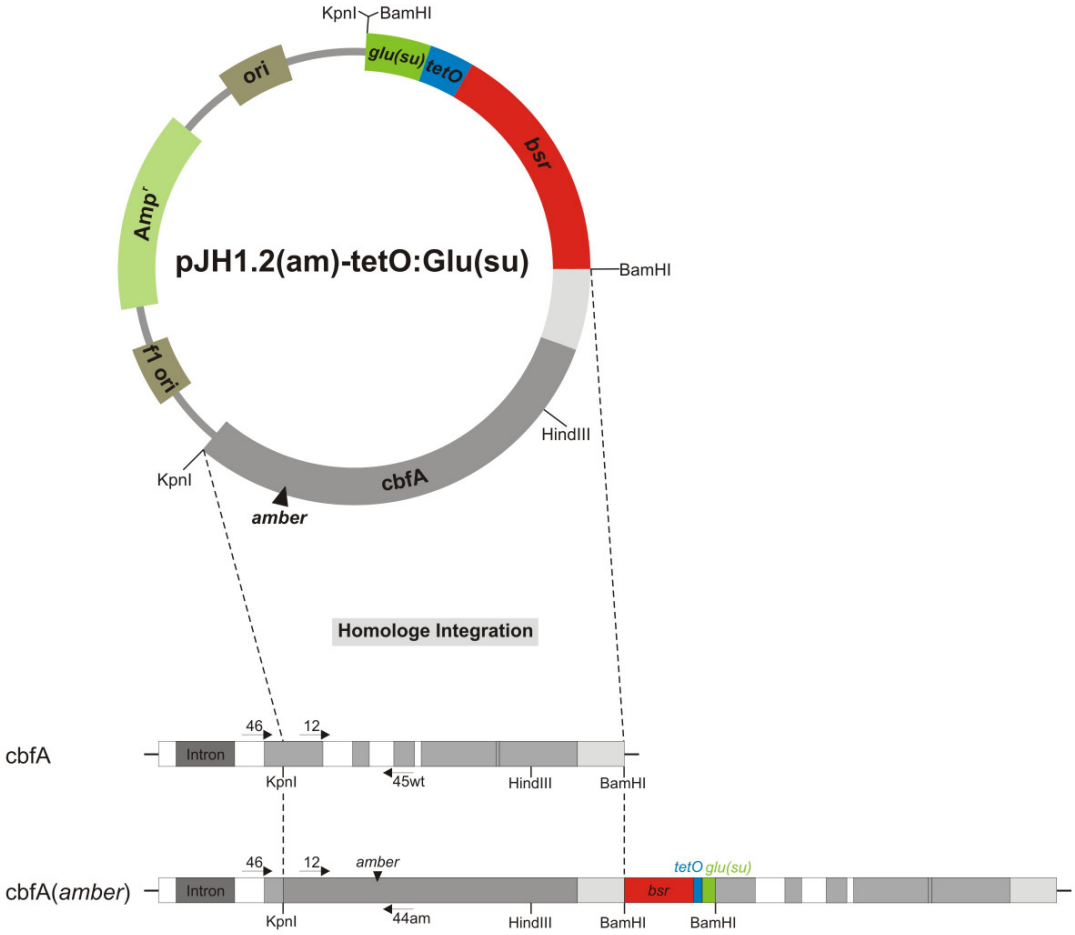



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Entstehung von JH.D und des *cbfA*-Locus in JH.D.** Durch Transformation mit dem Plasmid pJH1.2(am)-tetO:Glu(su) wurde mittels homologer Rekombination ein *amber*-Stopcodon an Position 1766-1768 des *cbfA*-Gens eingeführt (*cbfA*$^{amber}$). Blasticidin-resistente Transformanten wurden per PCR an genomischer DNA auf die korrekte Integration des Plasmids untersucht. Dazu dienten die Primer CMBF-45wt und CMBF-44am, die in Kombination mit CMBF-12 bzw. CMBF-46 entweder an Wildtyp-*cbfA* (CMBF-45wt) oder an *cbfA*$^{amber}$ (CMBF-44am) PCR-Produkte ergeben.

Drittens sollte die *amber*-Stopcodon-Suppression mit einer geringen Effizienz erfolgen, so dass CbfA stark unterexprimiert wird. DINGERMANN und Mitarbeiter zeigten eine Effizienz der *amber*-Stopcodon-Suppression von ca. 5 bis 20 % [DINGERMANN *et al.* 1990, 1992].

In Abbildung 15 ist die Funktionsweise der *amber*-Stopcodon-Suppression im Stamm JH.D schematisch dargestellt [nach Beck 2002].

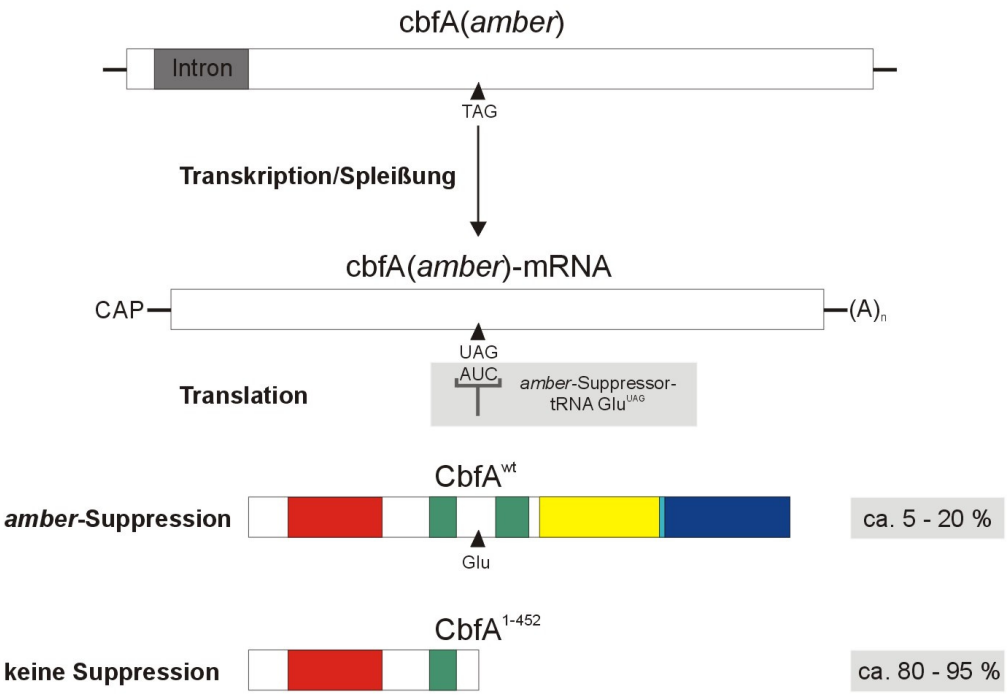



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der *amber*-Stopcodon-Suppression in JH.D.** Wird das Stopcodon UAG durch die *amber*-Suppressor-tRNA $Glu^{UAG}$ erkannt, kommt es zum Einbau von Glutaminsäure an Position 453 der wachsenden Polypeptidkette und zur Expression von Wildtyp-CbfA. Die Stopcodon-Suppression hat jedoch nur eine geringe Effizienz, so dass lediglich 5 bis 20 % der CbfA-Menge von AX2 exprimiert werden. In 80 bis 95 % der Fälle wird die Proteinbiosynthese am Stopcodon abgebrochen und somit ein C-terminal-verkürztes Protein ($CbfA^{1-452}$) exprimiert.

Das *cbfA(amber)*-Gen wird transkribiert, die Prä-mRNA gespleißt und prozessiert. Bei der Translation kommt es am *amber*-Stopcodon in 80 bis 95 % der Fälle zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese. In der Folge wird ein C-terminal-verkürztes Protein ($CbfA^{1-452}$) exprimiert. Es konnte mittels *Western Blot* von Gesamtzelllysaten im Vergleich zu Kernextrakten gezeigt werden, dass dieses Protein nicht in den Zellkern transportiert wird [LUCAS 2009]. Mit einer Effizienz von ca. 5 bis 20 % wird das *amber*(UAG)-Stopcodon von der *amber*-Suppressor-tRNA erkannt. Statt eines Abbruchs der Proteinsynthese kommt es dadurch zum Einbau von Glutaminsäure an Position 453 der wachsenden Polypeptidkette. In diesem Fall wird vollständiges CbfA-Protein gebildet. Die geringe Expression von *cbfA* ist einerseits ausreichend, um den Zellen das Überleben zu sichern. Andererseits ist sie gering genug, um die CbfA-Funktion durch Beobachtung des entstandenen Phänotyps zu analysieren.

Zum Nachweis des *amber*-Stopcodons im Stamm JH.D wurde eine PCR an genomischer DNA durchgeführt (Abbildung 16). In diesen Versuch wurde zusätzlich der ebenfalls verwendete Stamm JH.D[$ura^-$] einbezogen [BECK 2002]. Dieser ist aus JH.D entstanden und weist eine vollständige Deletion des *pyr5-6*-Gens auf, das für die UMP-Synthase kodiert. Als Vergleich wurde genomische DNA vom Wildtyp-Stamm AX2 eingesetzt.

Es wurden die Primer CMBF-12, -46, -44am und -45wt verwendet. Die Bindestellen in *cbfA* sind aus Abbildung 14 ersichtlich. An Wildtyp-*cbfA* entstehen nur mit dem Primer CMBF-45wt PCR-Produkte. Das *amber*-Stopcodon hingegen wird mit dem Primer CMBF-44am erfasst. Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass die Stämme JH.D und JH.D[ura$^-$] ein *cbfA*-Gen mit eingeführtem *amber*-Stopcodon enthalten.

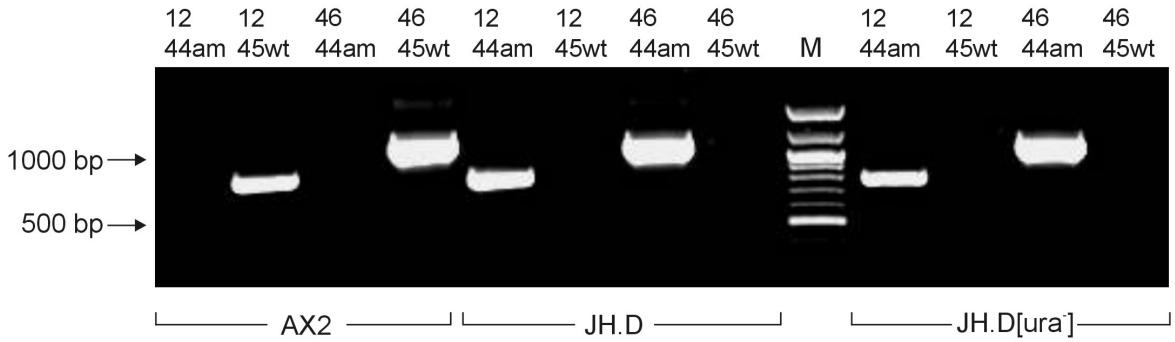



**Abbildung 16: Gelelektrophorese der Genotypisierung von AX2, JH.D und JH.D[ura$^-$] zum Nachweis von Wildtyp-*cbfA* bzw. des eingeführten *amber*-Stopcodons.** Die PCRs wurden mit den angegebenen CMBF-Primern durchgeführt. **M:** Marker (0,1 kb).

Zur Ermittlung der Funktionen von CbfA wurde zunächst die Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung des *cbfA*-Suppressionsstammes beobachtet [BECK 2002]. JH.D zeigte einen nahezu vollständigen Ausfall der Entwicklung. Der Beginn war um ca. 24 Stunden gegenüber AX2 verzögert und es traten nur sehr wenige, verkrüppelte Fruchtkörper auf. JH.D[ura$^-$] zeigte ebenfalls keine multizelluläre Entwicklung. Der Stamm JH.D weist außer einer eingeschränkten multizellulären Entwicklung weitere Phänotypen auf. Er zeigt eine geringere Phagocytoserate und damit ein eingeschränktes Wachstum auf Klebsiellen, sowie eine erhöhte Pinocytoserate und ein erhöhtes Zellvolumen in Flüssigmedium, jeweils bezogen auf den Wildtyp-Stamm AX2 [WINCKLER *et al.* 2001]. Durch seine Bindung an das C-Modul des Retrotransposons TRE5-A scheint CbfA dessen Expression und Retrotranspositionsaktivität zu beeinflussen. Im CbfA-defizienten Stamm JH.D wurden eine geringere RNA-Menge von TRE5-A sowie eine reduzierte Retrotranspositionsfrequenz beobachtet [BECK 2002].

Folgende drei Phänotypen von JH.D wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit von CbfA untersucht:

1. Multizelluläre Entwicklung (siehe Kapitel 3.3, 3.4 und 3.7)
2. Genregulation in vegetativen Zellen (siehe Kapitel 3.5)
3. Transkript-Level und Retrotranspositionsaktivität von TRE5-A (siehe Kapitel 3.9 und 3.10)

## 3.2 Untersuchung der Expression von CbfB

Der CbfA-Mangel verursacht einen distinkten Phänotyp (siehe Kapitel 3.1). Daher findet wahrscheinlich keine Kompensation durch CbfB statt. Entweder wird CbfB nicht exprimiert oder es besitzt nicht-überlappende Funktionen mit CbfA.

Das hypothetische Protein CbfB, dessen Expression bislang nicht nachgewiesen werden konnte, ist 1474 Aminosäuren lang und weist im Bereich der Jumonji-Domäne und der Zinkfinger eine Aminosäure-Identität von ca. 29 % zu CbfA auf (siehe Abbildung 17).

```
CbfA  MEELIKAPNSNFIIMSNQPYQTTSPEIVEDYIIKRGQPFVLTGTTQGWSRSNMFTLDFLS
CbfB  MNDVLES--YKFINGERIDYQILNSEIVKRRVIQDGMPIVISNTTKDWK-TDIFTPQWIK

CbfA  ERYSEMEL-----------------------------------INSPRNNETHTDLQGW
CbfB  DKYSNLEITVRIDGDSKNTEHWTVGQYIDYLNKMSSNQSNNNPNNPNNTNNNNSNFNQNQ

CbfA  RMKDFISYLQVSPEERN-----------------------------------PKHLYG
CbfB  QVFNQFNNPINNNNNSINNNNNNNNNNNPNSLNNNPNNNNNSNILNNLNNQNTIPSSFYY

CbfA  -KDIACPREWQEYLSH--KLQPQYSYKSRFDLVSHLPDYLQPETLLVYIGSNGTYTPGHI
CbfB  RKDIPCPPEWTKYIEEYNKLYGFLREKDNGDLVCDLPGHLQPNSTHICIDGSDYWSPGQR

CbfA  DMCGSLSQNLMVSSDQDAFAWWFIVPTEYKDEALKFWGDKGGD-VYNESR--FIRPIDLL
CbfB  EVAGSIGYNLMVYNGGTSKTYWFCTNSKDFEEASKFWKTKTGVPVDNDSKQMFIRLDDLS

CbfA  GAPFPIYVFKQRPGDFIFVPPDSVHQVVNCGPGISTKVAWNSISLKSLPISYFSSLPHTR
CbfB  KATFPVYFMEQKQGDLVIIPPGSIYQYFNVG-GKSMKLSWNRMSYQNLELSYRHILPIYR

CbfA  RMAKPELFRIKAIAYYTL--RKIMGDVEN-TNFNTIDVN-DVIDIIAPLLEIFHNILQTE
CbfB  SIKKKEHFPIKSIAFHSLINRLSLADECIKTQSNQILLNQEVSKEIYTLIKIVQNIQWCE

CbfA  SILIPKPNYPYCNGETIPFLQPFKYFNGDRIQ-DRRCDHCNSDIFNRCYHCETCKTDDGQ
CbfB  RVDLSVMEEERISSEEKP-------DHYNDIQFKKICIHCNGFIFNRAYLCRECQKEKSP

CbfA  -GKDFCFDCVSSGIGCEFHFKVMVLKEFISHSKLKKELSSFYEIYKNL------LAHSGR
CbfB  SLSLICIHCISEGA-CK-H-KSQILMESIQCSTMESIIENAKKILQSLCSLIERLGHSIS

CbfA  RPKEVDDIITKSTDRVSDECGFLTTATVAY-HVVFYSSQKKIKCHRCEKRFKKFSIIFCT
CbfB  -PVNLDELNQNPNGQLIINNNQVSPGTIAFNQVVLFQEDQKATCHQCKLARPRNKIAYCH

CbfA  N---------------CNARFCEQCVVNTFGQNFQVLMKRNEWECFCCKGLCDCSNCTSN
CbfB  KKVEEHGKKRKSRKMKCQKKFCSQCLWNRYQVQLVDCLSQRKWECLFCLNKCNCSACNRK
```

**Abbildung 17: Alignment der Aminosäuresequenzen von CbfA und CbfB.** Es ist der N-terminale Abschnitt mit hoher Sequenzhomologie dargestellt (AS 1-533). Der C-Terminus beider Proteine unterscheidet sich erheblich voneinander. Die JmjC-Domäne ist rot dargestellt.

Der C-Terminus beider Proteine unterscheidet sich allerdings gravierend. So enthält CbfB zusätzlich zum Poly-Asparagin- einen ausgedehnten Poly-Glutamin-Bereich, jedoch keinen AT-Haken.

Um die Expression von CbfB zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Es wurde Gesamt-RNA von vegetativen AX2-Zellen extrahiert, sowie von AX2-Zellen nach 6, 12 bzw. 18 Stunden multizellulärer Entwicklung. Diese diente als Matrize zur Synthese

komplementärer DNA (cDNA) mittels eines poly(dT)$_{18}$-Primers, der zum Start der Transkription an den polyA-Schwanz aller mRNAs binden kann. Die cDNA wurde in der folgenden PCR (siehe Abbildung 18) als Template eingesetzt. Die verwendeten Primer binden in verschiedenen Bereichen an *cbfB*: Primerpaar 1 und 2 in der 5´-Region, Primerpaar 3 in der 3´-Region. Zur Kontrolle der cDNA wurde eine PCR zum Nachweis des GAPDH-Gens (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, *gpdA*) mitgeführt. Da die Primerbindestellen von Q-GAPDH-01 und Q-GAPDH-02 (Spur 4) ein Intron überspannen, ermöglicht diese PCR zugleich eine Kontrolle auf eventuelle Verunreinigungen der cDNA mit genomischer DNA. An letzterer würde ein PCR-Produkt mit einer Länge von 247 bp entstehen, an cDNA jedoch ein nur 156 bp langes Produkt. Abbildung 18 zeigt, dass die cDNA frei von genomischer DNA ist und *cbfB* zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert wird.

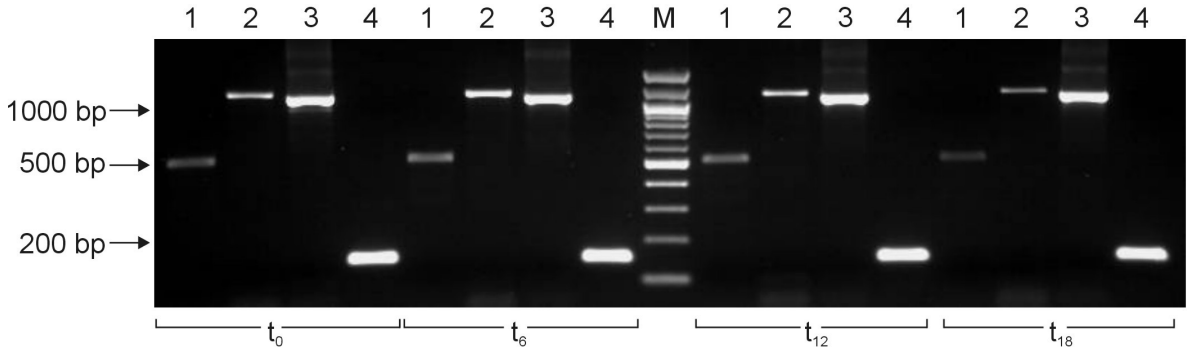



**Abbildung 18: Gelelektrophorese der PCR-Analyse zur Untersuchung der Expression von *cbfB* in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Dictyostelium discoideum*.** Die PCR erfolgte an cDNA vegetativer Zellen ($t_0$) und an cDNA von Zellen nach 6, 12 bzw. 18 Stunden multizellulärer Entwicklung ($t_6$, $t_{12}$ und $t_{18}$). **M:** Marker (0,1 kb).
**Verwendete Primerpaare: 1:** cbfB-11/cbfB-03; **2:** KO-DDB0191959-for1/KO-DDB0191959-rev1Hind; **3:** KO-DDB0191959-for2Hind/KO-DDB0191959-rev2Bam; **4:** Q-GAPDH-01/Q-GAPDH-02.

Ein weiteres Experiment unterstützt dieses Ergebnis. Ein 840 bp langer Bereich stromaufwärts von *cbfB* wurde in einen promotorlosen Vektor kloniert, der das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) enthält (Daten nicht gezeigt). Obwohl nach Transformation in AX2 keine Fluoreszenz zu beobachten war, konnte mittels RT-PCR mit Primern, die im GFP-Gen binden, eine Expression der GFP-mRNA eindeutig nachgewiesen werden. Folglich enthält der stromaufwärts von *cbfB* gelegene Bereich einen funktionellen Promotor. Zusammen mit den zuerst erläuterten Ergebnissen (siehe Abbildung 18) kann davon ausgegangen werden, dass *cbfB* exprimiert wird und es sich nicht um ein Pseudogen handelt. Die Funktion von CbfB ist jedoch noch ungeklärt.

## 3.3 Komplementation von JH.D mit rekombinantem CbfA

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, den CbfA-Suppressionsstamm JH.D mit rekombinantem CbfA zu komplementieren. Frühere Versuche zeigten eine Heilung des Entwicklungs-Phänotyps durch Gesamt-CbfA ($CbfA^{2-998}$, Plasmid pPB4c), nicht jedoch durch dessen C-terminale Domäne ($CbfA^{724-998}$, Plasmid pPB1) [BECK 2002, LUCAS 2009].

Da JH.D, wie in Abbildung 14 gezeigt, zwei Kopien des *cbfA*-Gens enthält, konnte bislang eine Rekombination zwischen genomischer und Plasmid-kodierter CbfA-Kopie zu einem funktionellen Gen infolge der Transformation nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher sollte CbfA mit einem Tag fusioniert werden. Die dadurch bedingte Expression eines größeren Fusionsproteins sollte eindeutig belegen, dass das mittels Plasmid eingeführte Gen exprimiert wird. Frühere Komplementationsversuche wurden mit *cbfA* unter der Kontrolle des starken Aktin-15-Promotors durchgeführt (Stamm JH.D[pPB4c]). Um der physiologischen Situation näher zu kommen, sollte *cbfA* in der vorliegenden Arbeit durch den eigenen Promotor und Terminator kontrolliert werden.

Zuvor wurde die stromaufwärts von *cbfA* gelegene Region (530 bp) in einen promotorlosen Vektor mit GFP-Reportergen kloniert. Durch die Transformation des Vektors in AX2 und Analyse der Expression des Reportergens konnte die Funktionsfähigkeit als Promotor bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Der Promotor wurde vor *cbfA*-Exon 2 ($CbfA^{61-1000}$) in pGEM-T kloniert. Anschließend wurden zwischen *cbfA*-Promotor und *cbfA* die Gene für einen TAP-Tag (*tandem affinity purification*) und das gelb fluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) eingefügt, so dass es bei der Expression zur N-terminalen Fusion dieser Proteine an CbfA kommt. Auf Exon 1, das für die ersten 60 Aminosäuren von CbfA kodiert, wurde verzichtet, da es für keine konservierten Proteindomänen kodiert und für die Funktion von CbfA als vernachlässigbar angesehen wurde.

Das resultierende Plasmid TAP-CbfA (Abbildung 19) wurde gemeinsam mit dem Plasmid pISAR in JH.D transformiert. Dadurch wurde eine Selektion positiver Transformanten mit dem Antibiotikum G418 ermöglicht, da pISAR Neomycin-Resistenz vermittelt. Der zeitliche Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse der Transformanten ist anhand eines Fließschemas in Abbildung 20 dargestellt.

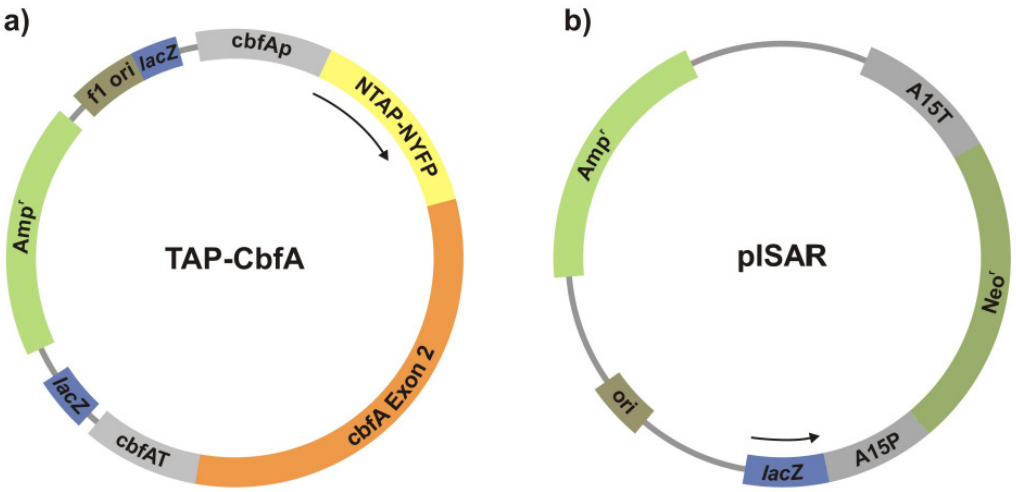



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der zur Doppeltransformation von JH.D verwendeten Plasmide TAP-CbfA und pISAR. a)** Komplementationsplasmid TAP-CbfA. Es kodiert für das Exon 2 von *cbfA*, welches N-terminal mit einem TAP-Tag (NTAP) und dem gelb fluoreszierenden Protein (NYFP) fusioniert ist. Es steht unter Kontrolle des *cbfA*-Promotors (cbfAp) und -Terminators (cbfAT). **b)** Plasmid pISAR (vermittelt im Rahmen der Doppeltransformation die Resistenz gegen G418 ($Neo^r$)). Abkürzungen: **$Amp^r$:** Ampicillin-Resistenz; **f1 ori:** f1-Replikationsursprung; ***lacZ*:** β-Galactosidase-Gen; **A15P:** Aktin-15-Promotor; **A15T:** Aktin-15-Terminator.

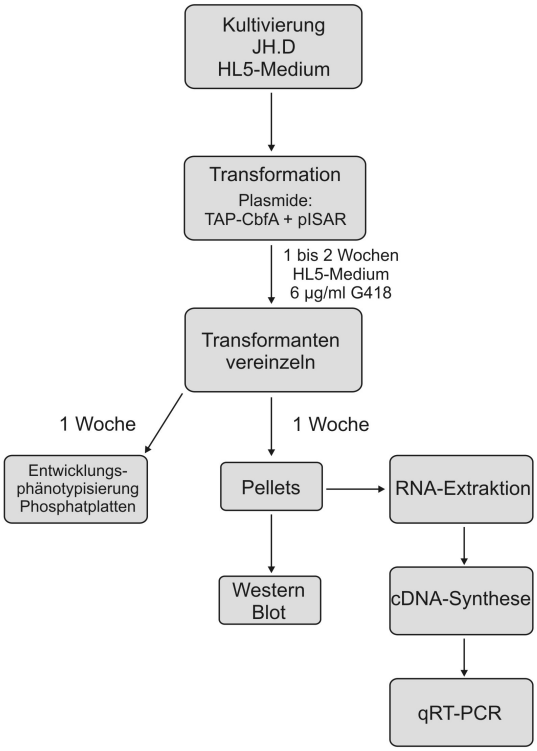



**Abbildung 20: Fließschema zum zeitlichen Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse positiver Transformanten in JH.D.** Dargestellt ist die Doppeltransformation zur Komplementation mit TAP-CbfA.

In Abbildung 21 ist die *Western-Blot*-Analyse von Gesamtzelllysaten von fünf Transformanten im Vergleich zu AX2 und JH.D dargestellt. CbfA und TAP-CbfA wurden durch den monoklonalen Antikörper 7F3 detektiert, der gegen die C-terminale Domäne von CbfA gerichtet ist. AX2 exprimiert ausschließlich Wildtyp-CbfA mit einer Masse von 115 kDa. In JH.D war hingegen nur eine schwache Bande zu erkennen, da dieser Stamm lediglich ca. 5 % der Wildtyp-CbfA-Menge produziert. Die fünf JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA]-Transformanten exprimierten ebenfalls geringe Mengen von Wildtyp-CbfA, zeigten allerdings eine starke Expression eines Proteins mit einer Molekülmasse von etwa 160 kDa. Hierbei handelte es sich um das Fusionsprotein aus CbfA, TAP-tag und YFP (TAP-CbfA).

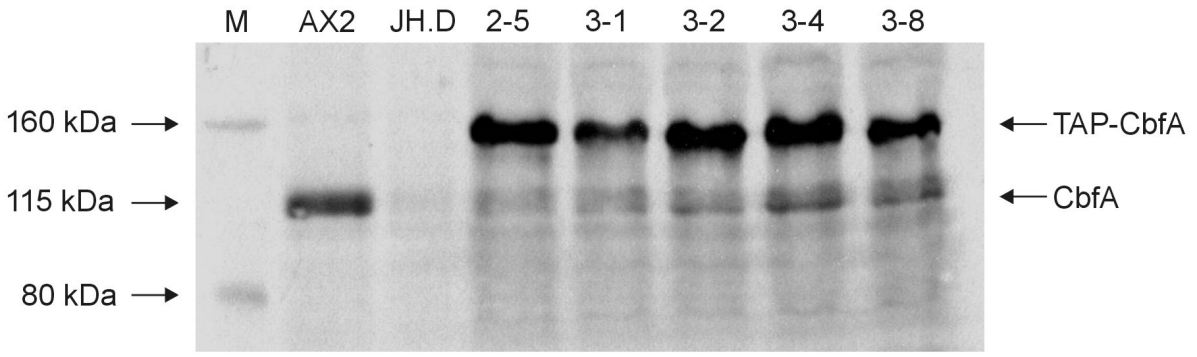



**Abbildung 21: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA].** Die Gesamtzelllysate von jeweils 1 x $10^6$ Zellen wurden auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion von CbfA erfolgte durch den Antikörper 7F3, der gegen die CTD von CbfA gerichtet ist. **M:** Marker (Page Ruler, Fermentas).

In TAP-CbfA sollte die gelbe Fluoreszenz des YFP-Anteils das Auffinden positiver Transformanten und deren Vereinzelung erleichtern sowie die Untersuchung der Kernlokalisierung ermöglichen. Allerdings war in keinem der fünf Klone eine gelbe Fluoreszenz erkennbar. Möglicherweise ist der Grund dafür in der N-terminalen Fusion von YFP an CbfA zu suchen, da eventuell keine korrekte Faltung des Proteins erfolgte und so eine Fluoreszenz verhindert wurde. Trotzdem kann die Fusion mit einem TAP-Tag als vorteilhaft gewertet werden. Erstens kann der TAP-Tag in späteren Arbeiten einer Aufreinigung des Proteins dienen. Zweitens wurde er in einer parallelen Arbeit zur Durchführung von Chromatin-Immunopräzipitationen genutzt [DÖLZ 2010]. Drittens, und im Hinblick auf die vorliegende Arbeit am wichtigsten, ist durch den Größenunterschied von CbfA und TAP-CbfA eindeutig zu erkennen, dass das vom Plasmid kodierte Protein exprimiert wurde und eine Rekombination zwischen genomischer und Plasmid-kodierter Kopie ausgeschlossen werden kann.

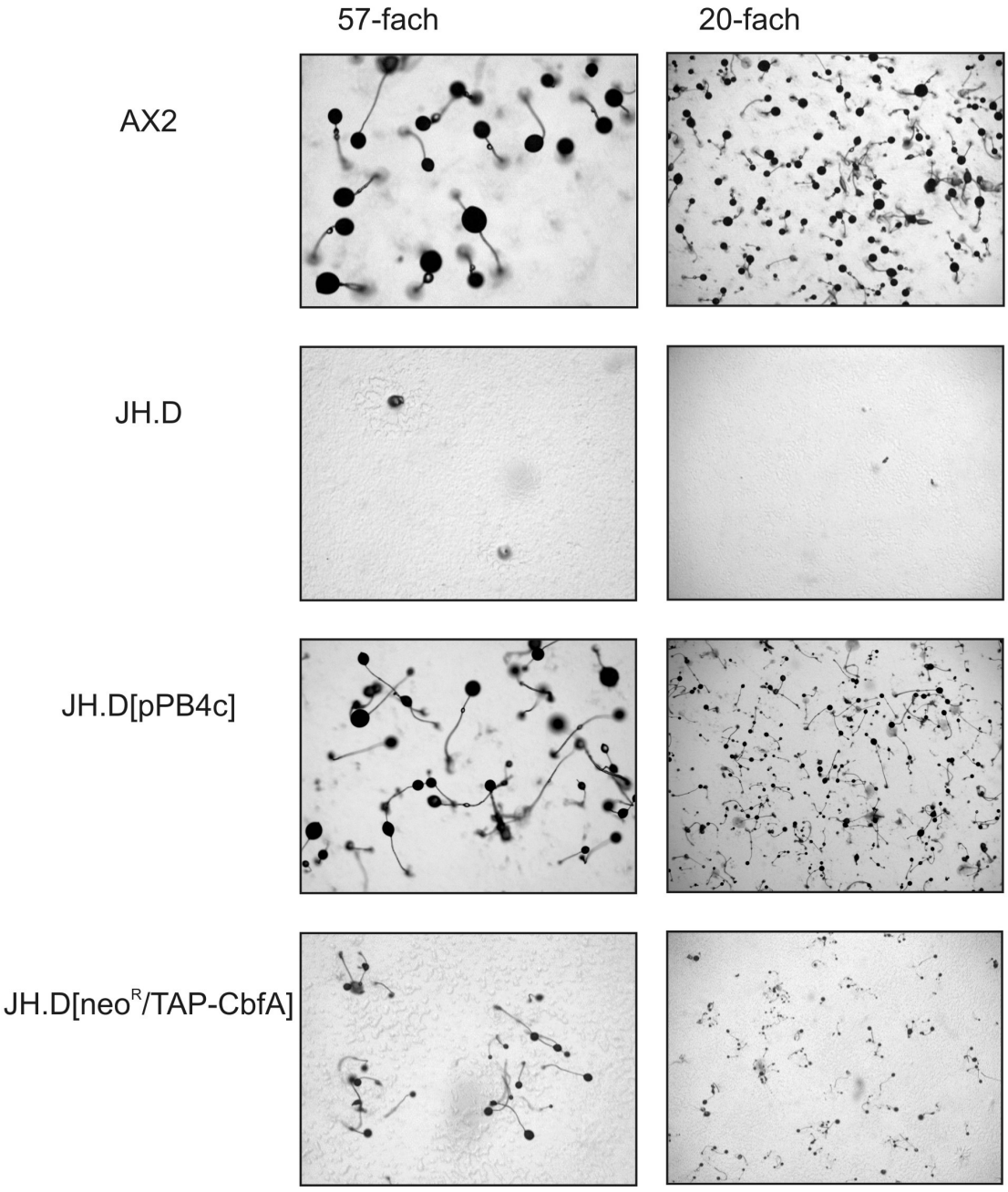



**Abbildung 22: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] im Vergleich zu AX2, JH.D und JH.D[pPB4c].** Jeweils 1 x $10^8$ Zellen wurden auf Phosphatagar-Platten ausgebracht und die Entwicklung wurde nach 48 Stunden dokumentiert. Alle Aufnahmen sind in 57-facher (links) bzw. 20-facher Vergrößerung (rechts) dargestellt.

Die Analyse des Entwicklungsphänotyps der JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA]-Transformanten ist in Abbildung 22 im Vergleich zu AX2 und JH.D dargestellt. Zum Vergleich mit der Komplementation aus einer früheren Arbeit [BECK 2002] wurde ebenfalls JHD[pPB4c] mitgeführt, der CbfA$^{2\text{-}998}$ vom starken Aktin-15-Promotor aus exprimiert. Von den JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA]-Transformanten ist Klon 2-5 gezeigt, der sich von allen fünf Klonen am besten entwickelt hatte. Deutlich zu sehen ist, dass JH.D[pPB4c] sich fast identisch zu AX2 entwickelt. Die Fruchtkörper waren lediglich etwas kleiner und zahlreicher.

JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] hingegen zeigte deutlich weniger und kleinere Fruchtkörper. Der Frage, ob dieses an einer eingeschränkten Funktionalität des CbfA$^{61-1000}$-Proteins durch das Fehlen von *cbfA*-Exon 1 liegen könnte, wird später noch nachgegangen. Zunächst soll eine weitere Beobachtung an den JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA]-Transformanten vorgestellt werden.
Nach etwa dreiwöchiger Kultivierung zweier Klone, die laut erstem *Western Blot* (siehe Abbildung 21) ungefähr gleiche Mengen des Fusionsproteins exprimierten, wurden erneut Gesamtzelllysate per *Western Blot* analysiert (Abbildung 23 A).

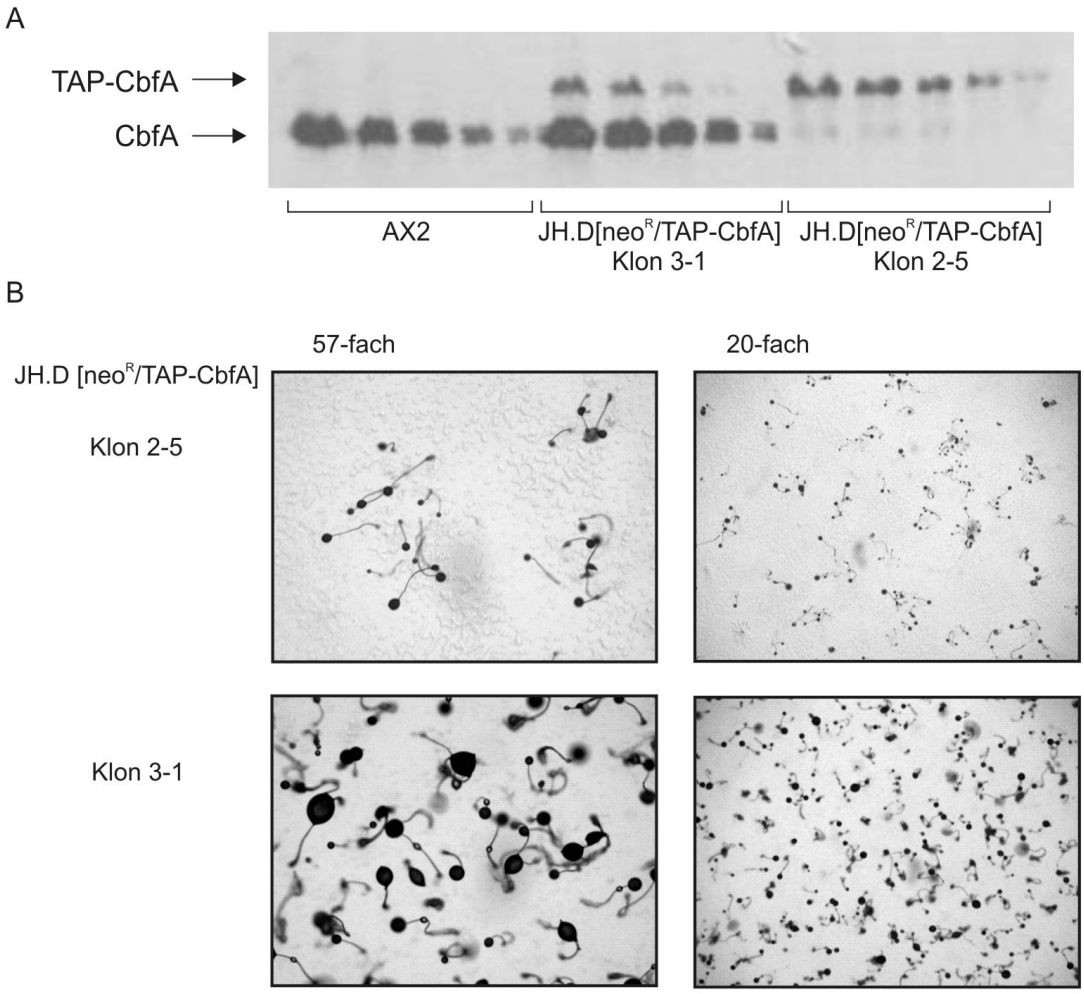



**Abbildung 23: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] nach Kultivierung über mehrere Generationen.** Dargestellt sind zwei Klone aus verschiedenen Transformationen, die bei der ersten Kontrolle mittels *Western Blot* identische Mengen an TAP-CbfA zeigten. **A:** Ein erneuter *Western Blot* nach Kultivierung über drei Wochen wies nach, dass Klon 2-5 eine unveränderte Menge von TAP-CbfA produzierte, während die Expression des Fusionsproteins in Klon 3-1 stark zugunsten von Wildtyp-CbfA zurückgegangen war. Es wurden jeweils fünf verschiedene Mengen des Gesamtzelllysates aufgetragen. Als Vergleich ist die CbfA-Expression in AX2 dargestellt. **B:** Jeweils 1 x $10^8$ Zellen wurden auf Phosphatagar-Platten ausgebracht und die Entwicklung wurde nach 48 Stunden dokumentiert. Alle Aufnahmen sind 57-fach (links) bzw. 20-fach vergrößert (rechts) dargestellt.

Nun war zu beobachten, dass Klon 2-5 unverändert das Fusionsprotein exprimierte, wohingegen Klon 3-1 nicht nur die Expression von TAP-CbfA fast vollständig einstellte, sondern sogar mit AX2 vergleichbare Mengen von Wildtyp-CbfA produzierte. Diese Tatsache

spiegelte sich auch in der Fähigkeit von Klon 3-1 zur multizellulären Entwicklung wider (Abbildung 23 B). Anzahl und Größe der Fruchtkörper waren nun vergleichbar mit JH.D[pPB4c] und AX2 (siehe Abbildung 22).

Möglicherweise ist der Grund dafür in der Beschaffenheit des *cbfA*-Locus in JH.D und der Art der Transformation zu suchen. Wie bereits erwähnt, enthält der Stamm JH.D zwei Kopien des *cbfA*-Gens. Die erste trägt das *amber*-Stopcodon an Position 1766-1768, die zweite enthält zwar kein solches Stopcodon, ist jedoch nicht vollständig, sondern 5´-verkürzt. Bislang wurde selbst nach Kultivierung über einen langen Zeitraum keine Reversion des Stammes JH.D zum Wildtyp beobachtet. Der *cbfA*-Locus gilt somit als stabil. Wird nun allerdings das Plasmid TAP-CbfA gemeinsam mit pISAR in JH.D transformiert und mit G418 auf positive Klone selektiert, könnte sich diese Situation ändern. Die Selektion mit G418 bewirkt in *Dictyostelium discoideum* eine Aufnahme von bis zu 500 Plasmiden in eine Zelle, die tandemartig ins Genom integriert werden [NELLEN & FIRTEL 1985; PANG *et al.* 1999]. Wird ein Plasmid in der Nähe des *cbfA*-Locus integriert, resultiert daraus gegebenenfalls eine Instabilität des Genomabschnitts bzw. könnte es durch homologe Rekombination zur Rekonstitution eines intakten *cbfA*-Gens kommen.

## 3.4 Komplementation von JH.D[ura$^-$] mit rekombinantem CbfA

Um der oben beschriebenen Problematik zu entgehen, wurde der Komplementationsversuch mit TAP-CbfA zusätzlich im Stamm JH.D[ura$^-$] durchgeführt. Dieser Stamm exprimiert ebenfalls nur etwa 5 % der Wildtyp-CbfA-Menge. Zudem weist er eine komplette Deletion des *pyr5-6*-Gens auf, welches für die UMP-Synthase kodiert. Daher ist JH.D[ura$^-$] Uracil-auxotroph und kann in Minimalmedium (FM-Medium) ohne Uracil-Zusatz nicht wachsen.
Der Stamm JH.D[ura$^-$] ist unter anderem gekennzeichnet durch:

- eine im Gegensatz zu AX2 stark verlängerte Generationszeit,
- große Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Zentrifugation mit Geschwindigkeiten, die von AX2 und JH.D problemlos toleriert werden,
- erschwerte Transformierbarkeit,
- bis zu 12-wöchige Wartezeiten auf sichtbare Kolonien nach einer Transformation,
- und vor allem die Tatsache, dass JH.D[ura$^-$] im Gegensatz zu JH.D nicht in der Lage ist, in Schüttelkultur zu wachsen und daher in Petrischalen kultiviert werden muss.

In JH.D[ura$^-$] wurde das Plasmid TAP-CbfA gemeinsam mit dem Plasmid pUiVi transformiert. Letzteres kodiert für das *pyr5-6*-Gen und ermöglicht positiven Transformanten ein Überleben in Uracil-freiem Medium. Der große Vorteil einer Selektion mittels Uracil-Prototrophie ist, dass nur eine Kopie des entsprechenden Plasmids aufgenommen wird [KALPAXIS *et al.* 1990]. Abbildung 24 B zeigt den Aufbau von pUiVi.

In das *pyr5-6*-Gen wurde das Intron von *cbfA* eingeführt, das ein invers orientiertes Valin-tRNA-Gen enthält (sogenannte „TRE-Falle“). Diese ermöglicht im weiteren Verlauf der Experimente eine Untersuchung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in Abhängigkeit von TAP-CbfA [vgl. BECK *et al.* 2002; SIOL *et al.* 2006a; Kapitel 3.10]. Zu diesem Zweck können ebenfalls Mutationen in verschiedene Bereiche von *cbfA* eingeführt werden, um den Einfluss bestimmter Domänen auf die Funktion von CbfA bei der Mobilisierung des Retrotransposons zu untersuchen.

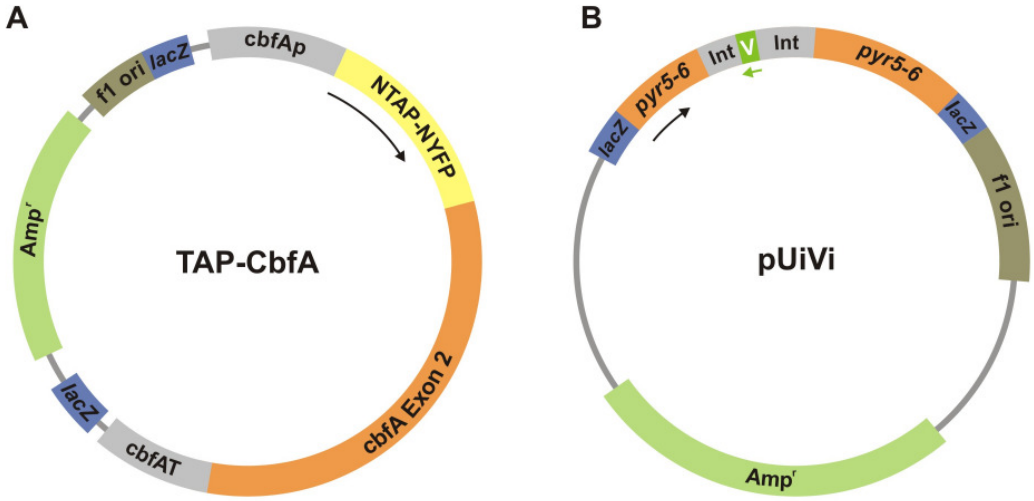



**Abbildung 24: Schematische Darstellung der zur Doppeltransformation von JH.D[ura$^-$] verwendeten Plasmide TAP-CbfA und pUiVi. A:** Komplementationsplasmid TAP-CbfA. Es kodiert für das Exon 2 von *cbfA*, welches N-terminal mit einem TAP-Tag (NTAP) und dem gelb fluoreszierenden Protein (NYFP) fusioniert ist. Es steht unter Kontrolle des *cbfA*-Promotors (cbfAp) und -Terminators (cbfAT). **B:** Plasmid pUiVi (vermittelt im Rahmen der Doppeltransformation eine Uracil-Prototrophie (*pyr5-6*-Gen)). Abkürzungen: **Amp$^r$:** Ampicillin-Resistenz-Gen; **f1 ori:** f1-Replikationsursprung; ***lacZ*:** β-Galactosidase-Gen; **Int:** Intron von *cbfA*; **V:** Valin-tRNA-Gen.

Der zeitliche Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse der Transformanten in JH.D[ura$^-$], sowie die verwendeten Medien sind Abbildung 25 zu entnehmen. Obwohl kein ursächlicher Zusammenhang zwischen der *pyr5-6*-Deletion und der CbfA-Funktion besteht, zeigten die JH.D[ura$^-$]-Zellen ein von JH.D abweichendes Verhalten. Bemerkenswert ist vor allem die lange Zeitspanne bis zum Auftreten von Klonen nach der Transformation. In Einzelfällen wurden die angegebenen Durchschnittswerte von 4 bis 12 Wochen sogar noch überschritten. Entsprechend verlängerte sich die Dauer bis zur Analyse der Transformanten mittels *Western Blot* bzw. Entwicklungsphänotypisierung auf Phosphatagar-Platten. Der Erhalt großer Zellzahlen für weitere Versuche wurde durch die Notwendigkeit der Kultivierung in Petrischalen erschwert. Trotz Komplementation mit TAP-CbfA und UMP-Synthase waren die Transformanten nicht in der Lage, in Schüttelkultur zu wachsen. Dieses steht im Gegensatz zum *pyr5-6-Knockout*-Stamm DH1. Dieser muss ebenfalls in Petrischalen kultivert werden, kann jedoch nach erfolgreicher Komplementation mit *pyr5-6* wieder in Schüttelkultur wachsen.

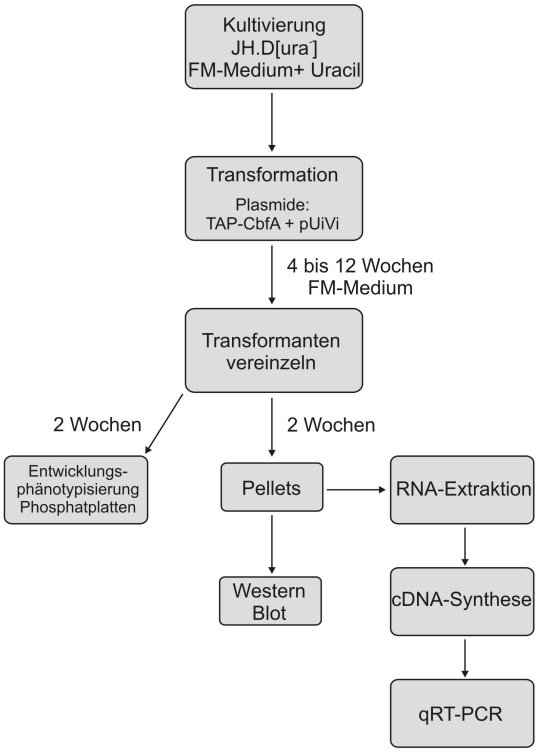



**Abbildung 25: Fließschema zum zeitlichen Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse positiver Transformanten in JH.D[ura$^-$].** Dargestellt ist die Doppeltransformation zur Komplementation mit TAP-CbfA.

In Abbildung 26 ist die *Western-Blot*-Analyse von Gesamtzelllysaten der fünf positiven Klone aus dem ersten Transformations-Durchgang im Vergleich zu AX2 und JH.D[ura$^-$] dargestellt.

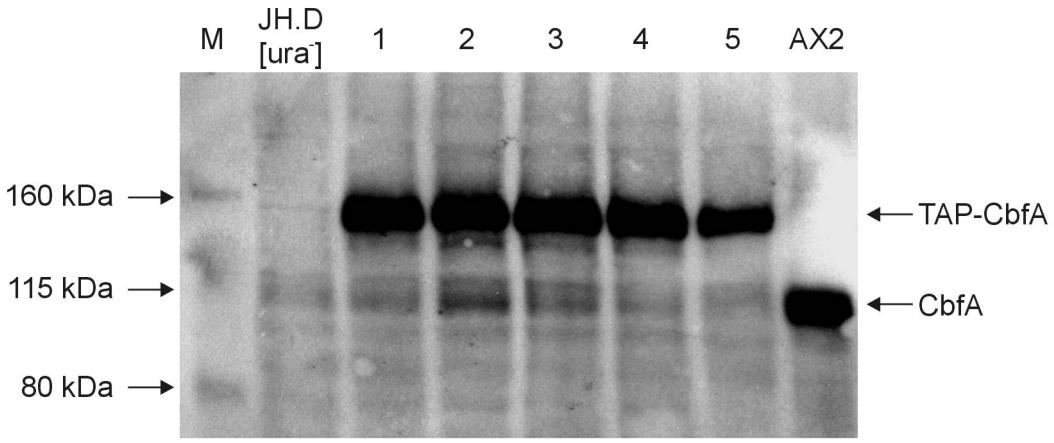



**Abbildung 26: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA].** Die Gesamtzelllysate von jeweils 1 x $10^6$ Zellen wurden auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion von CbfA erfolgte mit dem CbfA-spezifischen Antikörper 7F3. **M:** Marker (Page Ruler, Fermentas).

AX2 exprimierte ausschließlich Wildtyp-CbfA mit einer Molekülmasse von 115 kDa. In JH.D[ura$^-$] war nur eine schwache Bande erkennbar, da dieser Stamm lediglich ca. 5 % der Wildtyp-CbfA-Menge produziert. Die fünf JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]-Transformanten exprimierten ähnliche Mengen Wildtyp-CbfA wie JH.D[ura$^-$]. Zusätzlich zeigten sie jedoch eine starke

Expression des Fusionsproteins aus CbfA, TAP-Tag und YFP (TAP-CbfA) mit einer Masse von etwa 160 kDa.

Abbildung 27 zeigt die multizelluläre Entwicklung positiver JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]-Transformanten sowohl auf Phosphatagar-Platten, als auch auf konfluent mit *Klebsiella planticola* bewachsenen 1/5-SM-Platten. Dargestellt ist ein repräsentativer Klon im Vergleich zu AX2 und JH.D[ura$^-$]. Alle weiteren Klone der ersten Transformation zeigten in beiden Versuchen ein ähnliches Verhalten wie Klon 1.

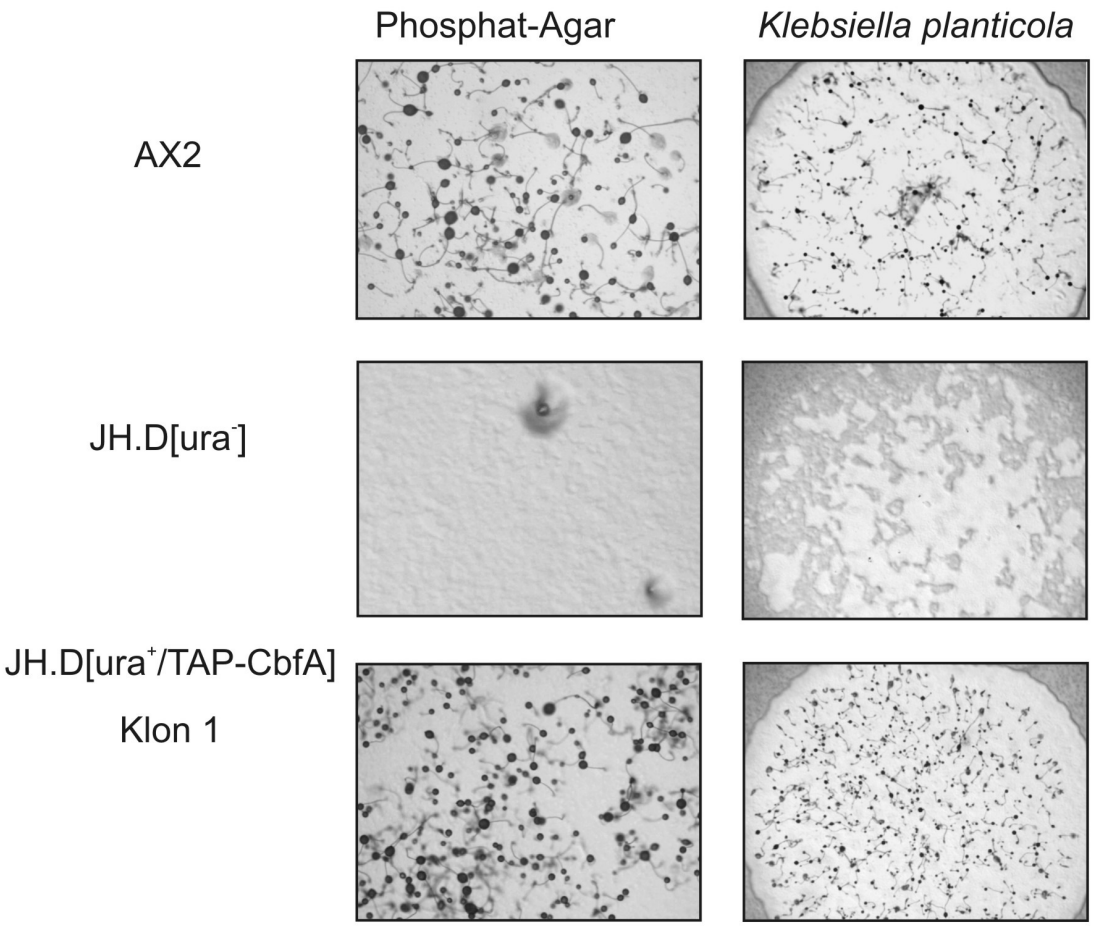



**Abbildung 27: Entwicklungsphänotypisierung von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] im Vergleich zu AX2 und JH.D[ura$^-$].** Jeweils 1 x $10^8$ Zellen wurden auf Phosphatagar-Platten ausgebracht und die Entwicklung wurde nach 48 Stunden dokumentiert (Abbildungen links). Jeweils 1 x $10^6$ Zellen wurden in einem Volumen von 50 µl Phosphatpuffer auf konfluent mit *Klebsiella planticola* bewachsene 1/5-SM-Platten getropft und ebenfalls nach 48 Stunden dokumentiert (Abbildungen rechts). Alle Aufnahmen sind in 57-facher (links) bzw. 16-facher Vergrößerung (rechts) dargestellt.

Auf Phosphatagar-Platten und auf Klebsiellen-Rasen ist jeweils deutlich erkennbar, dass die Komplementation des Entwicklungsphänotyps erfolgreich war. Die Fruchtkörper von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] entsprechen in Größe und Anzahl nahezu denen von AX2. In einem zweiten Transformations-Durchgang entstanden weitere acht Klone, die TAP-CbfA exprimierten. Sieben dieser Klone zeigten ein AX2-ähnliches Verhalten während der multizellulären Entwicklung auf Phosphatagar und Klebsiellen-Rasen. Lediglich ein Klon

bildete deutlich weniger Fruchtkörper (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche zeigen, dass eine Wiederherstellung der multizellulären Entwicklung in JH.D[ura$^-$] durch Transformation mit dem Plasmid TAP-CbfA möglich ist. Daher kann das Fehlen von *cbfA*-Exon 1 als Ursache für die geringe Heilung des Entwicklungsphänotyps im Stamm JH.D sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden. CbfA$^{61\text{-}1000}$ stellt offensichtlich ein funktionelles Protein dar.

Auch nach Kultivierung über einen langen Zeitraum wurde das CbfA-Fusionsprotein im JH.D[ura$^-$]-Hintergrund unverändert gebildet (Daten nicht gezeigt). Eine Zunahme der Expression von Wildtyp-CbfA konnte nicht beobachtet werden. Zusammen mit den Ergebnissen bezüglich Morphologie und Anzahl der Fruchtkörper kann das System der Komplementation mit TAP-CbfA in JH.D[ura$^-$] durch Selektion mit einem Prototrophiemarker als stabiler angesehen werden als die Selektion mit einem *Multicopy*-Antibiotika-Resistenzgen in JH.D.

## 3.5 Genregulation in Abhängigkeit von CbfA

### 3.5.1 Festlegung eines neuen Referenzgens für die qRT-PCR

Im Rahmen von *Microarray*- und RNA-Sequenzierungs-Experimenten in AX2 und JH.D konnten mehrere hundert durch CbfA differentiell exprimierte Gene identifiziert werden [LUCAS *et al.* 2009]. Die Überprüfung differentiell exprimierter Gene mittels qRT-PCR wurde jeweils auf GAPDH (*gpdA*) bezogen, da in den *Microarray*-Experimenten kein Einfluss von CbfA auf die Regulation von GAPDH festgestellt wurde. Später erhobene Daten der RNA-Sequenzierungs-Experimente ließen jedoch vermuten, dass CbfA einen Einfluss bis zu Faktor 2 auf die Expression von GAPDH haben könnte (unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grunde wurde *catA* als neues Referenzgen festgelegt, da weder im *Microarray* noch in der RNA-Sequenzierung und der qRT-PCR ein Einfluss von CbfA auf dessen Expression erkennbar war.

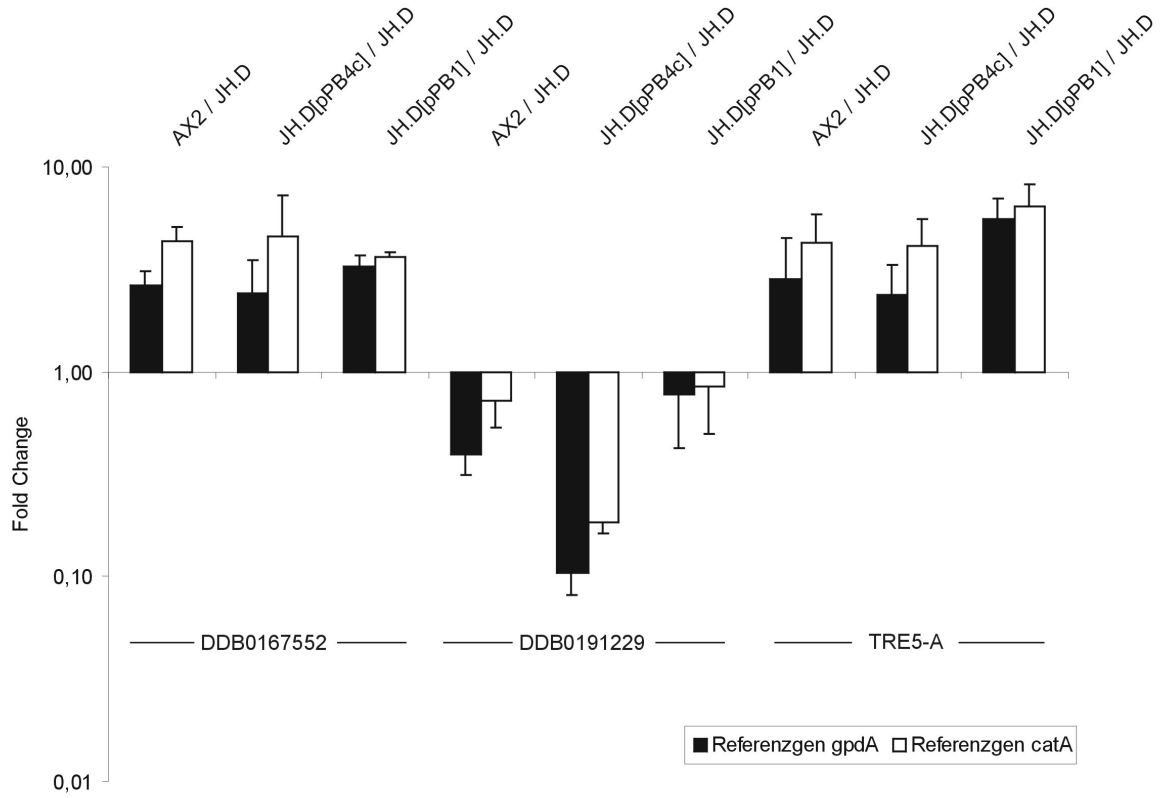



**Abbildung 28: Regulation differentiell exprimierter Gene in AX2, JH.D[pPB4c] und JH.D[pPB1] zu JH.D mittels qRT-PCR.** Es wurden die relative Expression von jeweils einem positiv und einem negativ durch CbfA bzw. dessen CTD regulierten Gen sowie von TRE5-A gemessen. Dargestellt ist der *Fold Change*, wobei Werte > 1 eine höhere Expression des Gens in AX2 bzw. JH.D[pPB4c] oder JH.D[pPB1], Werte < 1 eine geringere Expression des Gens in diesen Stämmen gegenüber JH.D bedeuten. Der *Fold Change* ist je einmal normalisiert auf GAPDH (*gpdA*) als Referenzgen (schwarze Balken) und einmal bezogen auf das neu definierte Referenzgen *catA* (weiße Balken) dargestellt. n = 3; ± SD.

Abbildung 28 zeigt die Expression je eines positiv und eines negativ durch CbfA regulierten Gens sowie von TRE5-A im Vergleich von AX2 zu JH.D. Ebenfalls dargestellt ist die

Änderung der Expression dieser Gene durch Komplementation von JH.D mit CbfA$^{2\text{-}998}$ (JH.D[pPB4c]) und CbfA$^{724\text{-}998}$(JH.D[pPB1]). Die Expressionsänderungen sind einmal auf *gpdA* bezogen (schwarze Balken) und einmal auf *catA* (weiße Balken).
Es wird deutlich, dass die Wahl des Referenzgens lediglich einen geringfügigen Einfluss auf die Zahlenwerte, nicht jedoch auf die biologische Aussage hat. Da die Sequenzierungsdaten erst gegen Ende der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, erfolgten die Berechnungen von Genregulationen in dieser Arbeit zum Teil bezogen auf *gpdA*, zum Teil bezogen auf *catA*.

### 3.5.2 Einteilung CbfA-abhängiger Gene in Cluster

In *Microarray*-Experimenten wurden die Stämme AX2 und JH.D miteinander verglichen. Da frühere Versuche auf eine eigenständige genregulatorische Funktion der C-terminalen Domäne von CbfA hinwiesen, wurde zudem JH.D[CbfA$^{724\text{-}998}$] mit JH.D verglichen. Die resultierenden differentiell exprimierten Gene wurden in sechs Cluster gruppiert (Tabelle 1) [LUCAS *et al.* 2009].

**Tabelle 1: Übersicht der im *Microarray* festgelegten Cluster von CbfA-abhängig exprimierten Genen.** Tabelle verändert nach LUCAS 2009.

| Cluster | I | II | III | IV | V | VI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gene | 37 | 8 | 35 | 4 | 60 | 18 |
| Definition | AX2 > JH.D | AX2 > JH.D | AX2 > JH.D | AX2 < JH.D | AX2 < JH.D | AX2 < JH.D |
| Einfluss von CbfA$^{724\text{-}998}$ | kein Effekt | verstärkt Effekt | kehrt Effekt um | verstärkt Effekt | kehrt Effekt um | kein Effekt |

Cluster I bis III beinhalten die von CbfA positiv regulierten Gene. Dabei hat die CTD (CbfA$^{724\text{-}998}$) keinen Einfluss auf die Expression der Gene in Cluster I. Die Expression der Gene aus Cluster II wird durch die CTD zusätzlich verringert, wohingegen die Expression von Cluster-III-Genen, die in JH.D geringer ist als in AX2, durch die CTD allein wiederhergestellt werden kann. Entsprechend verhält es sich bei den Clustern IV bis VI, die solche Gene zusammenfassen, die von CbfA negativ reguliert werden. Auf die Expression von Genen aus Cluster V wirkt die CTD wie Gesamt-CbfA, während sie auf Cluster-VI-Gene keinen Einfluss hat und den CbfA-Effekt auf Cluster IV verstärkt. Die in Abbildung 28 dargestellten Gene DDB0167552 und DDB0191229 sind folglich dem Cluster III bzw. Cluster V zuzuordnen.

Die Darstellung der differentiellen Expression der Gene erfolgt in dieser Arbeit stets bezogen auf JH.D (bzw. JH.D[ura$^-$]). Im Allgemeinen wird meist eine andere Darstellung benutzt. Dabei werden die Werte der zu untersuchenden Mutante (in diesem Fall JH.D / JH.D[ura$^-$]) auf die Werte der Wildtyp-Kontrolle (hier AX2) bezogen. In späteren Versuchen wird jedoch

der genregulatorische Einfluss der Komplementation von JH.D (bzw. JH.D[ura$^-$]) durch TAP-CbfA, CbfA$^{2\text{-}998}$ bzw. CbfA$^{724\text{-}998}$ untersucht. Daher ist es sinnvoll, die Genregulationen jeweils im Vergleich zur nicht transformierten Mutante zu berechnen. Basierend auf den Ergebnissen des *Microarrays*-Experimentes wurden zehn Gene festgelegt, die zur Überprüfung der Genregulation verschiedener Stämme mittels qRT-PCR verwendet werden können. Dabei können z. B. auch solche Stämme untersucht werden, die mit rekombinantem CbfA bzw. Fragmenten davon komplementiert wurden. Aus jedem Cluster wurden ein bis drei repräsentative Gene ausgewählt (siehe LUCAS 2009).

### 3.5.3 Regulation CbfA-abhängiger Gene durch TAP-CbfA in JH.D

In Abbildung 29 ist der Einfluss von TAP-CbfA und pPB4c (CbfA$^{2\text{-}998}$) in JH.D auf die Expression der zehn ausgewählten Gene dargestellt. Zum Vergleich ist die differentielle Expression dieser Gene in AX2 zu JH.D angegeben.

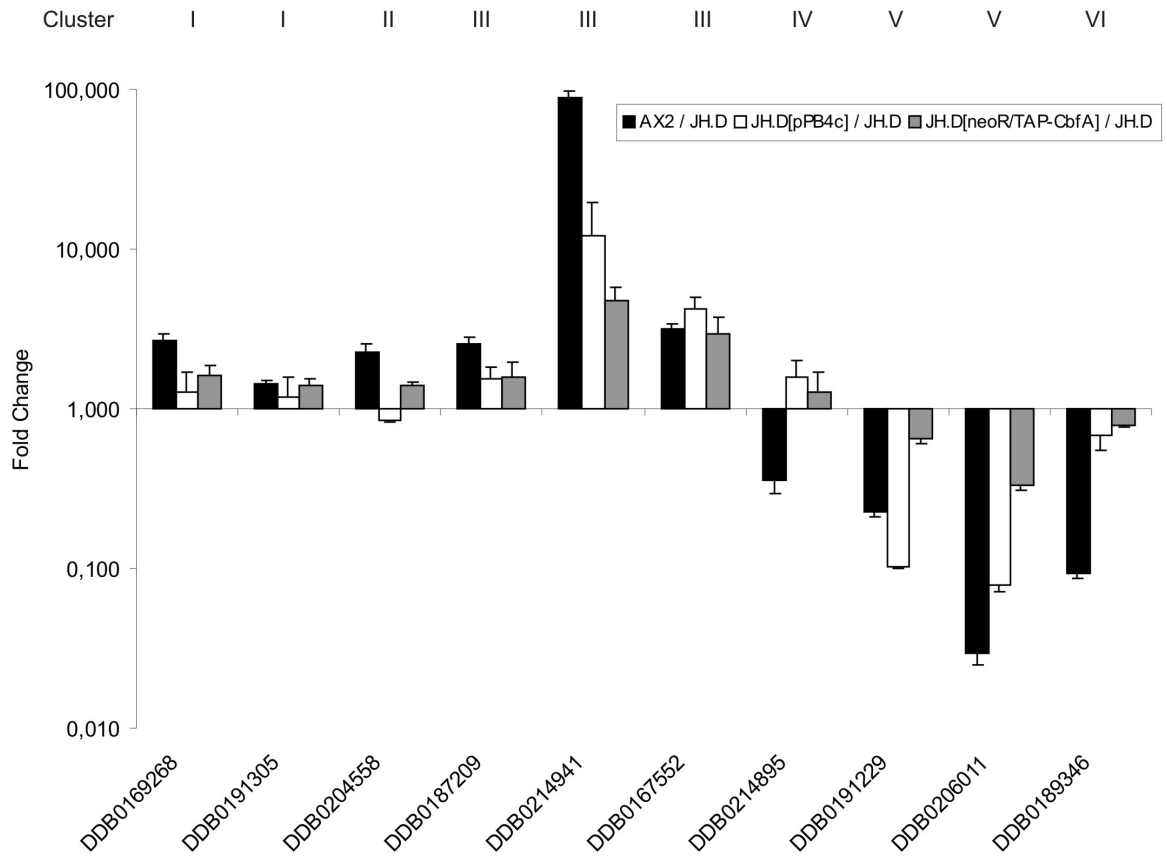



**Abbildung 29: Einfluss auf Regulation der Cluster-Gene durch Komplementation von JH.D mit TAP-CbfA bzw. pPB4c.** Daten aus qRT-PCR-Experimenten. Als Vergleich ist die Regulation in AX2 zu JH.D aufgetragen. Dargestellt ist der *Fold Change*, wobei Werte > 1 eine höhere Expression des Gens in AX2 bzw. den Transformanten, Werte < 1 eine geringere Expression des Gens in AX2 bzw. den Transformanten gegenüber JH.D bedeuten. Referenzgen: *gpdA*. n = 3; ± SD.

In JH.D[pPB4c] ist die Expression aller Gene, bis auf die derjenigen aus Cluster II und Cluster IV wiederhergestellt. In JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] wird die Expression der gleichen

Cluster und zusätzlich das Gen aus Cluster II komplementiert. Die Expression einiger Gene in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] ist der in AX2 ähnlicher als im Stamm JH.D[pPB4c]. JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] kodiert für CbfA$^{61-1000}$, JH.D[pPB4c] hingegen für nahezu vollständiges CbfA$^{2-998}$.

Obwohl in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] die ersten 60 Aminosäuren, die von Exon 1 kodiert werden, fehlen, schien dieses keinen Einfluss auf die Komplementation der Genregulation zu haben. Diese Tatsache konnte als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass das Fehlen von Exon 1 im Komplementationsplasmid TAP-CbfA relativ unproblematisch für die korrekte Funktion von CbfA war.

### 3.5.4 Regulation CbfA-abhängiger Gene durch TAP-CbfA in JH.D[ura$^-$]

Da die *Microarray*-Experimente mit den Stämmen AX2 und JH.D durchgeführt wurden, musste im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst sichergestellt werden, dass die ausgewählten Gene in den Stämmen JH.D[ura$^-$] und JH.D[uivi] im Verhältnis zu AX2 ähnlich reguliert werden wie in JH.D. Vor allem JH.D[uivi] spielte eine wichtige Rolle, da dieser Stamm als Negativkontrolle für die Komplementationen mit TAP-CbfA in JH.D[ura$^-$] dienen sollte. Er enthält das Plasmid pUiVi, das die Uracil-Prototrophie im Rahmen der Doppeltransformation vermittelt, nicht jedoch das Plasmid TAP-CbfA.

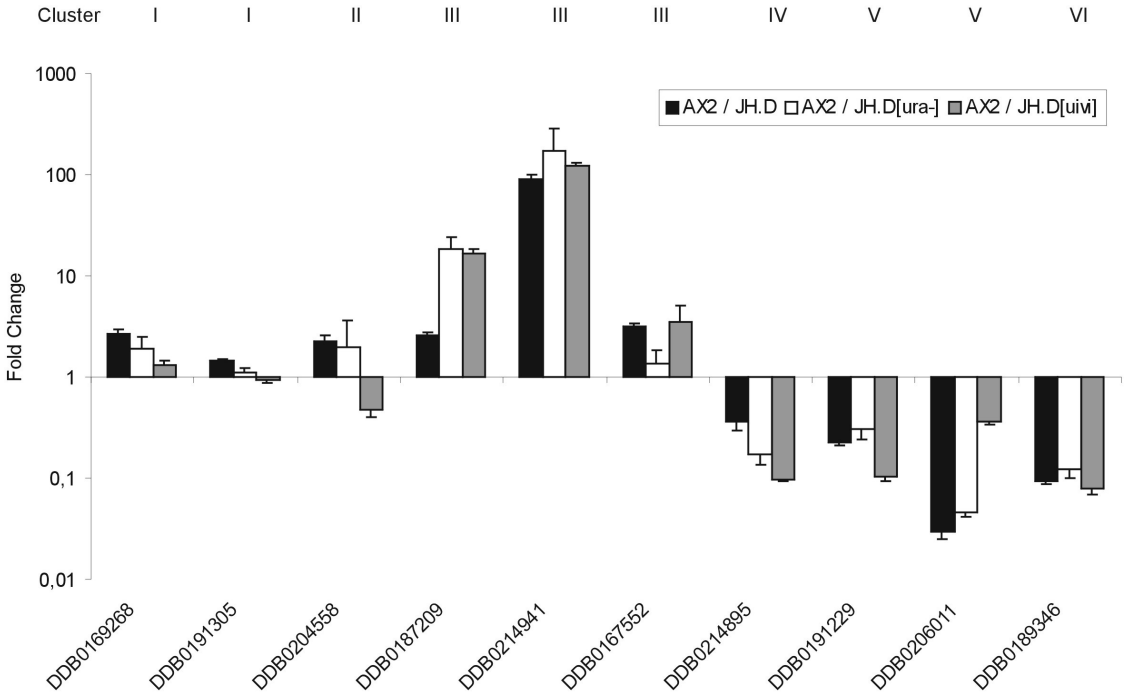



**Abbildung 30: Regulation differentiell exprimierter Gene in AX2 zu JH.D, JH.D[ura$^-$] und JH.D[uivi].** Daten aus qRT-PCR-Experimenten. Dargestellt ist der *Fold Change*, wobei Werte > 1 eine höhere Expression des Gens in AX2, Werte < 1 eine geringere Expression des Gens in AX2 gegenüber JH.D, JH.D[ura$^-$] bzw. JH.D[uivi] bedeuten. Referenzgen: *gpdA*. n = 3; ± SD.

Abbildung 30 zeigt, dass die Gene aller Cluster, mit Ausnahme von Cluster II, bezogen auf AX2 in die gleiche Richtung reguliert wurden wie in JH.D. Damit wurde belegt, dass die ausgewählten Cluster-Gene zur Charakterisierung der CbfA-Komplementationen in JH.D und JH.D[ura$^-$] herangezogen werden können.

Es folgte die Untersuchung des Einflusses von TAP-CbfA in JH.D[ura$^-$] auf die Expression der zehn Gene. In Abbildung 31 ist die Expression bezogen auf den Stamm JH.D[uivi] dargestellt. Zum Vergleich dient der *Fold Change* von AX2 zu JH.D[uivi]. Für die Messungen an JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] wurden fünf positive Klone aus zwei unabhängigen Transformationen verwendet. Im Gegensatz zur Komplementation in JH.D war nur die Expression zweier Gene aus Cluster III und eines Gens aus Cluster IV wiederhergestellt worden. Zwei weitere Gene schienen in die richtige Richtung reguliert zu werden, wiesen aber hohe Schwankungen zwischen den verschiedenen Klonen auf (DDB0204558 und DDB0191229). Von den verbleibenden Genen wurden einige sogar in die entgegengesetzte Richtung reguliert (DDB0187209 und DDB0206011).

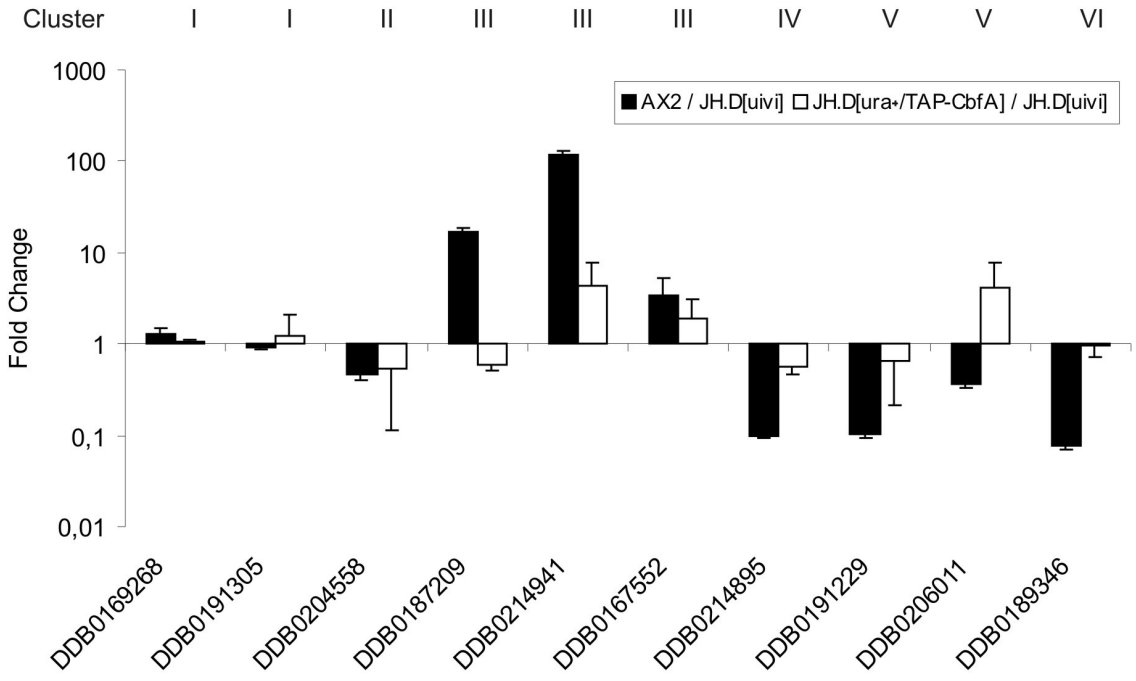



**Abbildung 31: Einfluss auf Regulation der Cluster-Gene durch Komplementation von JH.D[ura$^-$] mit TAP-CbfA.** Daten aus qRT-PCR-Experimenten. Dargestellt ist der *Fold Change*, wobei Werte > 1 eine höhere Expression des Gens in AX2 bzw. den Transformanten, Werte < 1 eine geringere Expression des Gens in AX2 bzw. den Transformanten gegenüber JH.D[uivi] bedeuten. Referenzgen: *gpdA*. n = 3; weiße Balken: n = 5; ± SD.

### 3.5.5 Zusammenfassung Komplementation durch TAP-CbfA

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Komplementation mit TAP-CbfA bezüglich der Regulation von Cluster-Genen in JH.D in größerem Ausmaß erfolgte als in JH.D[ura$^-$]. Die Heilung des Entwicklungsphänotyps konnte jedoch in JH.D nicht

zufriedenstellend erreicht werden. Daher musste der ursprüngliche Plan verworfen werden, die Komplementation in JH.D durchzuführen und die Auswirkungen verschiedener Mutationen in TAP-CbfA auf die Fähigkeit der Transformanten zur multizellulären Entwicklung zu beobachten. Zur Messung des Einflusses auf die Expression CbfA-abhängiger Gene sollten zukünftige Versuche mit TAP-CbfA und mutiertem TAP-CbfA in JH.D durchgeführt werden.

Die Heilung des Entwicklungsphänotyps durch TAP-CbfA konnte in JH.D[ura$^-$] zufriedenstellend erreicht werden. Daher wurde dieses System im Rahmen der vorliegenden Arbeit für weiterführende Versuche zur Ermittlung des Einflusses verschiedener Mutationen in TAP-CbfA auf die multizelluläre Entwicklung genutzt. Dabei wurde die nachteilige langwierige Kultivierung von JH.D[ura$^-$] durch einen besonderen Vorteil wettgemacht: In JH.D[ura$^-$] kann durch Transformation mit dem Plasmid pUiVi die sogenannte TRE-Falle (siehe Kapitel 3.9) eingeführt werden. Diese Voraussetzung wurde durch die Doppeltransformation bereits erfüllt. Daher kann im JH.D[ura$^-$]-Hintergrund zusätzlich eine Untersuchung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in Abhängigkeit von TAP-CbfA erfolgen. Im Rahmen des *In-vivo-Assays* kann ebenso der Einfluss von Mutationen in verschiedenen Regionen von TAP-CbfA auf die Mobilisierung von TRE5-A beobachtet werden.

## 3.6 Vergleich der Funktionalität und Expressionsstärke von TAP-CbfA in JH.D und JH.D[ura$^-$]

Die Komplementation von JH.D und JH.D[ura$^-$] mit TAP-CbfA ergab zum Teil gegensätzliche Ergebnisse. In JH.D konnte die Expression CbfA-abhängiger Gene wiederhergestellt werden, nicht jedoch die multizelluläre Entwicklung. In JH.D[ura$^-$] verhielt es sich genau umgekehrt. Hier war eine Heilung des durch CbfA-Mangel bedingten Entwicklungsphänotyps möglich. Da beide Stämme mit dem gleichen Plasmid transformiert wurden (gemeinsam mit jeweils einem unterschiedlichen zweiten Plasmid, das eine Antibiotikaresistenz bzw. eine Prototrophie vermittelte), stellte sich die Frage, warum die Auswirkungen unterschiedlich waren. Denkbar wäre zum einen eine unterschiedliche Expressionsstärke, z. B. bedingt durch die verschiedenen Selektionsmarker und die daraus resultierende unterschiedliche Anzahl aufgenommener Plasmide. Zum anderen wäre es möglich, dass einer der beiden Stämme nach Transformation mit TAP-CbfA kein funktionelles Protein exprimiert bzw. ein Protein mit eingeschränkter Funktionalität, das daher nicht alle CbfA-Funktionen komplementiert. Diesen beiden Erklärungsversuchen sollte in den folgenden Experimenten nachgegangen werden.

Abbildung 32 zeigt *Western-Blot*-Analysen des Fusionsproteins TAP-CbfA in JH.D bzw. JH.D[ura$^-$]. Dabei ist in Abbildung 32 A/B a) jeweils die Detektion von TAP-CbfA bzw. CbfA mit dem CbfA-spezifischen Antikörper 7F3, in Abbildung 32 A/B b) die Detektion von Aktin mit Aktin-Antikörper dargestellt. Es wurden jeweils drei unterschiedliche Mengen eines Gesamtzelllysates auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zudem wurde auf dem in Abbildung 32 A dargestellten *Western Blot* JH.D[pPB4c] analysiert, um die exprimierten TAP-CbfA-Mengen mit den von JH.D[pPB4c] produzierten Mengen an CbfA$^{2\text{-}998}$ zu vergleichen. Da bislang kein Einfluss von CbfA auf die Expression von Aktin festgestellt werden konnte, kann die Gegenfärbung mit einem Aktin-Antikörper als Beleg dafür genutzt werden, dass gleiche Mengen der Gesamtzelllysate aufgetragen wurden.

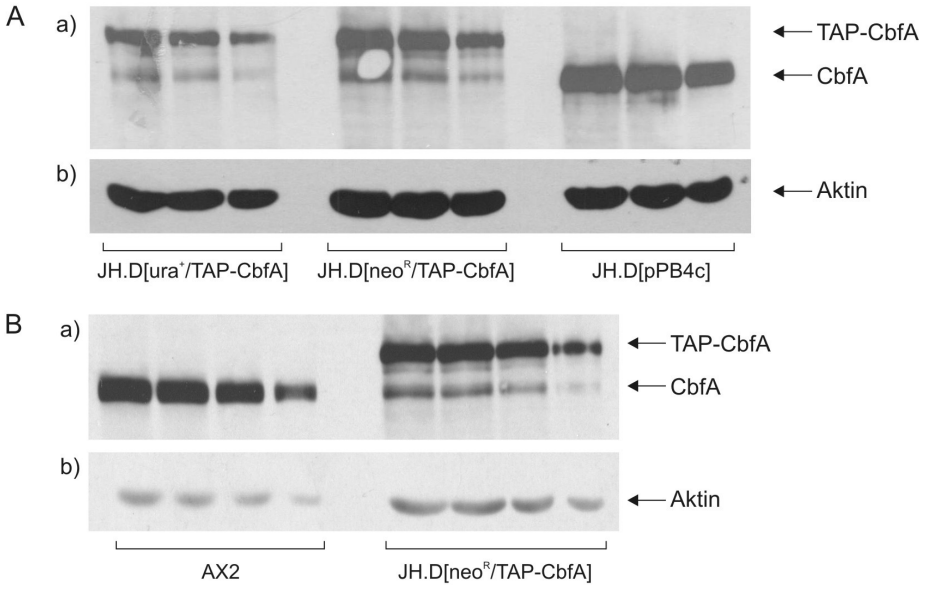



**Abbildung 32: *Western-Blot*-Analysen der CbfA-Mengen verschiedener Stämme.** **A / B:** Aufgetragen wurden jeweils drei oder vier verschiedene Mengen von Gesamtzelllysaten der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA], JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA], JH.D[pPB4c] sowie von AX2. Die *Western Blots* wurden **a)** mit dem Antikörper 7F3 zur Detektion von CbfA und **b)** mit einem Aktin-Antikörper durchgeführt.

Aus Abbildung 32 A geht hervor, dass JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] mehr Fusionsprotein exprimiert als JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]. Dieses könnte in einer unterschiedlichen Anzahl während der Transformation aufgenommener Plasmide begründet sein. In beiden Stämmen unterschritt die Menge exprimierten TAP-CbfAs jedoch die von JH.D[pPB4c] gebildete Menge an CbfA$^{2\text{-}998}$. Abbildung 32 B zeigt den Vergleich der Expression von TAP-CbfA in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] mit der CbfA-Expression in AX2. Die Menge an TAP-CbfA unterschritt diejenige von CbfA, sodass eine Überexpression von TAP-CbfA als Ursache für den Entwicklungsphänotyp von JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] ausgeschlossen werden konnte. Die vermeintlich geringere Menge an TAP-CbfA im Verhältnis zu CbfA$^{2\text{-}998}$ bzw. CbfA könnte jedoch auch auf einen schlechteren Übergang des größeren Proteins aus dem Polyacrylamid-Gel auf die Membran während des *Western Blots* zurückzuführen sein. Zudem ist die Vergleichbarkeit der Bandenstärke von Proteinen unterschiedlicher Größe auf

einem *Western Blot* nur eingeschränkt möglich. Obwohl JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] geringere Mengen an TAP-CbfA als JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] zu exprimieren scheint, reicht diese Menge offensichtlich zur Komplementation des Entwicklungsphänotyps aus. Darin kann das unterschiedliche Verhalten beider Stämme in Bezug auf die Entwicklung vermutlich nicht begründet sein.

Daher sollte als nächstes die Funktionalität des jeweiligen Fusionsproteins aus JH.D und JH.D[ura$^-$] untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Protein-DNA-*Pulldown-Assay* mit Kernextrakten von JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] durchgeführt. Als Vergleich wurde Kernextrakt von AX2 eingesetzt. In diesem Assay kann die sequenzspezifische Bindung von CbfA bzw. TAP-CbfA an den *acaA*-Promotor und das C-Modul von TRE5-A untersucht werden. Dazu wurden Biotin-gekoppelte PCR-Fragmente von *acaA*-Promotor und C-Modul eingesetzt. Diese können aufgrund der Bindung von Biotin an Streptavidin mittels Streptavidin-gekoppelter magnetischer *Beads* (Dynabeads®) aufgereinigt werden. Bindet CbfA bzw. TAP-CbfA an die biotinylierten PCR-Fragmente, kann das Protein somit ebenfalls durch die magnetischen *Beads* erfasst und nach Abtrennung der Dynabeads® und Auftrennung auf einem Polyacrylamid-Gel im *Western Blot* analysiert werden.

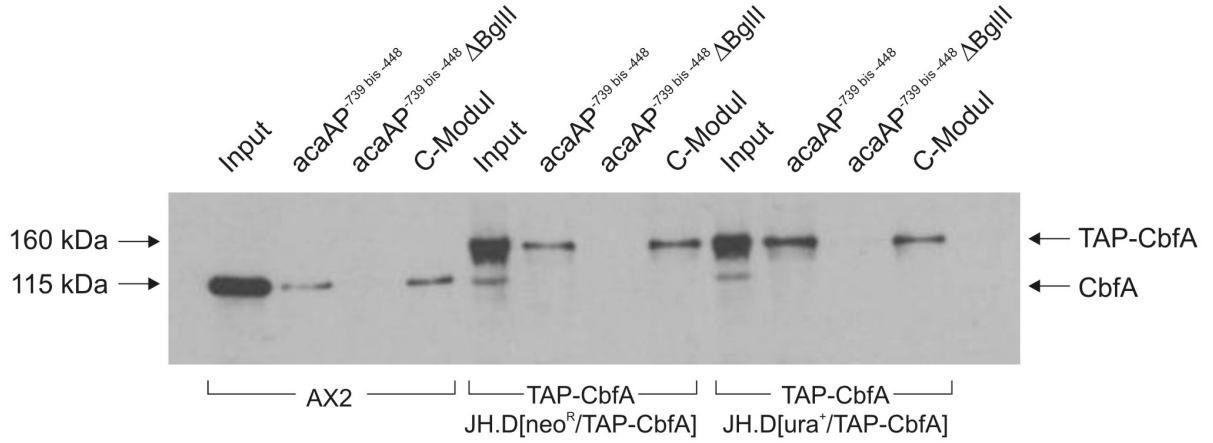



**Abbildung 33: *Western-Blot*-Analyse des *Pulldown-Assays* von TAP-CbfA aus JH.D bzw. JH.D[ura$^-$].** Zum Nachweis der Funktionalität des rekombinanten Proteins wurde die Bindung von TAP-CbfA aus Kernextrakten der unterschiedlichen Transformanten an das C-Modul von TRE5-A und den *acaA*-Promotor kontrolliert. Als Positivkontrolle wurde ein Kernextrakt von AX2 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das *acaA*-Promotorfragment *acaA*P(ΔBglII), aus dem die CbfA-Bindestelle entfernt wurde [SIOL *et al.* 2006a]. Antikörper: 7F3.

In Abbildung 33 ist das Ergebnis des *Pulldown-Assays* dargestellt. Zum Größenvergleich und zur Abschätzung der jeweils gebundenen Menge des Proteins ist von jeder Probe ein *Input* aufgetragen. Diese Protein-Menge entspricht der jeweils eingesetzten Menge im Bindungsversuch. Sowohl CbfA aus AX2 als auch TAP-CbfA aus JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] zeigten eine Bindung an den *acaA*-Promotor und das C-Modul von TRE5-A. Keines der Proteine band jedoch an das Fragment des *acaA*-Promotors, aus dem

die CbfA-Bindestelle entfernt worden war. Das heißt, die untersuchten Proteine waren ausnahmslos in der Lage, sequenzspezifisch an die jeweilige Zielsequenz zu binden. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass sowohl in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] als auch in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] funktionelles Fusionsprotein exprimiert wurde.

## 3.7 Einfluss von Mutationen in CbfA auf die multizelluläre Entwicklung

Die folgenden Untersuchungen des Einflusses verschiedener Mutationen in TAP-CbfA auf die multizelluläre Entwicklung wurden in JH.D[ura$^-$] durchgeführt, da in diesem Stamm eine Wiederherstellung der Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung durch die Expression von TAP-CbfA erreicht werden konnte. Aus Abbildung 34 sind die eingeführten Punktmutationen in verschiedenen Domänen von CbfA sowie die Deletionen im Bereich der Zinkfinger-Motive ersichtlich.

**Abbildung 34: Aminosäuresequenz von CbfA mit eingeführten Mutationen.** Die funktionellen Domänen des Proteins sind farbig abgesetzt. Unterhalb der Originalsequenz sind die ausgetauschten Aminosäuren angegeben.

### 3.7.1 Mutationen in der Jumonji-Domäne (JmjC)

JmjC-Proteine weisen eine Strukturähnlichkeit zu Cupinen auf. Entsprechend wurde eine Metalloenzymfunktion vermutet [GANE *et al.* 1998; DUNWELL *et al.* 2000; CLISSOLD & PONTING 2001]. Die JmjC-Domäne von CbfA enthält alle Aminosäuren an konservierten Positionen, die wahrscheinlich für die Komplexierung eines Eisen-Ions innerhalb der β-Faltblattstruktur benötigt werden. In dem konservierten Motiv $HX(D/E)X_nH$ von CbfA sind dies die Aminosäuren H163, D165 und H246. Aus dem Austausch der ersten beiden Aminosäuren resultiert vermutlich eine Inaktivierung des katalytischen Zentrums der JmjC-Domäne [CLISSOLD & PONTING 2001; HONDA *et al.* 2010; YU *et al.* 2010]. Damit sollte eine Umsetzung des entsprechenden Substrats durch CbfA nicht mehr möglich sein.

In der für die Jumonji-Domäne kodierenden Sequenz von TAP-CbfA wurden durch Einzelstrangmutagenese zwei Basentripletts von CAT bzw. GAT in GCT geändert. Dadurch wurden im CbfA-Protein Histidin an Position 163 sowie Asparaginsäure an Position 165 (jeweils bezogen auf Gesamt-CbfA) durch Alanin ersetzt.

In Abbildung 35 ist die *Western-Blot*-Analyse einer Auswahl von Klonen von JH.D[ura$^-$] mit TAP-CbfA/H163A+D165A zu sehen. Außer den weiter kultivierten Einzelklonen ist ebenfalls eine die Gesamtheit aller übrigen Transformanten umfassende Probe aufgetragen (Pool). Alle untersuchten Klone produzierten das Fusionsprotein TAP-CbfA mit einer Molekülmasse von ca. 160 kDa. Zum Vergleich ist AX2 aufgetragen.

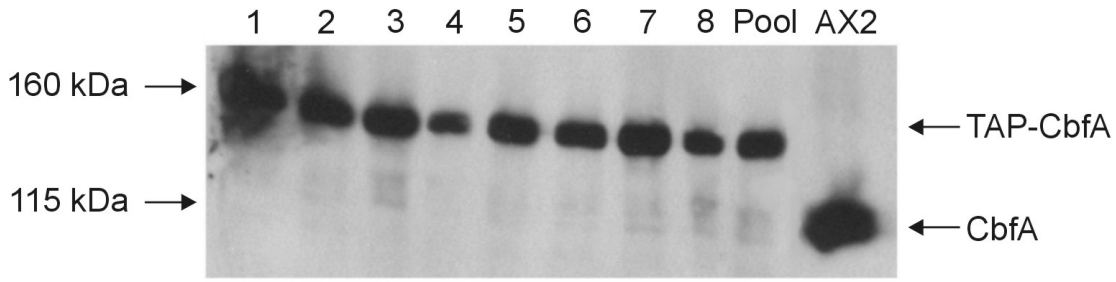



**Abbildung 35: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H163A+D165A].** Die Gesamtzelllysate (jeweils 1 x $10^6$ Zellen) wurden auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion von CbfA erfolgte mit dem CbfA-spezifischen Antikörper 7F3. Pool: Gesamtheit aller nicht einzeln analysierten Transformanten.

Auf Phosphatagar-Platten zeigten alle acht Klone einen Entwicklungsphänotyp, der demjenigen von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] entsprach. Der zeitliche Ablauf der Entwicklung ähnelte dem von AX2, die Fruchtkörper waren etwas kleiner und zahlreicher (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis war überraschend, da bisher davon ausgegangen wurde, dass der Austausch der beiden Aminosäuren die katalytische Aktivität der JmjC-Domäne zerstören würde. Daraufhin durchgeführte Sequenzierungen der TAP-CbfA-cDNA von zwei Klonen

(Abbildung 36) zeigten, dass beide eine Mischsequenz von TAP-CbfA und TAP-CbfA/H163A+D165A aufwiesen. Das heißt, es wurde möglicherweise außer dem mutierten auch TAP-CbfA mit der originalen Sequenz exprimiert. Vermutlich reichte somit der Anteil des nicht-mutierten TAP-CbfA aus, um die Funktion der JmjC-Domäne aufrecht zu erhalten.

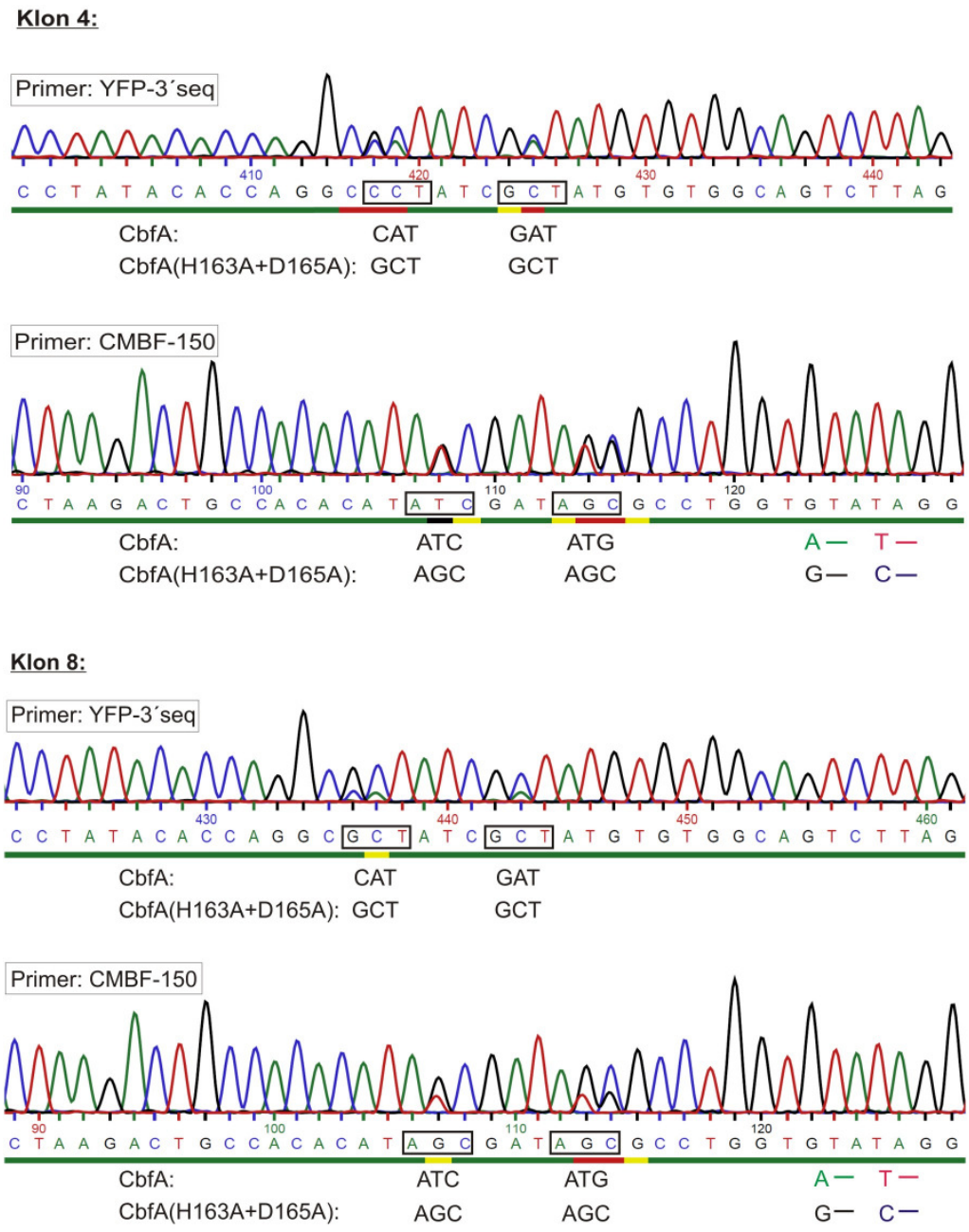



**Abbildung 36: cDNA-Sequenz zweier Transformanten des Typs JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H163A+D165A].** Die cDNA-Synthese erfolgte mit poly(dT)$_{18}$-Primer. Die Amplifizierung der cDNA wurde mit den Primern GFP-01Xho/Bam und CMBF-123 durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden die Primer CMBF-150 bzw. YFP-3´seq verwendet.

In einem zweiten Transformationsdurchgang entstanden drei positive Transformanten (*Western Blot* siehe Abbildung 37).

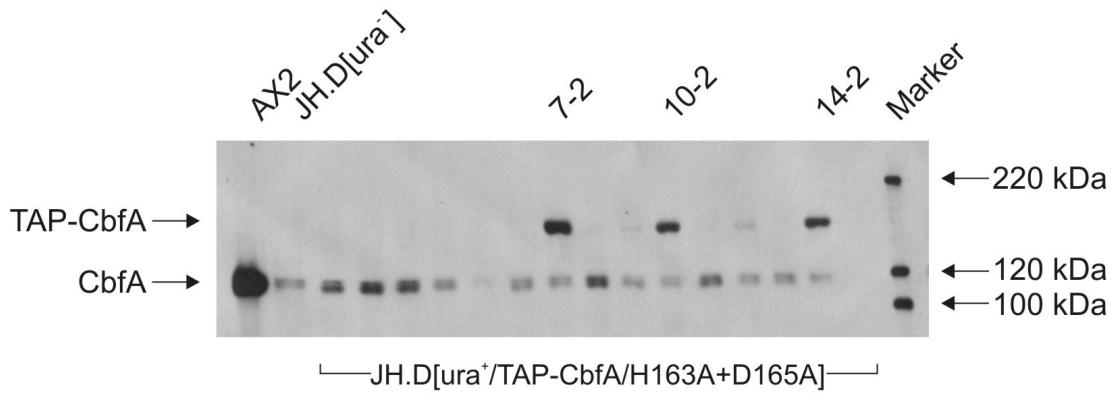



**Abbildung 37: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H163A+D165A].** Zweiter Transformationsdurchgang. Die Gesamtzelllysate (jeweils 1 x $10^6$ Zellen) wurden auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion von CbfA erfolgte mit dem CbfA-spezifischen Antikörper 7F3. **M:** Marker (MagicMark$^{TM}$, Invitrogen).

Die Sequenzierung aller drei Klone zeigte die Expression von TAP-CbfA/H163A+D165A. Es waren keine Peaks von Nucleotiden der Originalsequenz zu sehen. Beispielhaft ist die cDNA-Sequenz von Klon 10-2 in Abbildung 38 dargestellt.

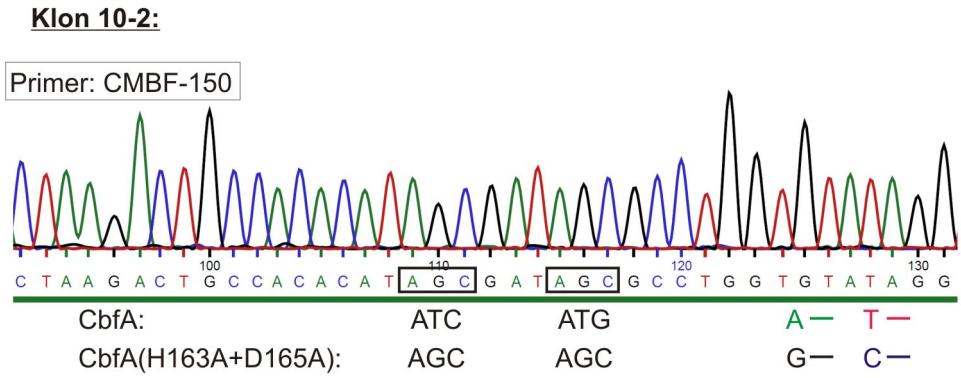



**Abbildung 38: cDNA-Sequenz eines JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H163A+D165A]-Klons.** Zweiter Transformationsdurchgang. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem poly(dT)$_{18}$-Primer. Die Amplifizierung der cDNA wurde mit den Primern GFP-01Xho/Bam und CMBF-123 durchgeführt. Zur Sequenzierung wurde der Primer CMBF-150 verwendet.

Jedoch entwickelten sich auch die drei Klone, in denen die eingeführte Mutation eindeutig nachgewiesen werden konnte. Abbildung 39 zeigt die Entwicklung aller drei Klone auf Phosphatagar-Platten im Vergleich zu AX2, JH.D[ura$^-$] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]. In einem weiteren unabhängigen Transformationsdurchgang konnten ebenfalls drei Klone generiert werden, die ähnliche Mengen an TAP-CbfA/H163A+D165A exprimierten wie die Klone der vorangegangenen Transformationen. Die Sequenzierungen zeigten die erfolgreiche Einführung der Mutationen. Auch diese drei Transformanten waren zur multizellulären Entwicklung auf Phosphatagar-Platten befähigt. Der zeitliche Ablauf sowie die Größe und Anzahl der Fruchtkörper entsprach denen der Klone aus dem zweiten Transformationsdurchgang (Daten nicht gezeigt).

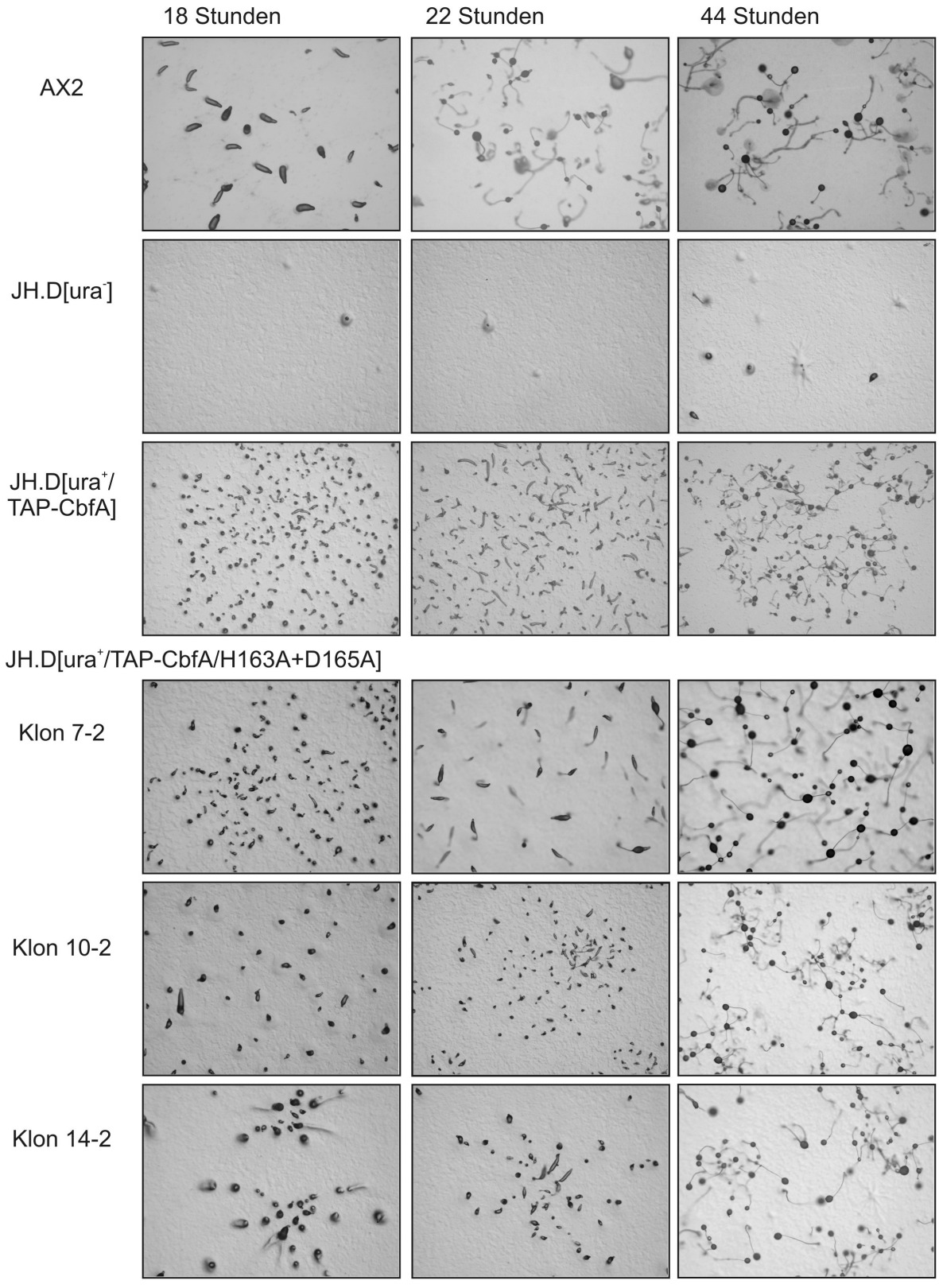



**Abbildung 39: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H163A+D165A] im Vergleich zu AX2, JH.D[ura$^-$] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA].** Jeweils 1 x $10^8$ Zellen wurden auf Phosphatagar-Platten ausgebracht und die Entwicklung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten dokumentiert. Alle Aufnahmen sind in 57-facher Vergrößerung dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Versuche könnten auf verschiedene Art und Weise interpretiert werden. Entweder wurde die katalytische Aktivität der JmjC-Domäne durch den Austausch der Aminosäuren H163 und D165 gegen Alanin nicht zerstört. Oder die JmjC-Domäne von CbfA ist in der Lage, Funktionen auszuüben, die nicht mit den vermuteten Metalloenzym-Eigenschaften in Verbindung stehen. Möglicherweise sind die Ergebnisse dahingehend zu werten, dass die enzymatische Funktion der JmjC-Domäne für die Initiation der multizellulären Entwicklung nicht von Bedeutung ist.

### 3.7.2 Mutationen und Deletionen im Bereich der Zinkfinger-Motive

CbfA besitzt zwei Zinkfinger-Motive: von Aminosäure 373 bis 414 sowie 492 bis 550. Zinkfinger stellen ein Strukturmotiv zur Bindung von DNA [MILLER *et al.* 1985], RNA [BROWN 2005; HALL 2005] oder Proteinen [BRAYER & SEGAL 2008] dar.

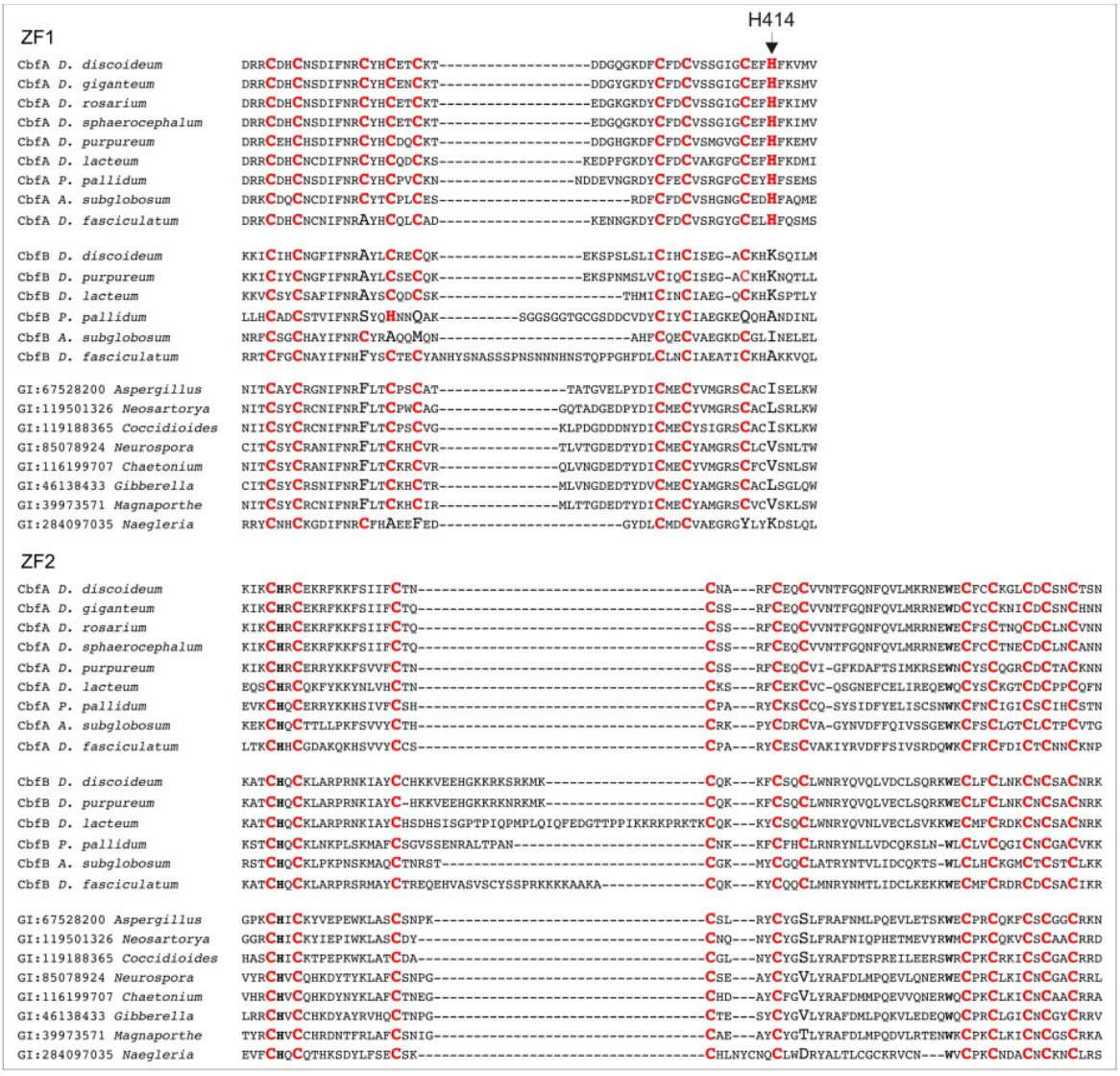



**Abbildung 40: Alignment der Zinkfinger-Motive von CbfA und CbfB verschiedener *Dictyosteliidae* sowie von CbfA-ähnlichen Proteinen anderer Spezies.** Konservierte Cysteine (C) und Histidine (H) sind rot dargestellt (Daten aus SCHMITH & WINCKLER, unveröffentlicht).

Es sind bislang zwanzig verschiedene Formen bekannt [MATTHEWS & SUNDE 2002; KRISHNA *et al.* 2003; BRAYER & SEGAL 2008]. Im Allgemeinen werden vier Cysteine oder Histidine zur Komplexierung eines Zink-Ions benötigt. Neben der Vermittlung von DNA-, RNA- oder Proteinbindung ist zudem eine zentrale Bedeutung für die korrekte Konformation und damit die Funktionalität des Gesamtproteins möglich.

Der erste Zinkfinger in CbfA von *Dictyostelium discoideum* besitzt in einem Bereich von 44 Aminosäuren insgesamt acht Cysteine, sowie ein Histidin an Position 414. Dieses ist in CbfA enthalten, nicht jedoch in CbfB und CbfA-ähnlichen Proteinen anderer Organismen (Abbildung 40). Daher ist eine spezifische Rolle von H414 für die Funktion von CbfA zu vermuten. Der zweite Zinkfinger enthält elf Cysteine in einer Region von insgesamt 59 Aminosäuren und weist eine geringe Sequenzähnlichkeit zu einigen Klassen von Zinkfingern auf, u.a. zum PHD-Typ, der in Histon-modifizierenden Proteinen vorkommt [AASLAND *et al.* 1995; BIENZ 2006].

Um die Bedeutung von H414 für die Funktion von CbfA zu untersuchen, wurde das Histidin in TAP-CbfA gegen ein Leucin ausgetauscht. Des Weiteren sollte die generelle Funktion der Zinkfinger in CbfA analysiert werden. Dazu wurden Deletions-Mutanten erzeugt, denen entweder der zweite oder beide Zinkfinger fehlten.

Abbildung 41 A zeigt den proteinspezifischen Nachweis mittels *Western-Blot*-Analyse.

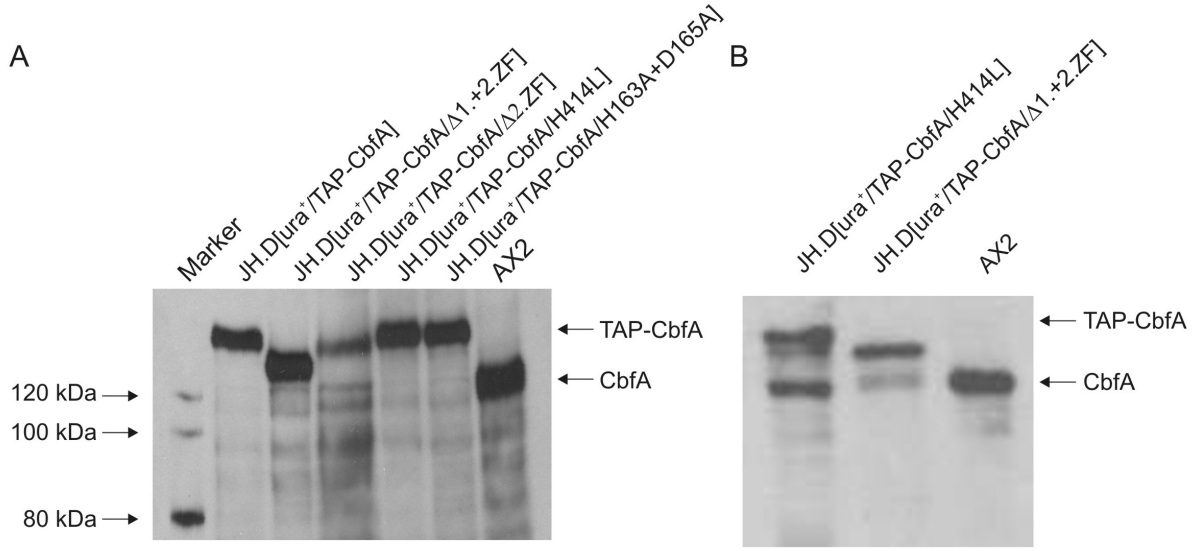



**Abbildung 41: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] mit Mutationen bzw. Deletionen im Bereich der Zinkfinger. A:** Gesamtzelllysate (entsprechend 1 x $10^6$ Zellen) jeweils eines repräsentativen Klons von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H414L] sowie JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] mit Deletion des 2. bzw. des 1. und 2. Zinkfingers im Vergleich zu JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] und AX2. **B:** Kernlokalisierung von TAP-CbfA/H414L sowie TAP-CbfA/Δ1.+ 2.ZF im Vergleich zu Wildtyp-CbfA aus AX2. Die Auftrennung aller Proben erfolgte auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel, die Detektion von CbfA mit dem CbfA-spezifischen Antikörper 7F3. **Marker:** MagicMark$^{TM}$, Invitrogen.

JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H414L] exprimierte das Fusionsprotein mit einer Molekülmasse von etwa 160 kDa. Die Deletions-Mutanten exprimierten entsprechend kleinere Proteine. Von jeder Transformation ist ein repräsentativer Klon dargestellt. Abbildung 41 B zeigt die

Kernlokalisierung von zwei der rekombinanten Proteine. Dazu wurden Kernextrakte mittels *Western Blot* analysiert. Sowohl TAP-CbfA/H414L als auch die Mutante, der beide Zinkfinger-Motive fehlen, waren im Kernextrakt nachweisbar. Im Kernextrakt von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H414L] wurde neben TAP-CbfA/H414L eine zusätzliche Bande in Höhe von CbfA detektiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine Degradation des Proteins bei der Erstellung des Kernextraktes handelt, da im Gesamtzelllysat keine Abbauprodukte von TAP-CbfA/H4141L nachgewiesen wurden (vgl. Abbildung 41 A). Die Mutante mit Deletion des zweiten Zinkfingers konnte nicht untersucht werden. Zu dem Zeitpunkt, als ausreichend Zellen zur Herstellung von Gefrier-Konserven und eines Kernextraktes vorhanden waren, hatten beide positiven Transformanten die Expression von TAP-CbfA$\Delta$2.ZF eingestellt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass auch TAP-CbfA$\Delta$2.ZF kerngängig ist, da die Kerngängigkeit für das Protein mit Deletion beider Zinkfinger-Motive nachgewiesen werden konnte.

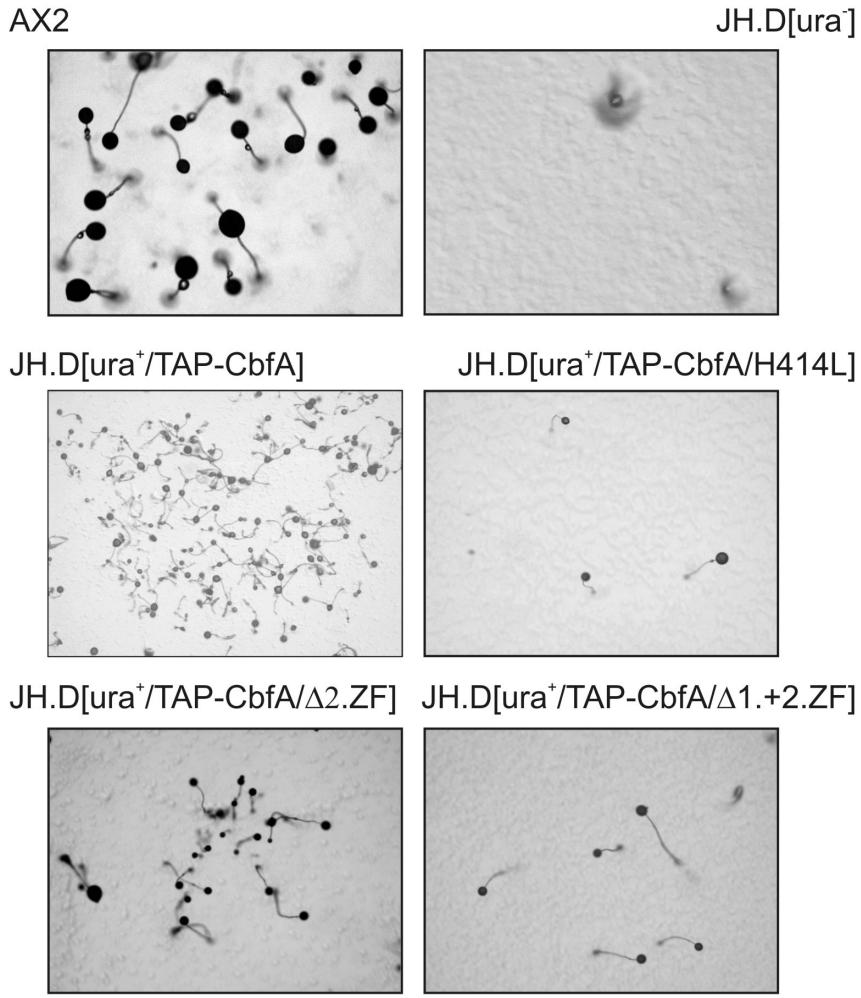



**Abbildung 42: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] mit Mutation bzw. Deletionen im Bereich der Zinkfinger-Motive.** Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Klon von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H414L] sowie JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] mit Deletion des 2. bzw. des 1. und 2. Zinkfingers im Vergleich zu AX2, JH.D[ura$^-$] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]. Jeweils 1 x $10^8$ Zellen wurden auf Phosphatagar-Platten ausgebracht und die Entwicklung wurde nach 48 Stunden dokumentiert. Alle Aufnahmen sind in 57-facher Vergrößerung dargestellt.

Abbildung 42 zeigt die multizelluläre Entwicklung der Transformanten mit Mutation bzw. Deletionen im Bereich der Zinkfinger im Vergleich zu AX2, JH.D[ura$^-$] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]. Der Austausch des in CbfA konservierten Histidins an Position 414 durch Lysin führte zu einer stark verminderten Entwicklung in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H414L]. Im ersten Transformations-Durchgang entstanden vier positive Klone, im zweiten Durchgang acht und im dritten Durchgang weitere drei positive Transformanten. Die eingeführte Mutation konnte durch Sequenzierung der cDNA bestätigt werden. Alle 15 Klone, die das Protein TAP-CbfA/H414L exprimierten, zeigten ein ähnliches Verhalten auf Phosphatagar-Platten. Es entstanden lediglich sehr wenige, sehr kleine und oftmals verkrüppelte Fruchtkörper. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Histidin 414 von entscheidender Bedeutung für die Funktion von CbfA im Bezug auf die Entwicklung ist. Von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/$\Delta$1.+2.ZF] konnten zwei positive Transformanten erzeugt werden. Beide zeigten eine ebenso große Einschränkung der Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung wie JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H414L]. Hingegen konnte in beiden positiven Klonen von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/$\Delta$2.ZF] eine multizelluläre Entwicklung beobachtet werden. Diese war gegenüber AX2 und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] verlangsamt und führte zu deutlich weniger Fruchtkörpern, die aber in ihrer Größe mit denen von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] vergleichbar waren (Abbildung 42).

### 3.7.3 Mutationen im Bereich des AT-Hakens

CbfA besitzt in seiner C-terminalen Domäne ein Peptidmotiv (KPK**GR$_{812}$P**PKNLK), das einem AT-Haken der Klasse III ähnlich ist. Von besonderer Bedeutung ist dabei das GRP-Motiv mit dem zentralen Arginin an Position 812. Der AT-Haken von CbfA ist ausreichend, um *in vitro* die Bindung von CbfA$^{783\text{-}998}$ an das C-Modul von TRE5-A zu vermitteln, wie in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden konnte [HORN *et al.* 1999]. Ein Austausch des Arginins durch Alanin zerstörte die Bindung von CbfA$^{783\text{-}998}$ an die kleine Furche AT-reicher DNA. Bekannte Typ-III-AT-Haken zeigen eine hohe Konservierung von Argininen und Lysinen in ihrem direkten Umfeld [ARAVIND & LANDSMAN 1998]. In Proteinen mit AT-Haken vom Typ II wurde der Einfluss dieser basischen Aminosäuren auf die DNA-Bindung bereits näher untersucht [HUTH *et al.* 1997; REEVES 2001; REEVES & BECKERBAUER 2001]. Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung an der DNA-Bindung hin.

In früheren Versuchen wurden bereits die Auswirkungen von R812A auf die Fähigkeit der CTD (CbfA$^{724\text{-}998}$) zur DNA-Bindung und auf die CTD-abhängige Genregulation untersucht [HORN *et al.* 1999; LUCAS *et al.* 2009]. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Austausches von Arginin 812 durch Alanin (R812A) in TAP-CbfA auf die Fähigkeit der Transformanten zur multizellulären Entwicklung untersucht werden. Um zudem die Beteiligung eines Lysins im Umfeld des AT-Hakens an der DNA-Bindung zu ermitteln, sollten die Mutationen R812 und K810A kombiniert werden.

Abbildung 43 A zeigt den Nachweis des Fusionsproteins TAP-CbfA in positiven Transformanten von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/R812A] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/K810A+R812A] im Vergleich zur Expression von CbfA in AX2 mittels *Western-Blot*-Analyse. Die sieben positiven Klone von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/R812A] stammen aus zwei unabhängigen Transformationen, ebenso die sechs positiven Transformanten des Typs JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/K810A+R812A]. Mittels cDNA-Sequenzierung konnten die eingeführten Mutationen bestätigt werden. Die Kernlokalisierung des Fusionsproteins je eines repräsentativen Klons ist in Abbildung 43 B dargestellt.

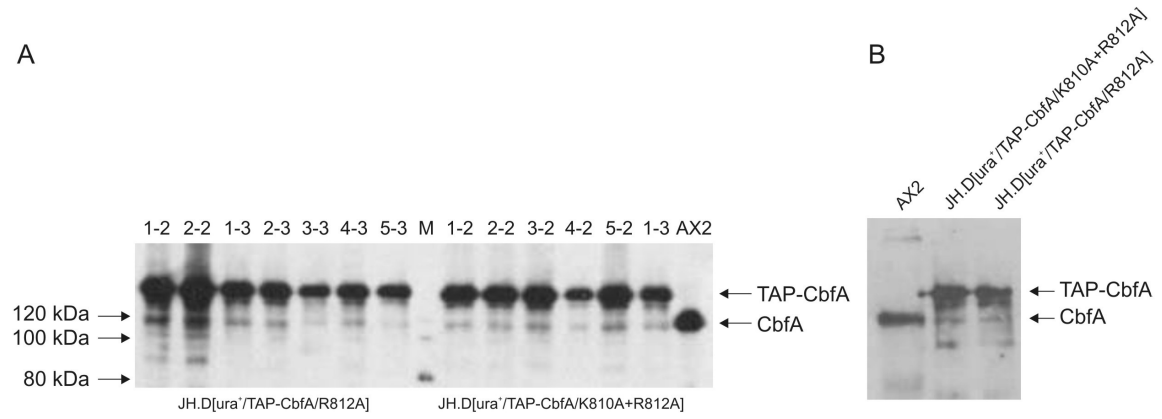



**Abbildung 43: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] mit Mutationen im Bereich des AT-Hakens. A:** Gesamtzelllysate (entsprechend 1 x $10^6$ Zellen). **B:** Kernlokalisierung von TAP-CbfA/R812A sowie TAP-CbfA/K810A+R812A im Vergleich zu Wildtyp-CbfA aus AX2. Die Auftrennung aller Proben erfolgte auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel, die Detektion von CbfA mit dem CbfA-spezifischen Antikörper 7F3. **M:** Marker (MagicMark$^{TM}$, Invitrogen).

Kernextrakte der Transformanten wurden auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und TAP-CbfA mittels *Western Blot* detektiert. Zum Vergleich wurde Kernextrakt von AX2 aufgetragen. Beide Proteine, die Mutationen im Bereich des AT-Hakens aufweisen, waren gleichermaßen kerngängig. Allerdings können Aussagen darüber, welcher Anteil des mutierten Proteins im Verhältnis zur insgesamt exprimierten Menge in den Kern gelangt, wegen fehlender Fluoreszenz des N-terminal an CbfA fusionierten YFP nicht getroffen werden. Auch ein Vergleich mit der Menge Wildtyp-CbfA im Kernextrakt von AX2 kann aufgrund unterschiedlicher *Blotting*-Effizienzen der unterschiedlich großen Proteine lediglich einer groben Einschätzung dienen. Frühere Experimente mit GFP-gekoppelter CTD (CbfA$^{724\text{-}998}$) zeigten, dass sich durch den Austausch von Arginin 812 gegen Alanin der cytoplasmatische Anteil des Proteins leicht erhöhte [LUCAS 2009]. Allerdings weist Gesamt-CbfA im Gegensatz zur CTD eine zweite Kernlokalisierungssequenz im Bereich der Zinkfinger auf, so dass eine eingeschränkte Kerngängigkeit von TAP-CbfA/R812A nicht zu erwarten war.

Die Fähigkeit der Mutanten zur multizellulären Entwicklung auf Phosphatagar-Platten ist in Abbildung 44 im Vergleich zu AX2 und JH.D[ura$^-$] dargestellt. Die Aufnahmen entstanden 72 Stunden nach dem Ausbringen der Zellen auf Phosphatagar. Auch nach weiteren drei

Tagen war kein Fortschritt in der Entwicklung sichtbar. Sowohl JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/R812A] als auch JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/K810A+R812A] zeigten ein dem Wildtyp entsprechendes *Streaming* mit nachfolgender Aggregation. Die Entwicklung brach jedoch im *Tipped-Mound*-Stadium ab. Dabei war kein Unterschied zwischen JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/R812A] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/K810A+R812A] erkennbar. Daraus ergibt sich, dass das Arginin an Position 812 einen großen Einfluss auf die Fähigkeit von TAP-CbfA hat, die multizelluläre Entwicklung in JH.D[ura$^-$] wiederherzustellen. Der Austausch des Lysins an Position 810 scheint auch hier keinen zusätzlichen Effekt zu haben.

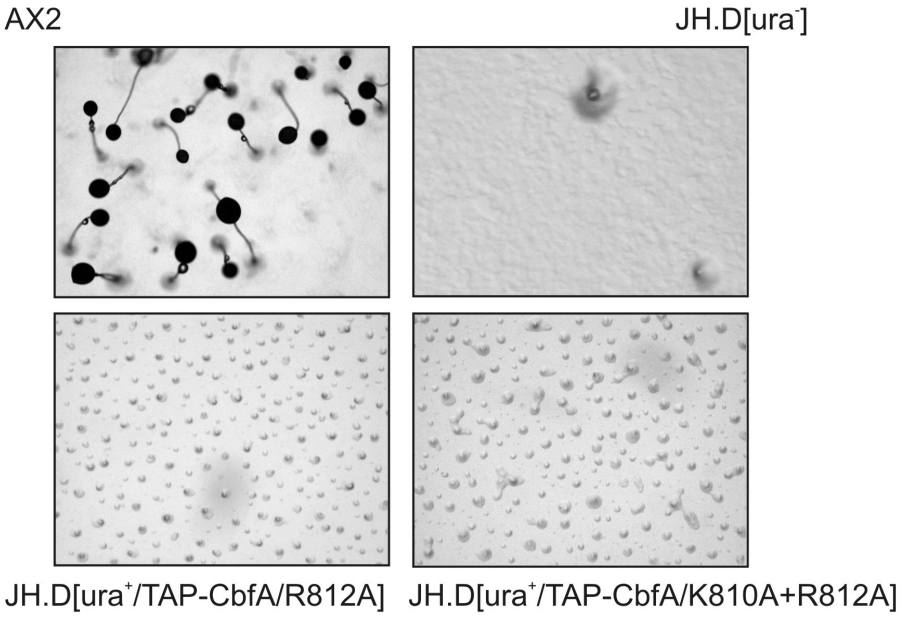



**Abbildung 44: Entwicklungsphänotypisierung der Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] mit Mutationen im Bereich des AT-Hakens.** Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Klon von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/R812A] sowie JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/K810A+R812A] im Vergleich zu AX2 und JH.D[ura$^-$]. Jeweils 1 x $10^8$ Zellen wurden auf Phosphatagar-Platten ausgebracht und die Entwicklung wurde nach 72 Stunden dokumentiert. Alle Aufnahmen sind in 57-facher Vergrößerung dargestellt.

In Tabelle 2 findet sich eine Aufstellung aller erzeugten Transformanten von JH.D[ura$^-$] mit TAP-CbfA bzw. mutiertem TAP-CbfA. Es sind jeweils die Beschreibung der Mutation sowie die Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung angegeben. Alle Klone können ausschließlich auf Petrischalen kultiviert werden. Zur Aufnahme der Zellen aus Gefrier-Konserven sollte HL5-Medium, evtl. unter Zugabe von 20 µg/ml Uracil, verwendet werden. Nach dem Anwachsen der Zellen wird auf FM-Medium umgestellt. Die Bezeichnungen der Klone entsprechen den verwendeten Arbeitstiteln und den Beschriftungen der Gefrier-Konserven.

**Tabelle 2: Übersicht aller TAP-CbfA-Transformanten in JH.D[ura⁻].** Neben der Bezeichnung sind die jeweils eingeführten Mutationen sowie die Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung auf Phosphatagar-Platten (Entwicklung PP) angegeben. Die Nummer der Mutation (z. B. Mut.141) weist auf den für die Einzelstrang-Mutagenese eingesetzten CMBF-Primer hin (z. B. CMBF-141).

| Klon | Mutation in TAP-CbfA | Entwicklung PP |
|---|---|---|
| TAP-CbfA #1 | keine | ja |
| TAP-CbfA #2 | keine | ja |
| TAP-CbfA #3 | keine | ja |
| TAP-CbfA #4 | keine | ja |
| TAP-CbfA #5 | keine | ja |
| TAP-CbfA #6 | keine | ja |
| TAP-CbfA #7 | keine | ja |
| TAP-CbfA #8 | keine | ja |
| TAP-CbfA #9 | keine | ja |
| TAP-CbfA #10 | keine | ja |
| TAP-CbfA #11 | keine | ja |
| TAP-CbfA #12 | keine | wenig |
| TAP-CbfA #13 | keine | ja |
| Mut.141 #7-2 | H163A + D165A | ja |
| Mut.141 #10-2 | H163A + D165A | ja |
| Mut.141 #14-2 | H163A + D165A | ja |
| Mut.141 #8-2 | H163A + D165A | ja |
| Mut.141 #9-2 | H163A + D165A | ja |
| Mut.141 #12-2 | H163A + D165A | ja |
| Mut.179 #1-3 | H414L | nein |
| Mut.179 #2-3 | H414L | nein |
| Mut.179 #3-3 | H414L | nein |
| Mut.179 #4-3 | H414L | nein |
| Mut.179 #1-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #2-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #3-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #4-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #5-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #6-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #7-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #8-4 | H414L | nein |
| Mut.179 #1-5 | H414L | nein |
| Mut.179 #2-5 | H414L | nein |
| Mut.179 #3-5 | H414L | nein |
| 3+4 #3 | Deletion 2. ZF | wenig |
| 3+4 #5 | Deletion 2. ZF | wenig |
| 3+5 #1 | Deletion 1.+ 2. ZF | nein |
| 3+5 #2 | Deletion 1.+ 2. ZF | nein |
| Mut.142 #1-2 | R812A | bis Mound |
| Mut.142 #2-2 | R812A | bis Mound |
| Mut.142 #1-3 | R812A | bis Mound |
| Mut.142 #2-3 | R812A | bis Mound |
| Mut.142 #3-3 | R812A | bis Mound |
| Mut.142 #4-3 | R812A | bis Mound |
| Mut.142 #5-3 | R812A | bis Mound |
| Mut.142 #6-3 | R812A | bis Mound |
| Mut.183 #1-2 | K810A + R812A | bis Mound |
| Mut.183 #2-2 | K810A + R812A | bis Mound |
| Mut.183 #3-2 | K810A + R812A | bis Mound |
| Mut.183 #4-2 | K810A + R812A | bis Mound |
| Mut.183 #5-2 | K810A + R812A | bis Mound |
| Mut.183 #1-3 | K810A + R812A | bis Mound |

## 3.8 Einfluss von cAMP-Pulsen auf die Expression der Entwicklungsgene *acaA* und *csaA*

Bei Nahrungsmangel kann *Dictyostelium discoideum*, wie bereits in Kapitel 1.1.4 beschrieben, in eine multizelluläre Entwicklungsphase übertreten. Es wird vermehrt cAMP gebildet. Dieses dient extrazellulär der Zell-Zell-Kommunikation sowie intrazellulär der Expression früher Entwicklungsgene, z. B. *acaA* und *csaA*. Im CbfA-Suppressionsstamm JH.D bewirkt der Mangel an CbfA einen Ausfall der multizellulären Entwicklung [WINCKLER *et al.* 2004]. CbfA ist vermutlich durch direkte Bindung an den *acaA*-Promotor in der Lage, die aggregationsspezifische Adenylatcyclase A (AcaA) zu aktivieren [SIOL *et al.* 2006a]. Diese produziert in der Folge cAMP, welches intrazellulär die Expression entwicklungsrelevanter Gene aktiviert. Der Entwicklungsphänotyp von JH.D kann durch Expression von rekombinantem CbfA oder rekombinanter AcaA geheilt werden [WINCKLER *et al.* 2004]. Auch die in regelmäßigen zeitlichen Abständen erfolgende Zugabe (Pulsen) von nanomolaren Mengen cAMP bewirkt eine Wiederherstellung der Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung in JH.D. Daher sind JH.D-Zellen auch in der Lage, frühe Entwicklungsgene zu exprimieren und sich zu entwickeln, wenn sie mit einem geringen Anteil Wildtyp-Zellen gemischt werden. Beides tritt jedoch zeitlich verzögert auf. Die Rolle von CbfA kann also nicht vollständig durch cAMP-Gabe umgangen werden [WINCKLER *et al.* 2004].

In den folgenden Versuchen sollte ermittelt werden, ob die Komplementationsstämme nach sechsstündigem Hungern in der Lage sind, *acaA* und *csaA* zu exprimieren. Als Vergleich wurden AX2 sowie der untransformierte bzw. leer transformierte Stamm verwendet. Untersucht wurden JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] inklusive aller erzeugten Mutanten. Die Expression von *acaA* und *csaA* wurde jeweils im Vergleich zur Expression dieser Gene in vegetativen Zellen gemessen. In einem zweiten Versuch wurden die Zellen nach zweistündigem Hungern für 4 h jeweils im Abstand von 6 min mit 30 nM cAMP gepulst. Anschließend wurde erneut die Expression der Entwicklungsgene *acaA* und *csaA* mittels qRT-PCR bestimmt.

In Abbildung 45 sind die Ergebnisse in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] im Vergleich zu AX2, JH.D[pPB4c] und dem mit einem leeren Expressionsvektor transformierten Stamm JH.D[pDXA-3H] dargestellt. Das Diagramm in Abbildung 45 A zeigt die Expression von *acaA*, Abbildung 45 B die Expression von *csaA*. In Abbildung 45 A ist zusätzlich die multizelluläre Entwicklung der jeweiligen Stämme nach dem Ausplattieren auf Phosphatagar-Platten und 48-stündiger Inkubation dokumentiert.

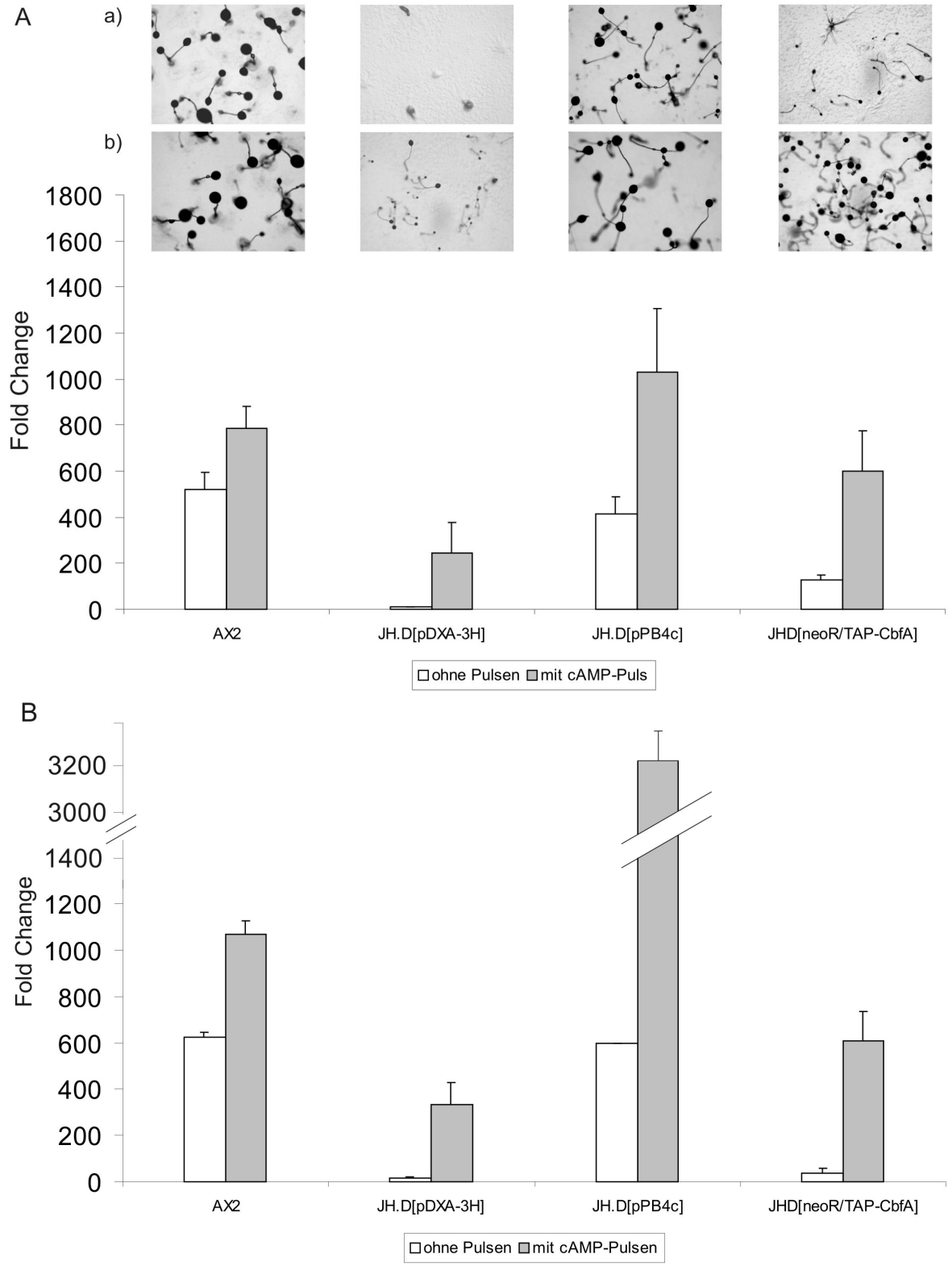



**Abbildung 45: Einfluss auf die Regulation der Entwicklungsgene durch Komplementation von JH.D mit pPB4c bzw. TAP-CbfA.** Als Vergleich ist die Expression der Entwicklungsgene *acaA* (Abbildung **A**) und *csaA* (Abbildung **B**) in AX2 und im leer transformierten Stamm JH.D[pDXA-3H] abgebildet. Dargestellt ist der *Fold Change*, jeweils bezogen auf die Expression des Gens in vegetativen Zellen. Referenzgen: *catA*. n = 3; ± SD. Die Aufnahmen oberhalb der Diagramme zeigen die Entwicklung der verwendeten Stämme nach 48 Stunden auf Phosphatagar-Platten **a)** nach Inkubation in 1 x Phosphatpuffer (6 Stunden, 120 rpm) und **b)** nach Inkubation in 1 x Phosphatpuffer (2 Stunden, 120 rpm) und anschließendem Pulsen mit je 30 nM cAMP im Abstand von jeweils sechs Minuten (4 Stunden, 120 rpm).

Die Bilder der Reihe a) zeigen die Entwicklung von 6 h in Phosphatpuffer geschüttelten Zellen. In den Bildern der Reihe b) ist die Entwicklung von Zellen zu sehen, die 2 h Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt und anschließend 4 h im Abstand von jeweils 6 min mit cAMP gepulst wurden.

AX2 und JH.D[pPB4c] exprimierten nach sechsstündigem Hungern große Mengen *acaA* und *csaA* und konnten sich erwartungsgemäß entwickeln. Durch cAMP-Pulse nahm die Expression beider Gene weiter zu. Auf die multizelluläre Entwicklung hatte dieses keinen Einfluss. Der leer transformierte Stamm JH.D[pDXA-3H] exprimierte nach dem Hungern nur sehr geringe Mengen der Entwicklungsgene. Nach dem Pulsen mit cAMP stieg die Expression deutlich an, erlangte aber nicht das Niveau von AX2 bzw. JH.D[pPB4c]. Ohne cAMP-Pulse zeigte JH.D[pDXA-3H] keine Entwicklung, nach dem Pulsen traten einige Fruchtkörper auf. Diese waren jedoch nicht so zahlreich wie in AX2 und erheblich kleiner.

JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] exprimierte nach dem Hungern nur geringfügig größere Mengen der Entwicklungsgene als JH.D[pDXA-3H]. Dieses war im Vergleich zu JH.D[pPB4c] nicht zu erwarten, stimmte allerdings mit der nur sehr geringfügig ausgeprägten Fähigkeit von JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] zur multizellulären Entwicklung überein. Nach Pulsen mit cAMP stieg die Expression von *acaA* und *csaA* deutlich an. Sie übertraf das Niveau in JH.D[pDXA-3H], erreichte aber weder die Level in AX2 noch die in JH.D[pPB4c]. Zur multizellulären Entwicklung waren die Mengen jedoch ausreichend.

In Abbildung 46 sind die Ergebnisse in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] und JH.D[ura$^-$] mit mutiertem TAP-CbfA im Vergleich zu JH.D[ura$^-$] dargestellt. Abbildung 46 A zeigt die Expression von *acaA*, Abbildung 46 B die Expression von *csaA*, jeweils nach sechsstündigem Hungern bzw. nach zweistündigem Hungern und anschließendem vierstündigen Pulsen mit 30 nM cAMP im Abstand von jeweils sechs Minuten. Die Expression von *acaA* und *csaA* wurde jeweils im Vergleich zur Expression dieser Gene in vegetativen Zellen gemessen.

JH.D[ura$^-$] exprimierte nach sechs Stunden Hungern geringe Mengen an *acaA* und *csaA*. Durch Pulsen mit cAMP stieg die Expression nur leicht an. Der Anstieg war deutlich geringer ausgeprägt als im Vergleichstamm JH.D[pDXA-3H] (siehe Abbildung 45). In JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] und in der JmjC-Mutante JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H163A+D165A] stieg die Expression von *acaA* nach dem Hungern deutlich stärker an. Das Pulsen mit cAMP hatte jedoch keinen zusätzlichen Effekt. In beiden Stämmen stieg auch die Expression von *csaA* nach der sechsstündigen Hungerphase im etwa gleichen Ausmaß wie die *acaA*-Expression an. Die Expression von *csaA* ließ sich hingegen durch Pulsen mit cAMP auf ungefähr die doppelte Menge steigern. Beide Stämme waren bereits ohne cAMP-Pulse in der Lage, sich zu entwickeln.

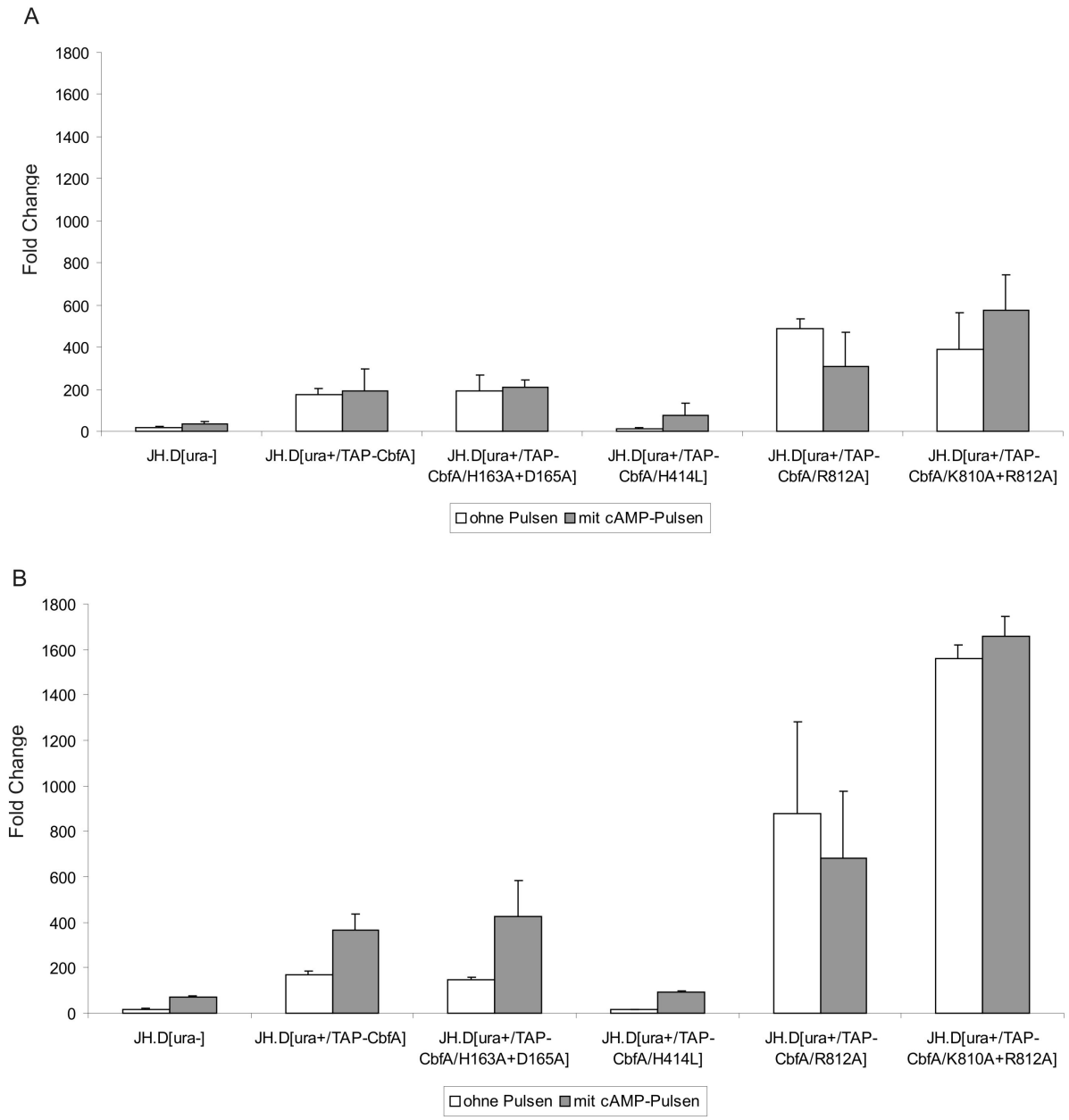



**Abbildung 46: Einfluss auf die Expression der Entwicklungsgene durch Komplementation von JH.D[ura$^-$] mit TAP-CbfA und mutiertem TAP-CbfA.** Als Vergleich ist die Expression der Entwicklungsgene *acaA* (Abbildung **A**) und *csaA* (Abbildung **B**) im Stamm JH.D[ura$^-$] aufgetragen. Dargestellt ist der *Fold Change*, jeweils bezogen auf die Expression des Gens in vegetativen Zellen. Referenzgen: *catA*. n = 3; ± SD.

In der Zinkfinger-Mutante JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/H414L] war weder bei *acaA* noch bei *csaA* ein signifikant höherer Anstieg der Expression als in JH.D[ura$^-$] zu beobachten. Auch das Pulsen mit cAMP bewirkte keine erhöhte Expression beider Gene. Der Stamm zeigte keine multizelluläre Entwicklung.

In beiden AT-Haken-Mutanten, JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/R812A] und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/K810A+R812A], konnte ein starker Anstieg der *acaA*- und *csaA*-Expression beobachtet werden. Dieser war stärker als in dem nicht mutierten Komplementationsstamm

JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] und stimmte bei *csaA* in der Größenordnung ungefähr mit der Expression in AX2 überein. Jedoch konnte weder bei *acaA* noch bei *csaA* ein zusätzlicher Anstieg der Expression durch cAMP-Pulse verzeichnet werden. Beide Stämme zeigten bis zum *Tipped-Mound*-Stadium eine reguläre Entwicklung. Dann kam es jedoch zu einem Abbruch der Entwicklung und die Zellen verblieben in diesem Stadium.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Bestimmung der Expressionslevel der Entwicklungsgene *acaA* und *csaA* mittels qRT-PCR das Verhalten der Stämme bezüglich der multizellulären Entwicklung widerspiegelte. Außerdem zeigte sich auch in diesem Versuch ein deutlicher Unterschied zwischen den Komplementationen im Stamm JH.D und denen im Stamm JH.D[ura$^-$]. In ungepulsten Zellen von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] reichte eine Expressionsstärke von *acaA* zur multizellulären Entwicklung aus, die nur unwesentlich höher war als die in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA]. Dort war allerdings nur eine sehr geringe Entwicklung der ungepulsten Zellen zu beobachten.

In den AT-Haken-Mutanten in JH.D[ura$^-$] zeigte sich eine Expression von *acaA* und *csaA*, die deutlich über der in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] lag. Obwohl sie im Bereich der Expression in AX2 lag und erheblich geringer war als in JH.D[pPB4c], kam es zu negativen Auswirkungen auf die multizelluläre Entwicklung. Die Zellen verblieben im *Tipped-Mound*-Stadium und konnten die Entwicklung nicht abschließen. Im Gegensatz dazu konnten sich gepulste JH.D[pPB4c], die ein Vielfaches der *acaA*- und *csaA*-Mengen im Vergleich zu den AT-Haken-Mutanten in JH.D[ura$^-$] exprimierten, problemlos entwickeln.

## 3.9 Einfluss von CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A

Der C-Modul-bindende Faktor A (CbfA) spielt eine wichtige Rolle für Wachstum und Entwicklung von *Dictyostelium discoideum.* Vermutlich besteht auch ein Einfluss auf das Retrotransposon TRE5-A, da CbfA sequenzspezifisch an dessen C-Modul bindet [GEIER *et al.* 1996]. Die Retrotransposition mobiler Elemente birgt die Gefahr der Genominstabilität und der Insertionsmutagenese. Aus diesem Grund muss die Zelle die Aktivität von Transposons kontrollieren. Da CbfA an das C-Modul von TRE5-A bindet, wäre es plausibel, wenn CbfA als Wirtsfaktor Einfluss auf die Frequenz der Retrotransposition von TRE5-A nehmen würde. In der Folge käme es zu einem Anstieg der Retrotranspositionsaktivität von TRE5-A in Abwesenheit von CbfA.

Entgegen dieser Annahme werden im CbfA-Suppressionsstamm JH.D jedoch geringere Mengen TRE5-A-RNA gebildet als in AX2 [BECK 2002]. Um zu beweisen, dass diese Beobachtung eine direkte Folge des CbfA-Mangels ist, wurden in JH.D verschiedene Fragmente von CbfA exprimiert (Plasmide siehe Abbildung 48 B) und deren Einfluss auf die Expression der TRE5-A-RNA untersucht. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse dargestellt: Sowohl die Supplementation von CbfA$^{2\text{-}998}$ als auch CbfA$^{724\text{-}998}$ erhöhten die RNA-Menge von TRE5-A.

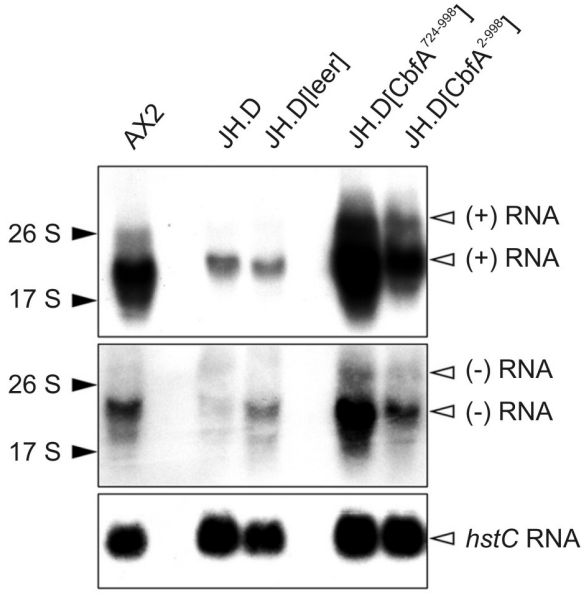



**Abbildung 47: *Northern-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[CbfA$^{724\text{-}998}$] und JH.D[CbfA$^{2\text{-}998}$].** Der Blot wurde nacheinander mit einer Minus-Strang-spezifischen und einer Plus-Strang-spezifischen Sonde gegen TRE5-A sowie einer Sonde gegen Histon H3 (*hstC*) hybridisiert. Zum Vergleich dienten AX2, JH.D und mit dem leeren Expressionsvektor transformierte JH.D. Größenmarker links zeigen das Migrationsverhalten von 26S- und 17S-rRNA (Größe ca. 4,1 bzw. 1,9 kb).

Der *Northern Blot* zeigte ebenfalls, dass sowohl Plus-Strang- als auch Minus-Strang-RNA durch Expression von CbfA$^{2\text{-}998}$ und CbfA$^{724\text{-}998}$ verstärkt gebildet wurden. Es konnte sogar beobachtet werden, dass der Anstieg der Expression von TRE5-A-RNA durch CbfA$^{724\text{-}998}$ stärker war als durch CbfA$^{2\text{-}998}$ und in AX2. Dieses konnte auf eine Überexpression von

CbfA$^{724\text{-}998}$ im Gegensatz zum vollständigen CbfA zurückgeführt werden (Daten nicht gezeigt).

Als Nächstes sollte der Einfluss von CbfA nicht nur auf die Expression, sondern auch auf die Retrotransposition von TRE5-A untersucht werden. Dazu wurden die Stämme JH.D[ura$^-$] und DH1 verwendet, die beide eine vollständige Deletion des *pyr5-6*–Gens aufweisen, das für die UMP-Synthase kodiert [CATERINA 1994; BECK 2002]. JH.D[ura$^-$] exprimiert nur ca. 5 % der CbfA-Menge des Wildtyps, DH1 exprimiert AX2 entsprechende Mengen. In beide Stämme wurden die Plasmide pUi und pUiVi (siehe Abbildung 48 A) transformiert, so dass die Zellen wieder „ura$^+$“ wurden. Das Plasmid pUi enthält kein Integrationsziel für TRE5-A, diente also als Negativkontrolle. Das Plasmid pUiVi hingegen besitzt eine sogenannte TRE-Falle, d. h. ein tRNA-Gen, das in artifizieller Umgebung als Integrationsziel für TRE5-A dient. Dieses tRNA-Gen wurde im *cbfA*-Intron in das *pyr5-6*-Gen eingebettet.

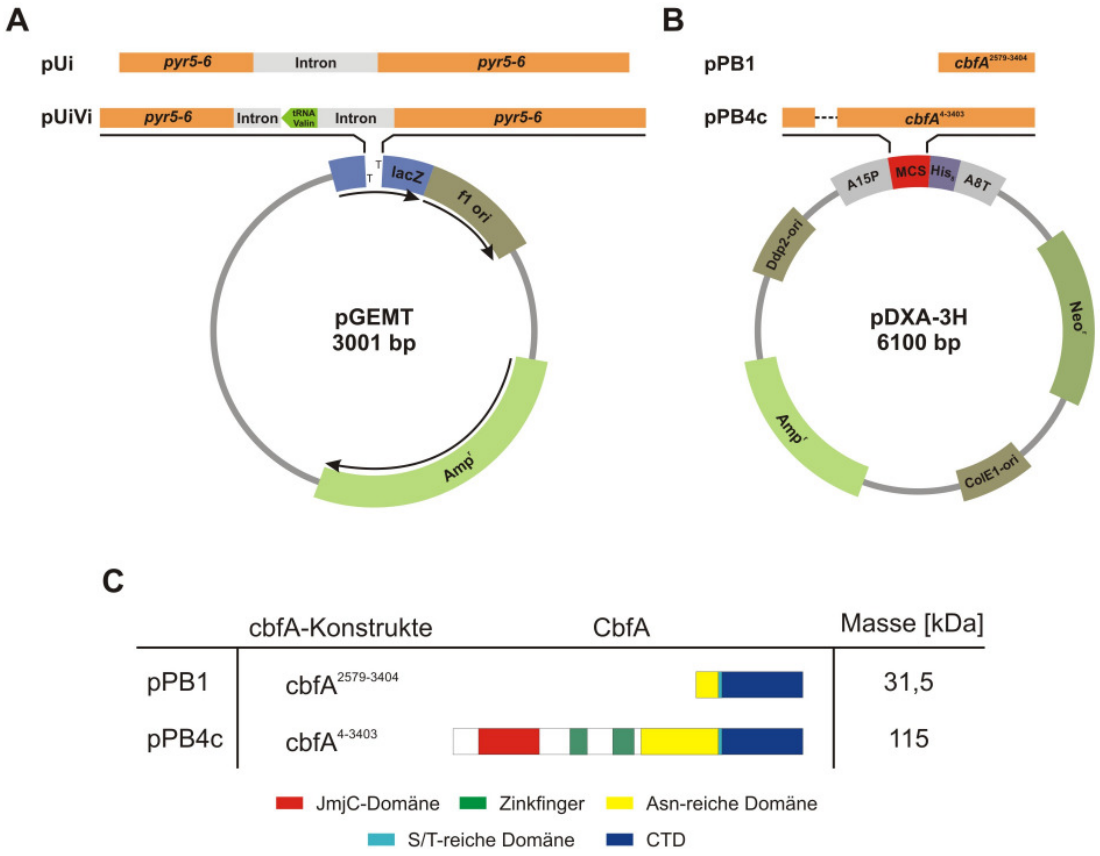



**Abbildung 48: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide zur Untersuchung der Retrotransposition von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA. A:** Plasmide pUi (Negativkontrolle ohne Integrationsziel für TRE5-A) bzw. pUiVi (enthält die TRE-Falle, d. h. ein tRNA-Gen, das als Integrationsziel für TRE5-A-Retrotransposons fungiert). **B:** Expressionsplasmid pDXA-3H, in das verschiedene *cbfA*-Fragmente kloniert wurden. **C:** Überblick über klonierte *cbfA*-Fragmente, sowie Molekülmasse und Domänenstruktur des jeweils exprimierten Proteins. Abkürzungen: **pUi:** Plasmid mit UMP-Synthase-Gen und Intron; **pUiVi:** Plasmid mit UMP-Synthase-Gen und Intron mit Valin-tRNA-Gen (invers orientiert); ***pyr5-6*:** UMP-Synthase-Gen; **Amp$^r$:** Ampicillin-Resistenz-Gen; **f1 ori:** f1-Replikationsursprung; ***lacZ*:** β-Galactosidase-Gen; **A15P:** Aktin-15-Promotor; **A8T:** Aktin-8-Terminator; **MCS:** *multiple cloning site*; **His$_8$:** Sequenz für 8 Histidine; **Neo$^r$:** Neomycin-Resistenz-Gen; **ColE1-ori:** Replikationsursprung für *E. coli*; **Ddp2-ori:** Replikationsursprung für *D. discoideum*.

Wenn kein Retrotransposon in die TRE-Falle integriert, wird das Intron aus der mRNA herausgespleißt und es wird funktionelle UMP-Synthase gebildet (siehe Abbildung 49 A). Diese wandelt das dem Medium zugesetzte Cytostatikum 5-Fluoroorotat (5-FO) in 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (5-F-dUMP) um. 5-F-dUMP ist ein irreversibler Inhibitor der Thymidylat-Synthetase. In der Folge kann kein dTMP, das als Baustein der DNA benötigt wird, gebildet werden. Die Zelle stirbt.

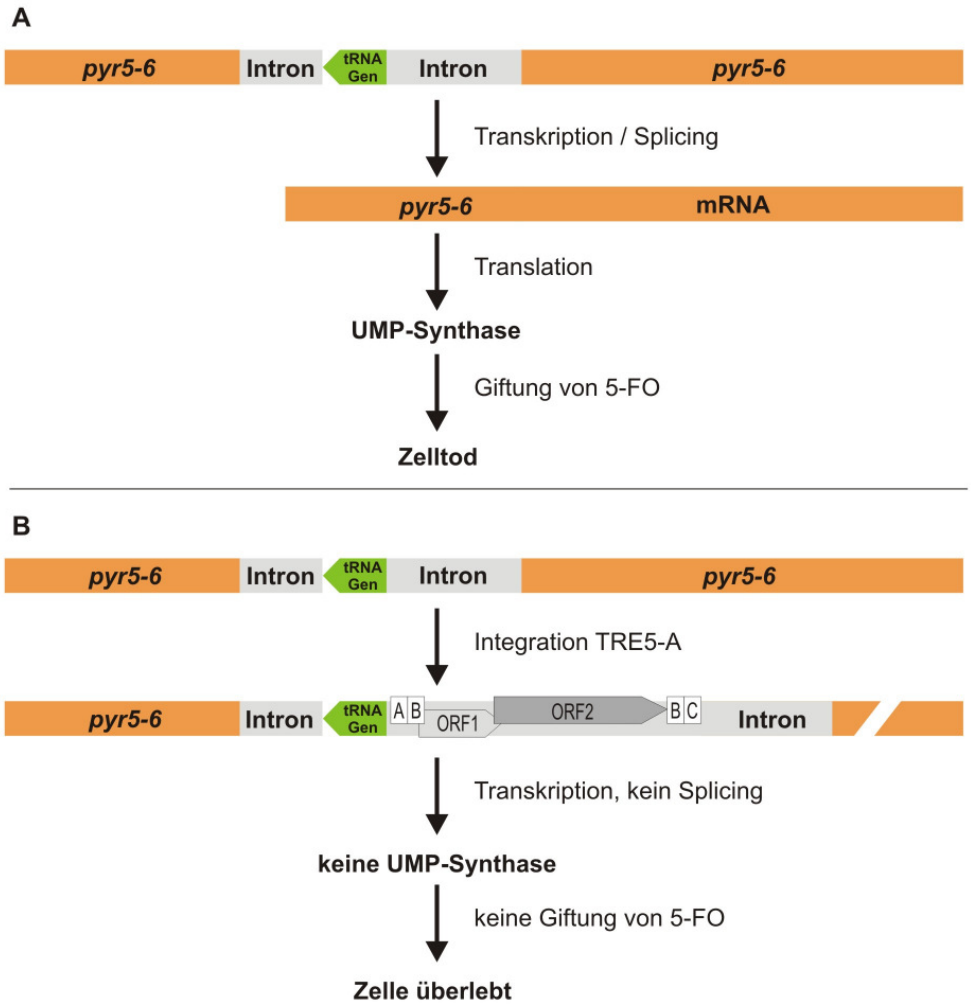



**Abbildung 49: Prinzip des *In-vivo*-Assays zur Bestimmung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A.** Dargestellt ist die TRE-Falle. **A:** Integriert kein Retrotransposon, wird UMP-Synthase gebildet und 5-FO gegiftet. Die Zelle stirbt. **B:** Integriert TRE5-A, kann keine UMP-Synthase gebildet werden. Es erfolgt keine Giftung von 5-FO und die Zelle überlebt.

Integriert nun ein Retrotransposon in der Nähe des tRNA-Gens, kann das Intron nicht mehr korrekt aus dem UMP-Synthase-Transkript herausgespleißt werden (siehe Abbildung 49 B). Es wird keine funktionelle UMP-Synthase gebildet, so dass die Zellen unempfindlich gegenüber 5-FO sind und keine Giftung zu 5-F-dUMP stattfindet. Die Zellen können allerdings kein essentielles UMP synthetisieren, sodass Uracil als Vorstufe im Medium enthalten sein muss. Die Zellen können so überleben und wachsen klonal. Jeder Klon oberhalb der natürlichen Mutationsrate repräsentiert in diesem Testsystem eine Zelle mit Integrationsereignis. Bei allen bisher beobachteten Integrationen handelte es sich mit einer

einzigen Ausnahme um TRE5-A, sodass der Assay als Maß für die Retrotranspositionsaktivität von TRE5-A angesehen werden kann [BECK 2002, SIOL 2006].

Es zeigte sich, dass im CbfA-Wildtyp-Stamm DH1 eine um den Faktor 20 höhere Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A auftritt als im CbfA-Suppressionsstamm JH.D [BECK 2002]. Folglich scheint CbfA die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A positiv zu beeinflussen. JH.D ist ein Abkömmling von AX2, DH1 hingegen stammt von AX3 ab. Formal wäre es deshalb möglich, dass die mangelnde Retrotransposition im Stamm JH.D darauf zurückzuführen ist, dass die TRE5-A-Population in AX2 und somit auch in dessen Abkömmling JH.D inaktiv ist. In diesem Falle würde der CbfA-Effekt lediglich vorgetäuscht. Mangels geeigneter AX2[ura$^-$] konnte das Problem nicht direkt untersucht werden.

Um einen vorgetäuschten CbfA-Effekt auszuschließen, sollte in der vorliegenden Arbeit daher untersucht werden, ob die TRE5-A-Retrotranspositionsfrequenz in JH.D von CbfA abhängig ist. Dazu sollte CbfA in JH.D exprimiert und der Einfluss auf die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A untersucht werden. Vorangegangene Versuche zeigten, dass die CTD von CbfA allein in der Lage ist, die Expression von TRE5-A-RNA in JH.D wiederherzustellen. Daher sollte CbfA$^{724\text{-}998}$ ebenfalls in JH.D exprimiert und dessen Einfluss auf die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A untersucht werden.

Prinzipiell stehen zwei *Dictyostelium-discoideum*-Stämme zur Durchführung des *In-vivo*-Retrotranspositionsassays zur Verfügung: DH1 und JH.D[ura$^-$]. Die Nutzung der CbfA-Suppressionsmutante JH.D[ura$^-$] ermöglicht eine Untersuchung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA und dessen CTD. Es ergibt sich zudem die Möglichkeit, die Auswirkungen von TAP-CbfA bzw. mutiertem TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A zu untersuchen (siehe Kapitel 3.10).

Zunächst wurde JH.D[ura$^-$] zum einen mit dem Plasmid pUi, zum anderen mit dem Plasmid pUiVi transformiert (Abbildung 48 A). Daraus entstanden die Stämme JH.D[ui] und JH.D[uivi], die beide somit wieder „ura$^+$“ waren und in Uracil-freiem Minimalmedium wachsen konnten. JH.D[ui] besitzt kein Integrationsziel für TRE5-A, JH.D[uivi] trägt die TRE-Falle. Somit dienten alle Stämme, die aus JH.D[ui] hervorgingen, als Negativkontrollen.

Da die Abhängigkeit der Retrotransposition von TRE5-A von der CbfA-Expression untersucht werden sollte, wurden nun sowohl in JH.D[ui] als auch in JH.D[uivi] weitere Transformationen durchgeführt. Dabei wurden je einmal der leere Expressionsvektor pDXA-3H, einmal pPB1 (*cbfA*$^{2579\text{-}3404}$, kodiert für CbfA$^{724\text{-}998}$) und einmal pPB4c (*cbfA*$^{4\text{-}3403}$, kodiert für CbfA$^{2\text{-}998}$) eingeführt. Auf positive Transformanten wurde mit G418 selektiert. Die schematische

Darstellung der Expressionsvektoren findet sich in Abbildung 48 B. Einen Überblick über die jeweils exprimierten CbfA-Fragmente bietet Abbildung 48 C.

In Abbildung 50 ist die Entstehung der Stämme schematisch dargestellt. Die hellgrau unterlegten Stämme besitzen keine TRE-Falle, die dunkelgrau unterlegten Stämme weisen eine TRE-Falle zur Integration des Retrotransposons auf.

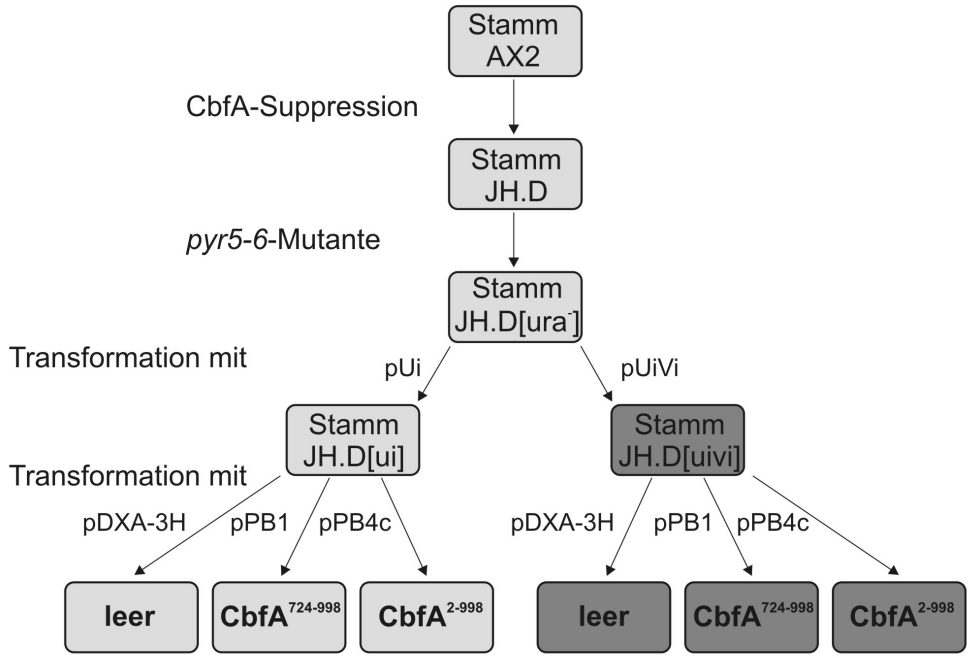



**Abbildung 50: Entstehung der Stämme zur Untersuchung der Retrotransposition von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA.** Dargestellt ist die Entstehung der Stämme JH.D und JH.D[ura$^-$] aus AX2 [siehe HORN 1999; BECK 2002]. Zudem ist ein Überblick über die anschließenden Komplementationen von JH.D[ura$^-$] mit dem *pyr5-6*-Gen und verschiedenen *cbfA*-Fragmenten gegeben. Die hellgrau unterlegten Stämme enthalten keine TRE-Falle. Die dunkelgrau unterlegten Stämme verfügen über eine solche Falle als Integrationsziel für TRE5-A.

Der gesamte Ablauf des Experiments ist in Abbildung 51 dargestellt. Es sind die Kulturbedingungen des jeweiligen Stamms, die Abfolge der Transformationen, die Selektionsbedingungen für die Transformanten, die Analyse der auftretenden Transformanten sowie der zeitliche Rahmen des Versuchs zu entnehmen. Zudem sind die Bedingungen des *In-vivo*-Retrotranspositionsassays aufgeführt.

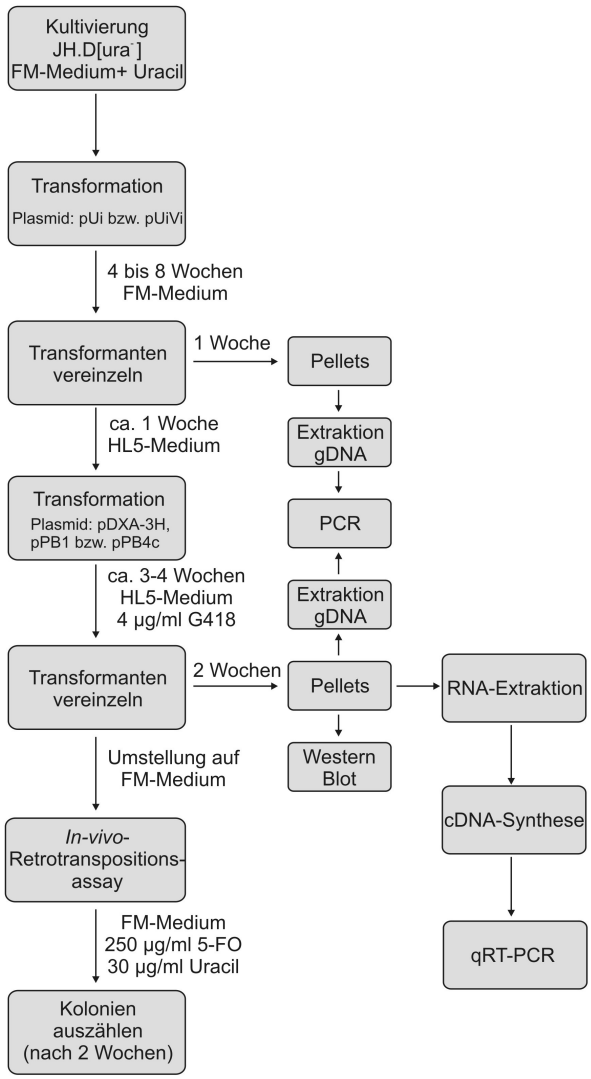



**Abbildung 51: Zeitlicher Ablauf von Transformation, Selektion und Analyse positiver Transformanten in JH.D[ura$^-$].** Dargestellt sind die serielle Transformation zur Komplementation mit *pyr5-6* (UMP-Synthase) und verschiedenen Fragmenten von CbfA (CbfA$^{724\text{-}998}$, CbfA$^{2\text{-}998}$ bzw. leerer Expressionsvektor) sowie der Ablauf des *In-vivo*-Retrotranspositionsassays.

Nach Transformation des Stammes JH.D[ura$^-$] mit den Plasmiden pUi und pUiVi wurden die dabei entstandenen Stämme mittels PCR an genomischer DNA auf das Vorhandensein des *pyr5-6*-Gens ohne bzw. mit TRE-Falle kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Diese PCR wurde erneut durchgeführt, nachdem JH.D[ui] und JH.D[uivi] mit den Expressionsvektoren transformiert worden waren. Es wurde genomische DNA je eines repräsentativen Klons aller sechs entstandenen Stämme extrahiert und mittels PCR analysiert (Abbildung 52). Um die Integration des Plasmids nachzuweisen, wurde ein Primerpaar verwendet, das in der 3´-Region des UMP-Synthase-Gens bindet (UMP-28/UMP-29; Abbildung 52 A). Das Ergebnis dieser PCR ist in Abbildung 52 C zu sehen. Des Weiteren sollte unterschieden werden, ob der jeweilige Stamm über die TRE-Falle als Integrationsziel für TRE5-A verfügt oder nicht. Dazu wurde eine PCR mit dem Primerpaar UMP-19/UMP-20 durchgeführt, welche nur ein Produkt ergibt, falls das tRNA-Gen im Intron vorhanden ist (Abbildung 52 B).

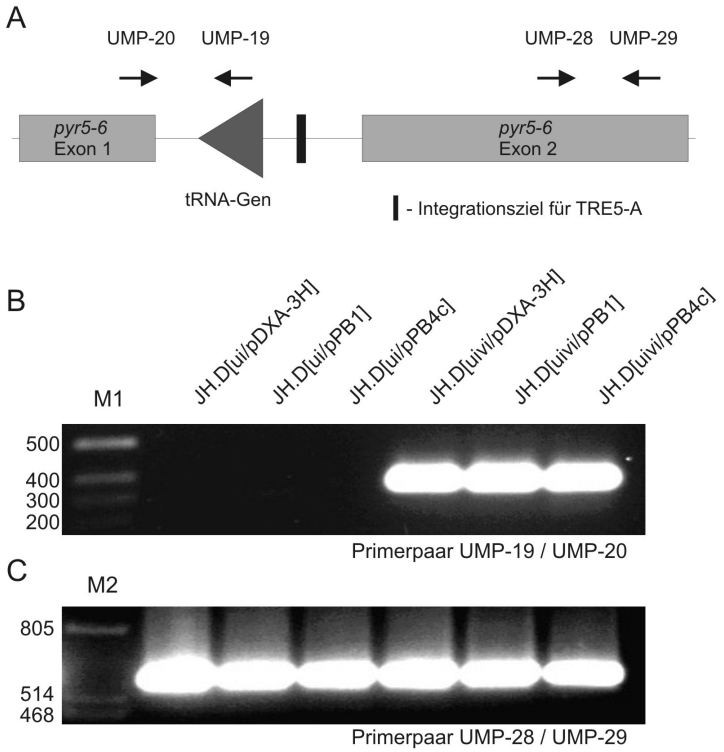



**Abbildung 52: PCR-Analyse von genomischer DNA der Transformanten JH.D[ui] und JH.D[uivi] nach zusätzlicher Transformation mit den Expressionsplasmiden pDXA-3H, pPB1 und pPB4c.** **A:** Schematische Darstellung der Primerbindestellen. **B:** PCR-Analyse mit der Primerkombination UMP-19 / 20. **C:** PCR-Analyse mit der Primerkombination UMP-28 / 29. **M1:** Marker (0,1 kb); **M2:** Marker (λ-DNA, geschnitten mit PstI). Alle Größenangaben in bp.

Es ist ersichtlich, dass alle sechs Stämme erfolgreich mit dem Gen für die UMP-Synthase transformiert wurden. Außerdem konnte die Abwesenheit der TRE-Falle in den als Negativkontrollen dienenden Stämmen JH.D[ui/pDXA-3H], JH.D[ui/pPB1] und JH.D[ui/pPB4c] nachgewiesen werden. Die Teststämme JH.D[uivi/pDXA-3H], JH.D[uivi/pPB1] und JH.D[uivi/pPB4c] hingegen verfügten über die TRE-Falle. Als Nächstes sollte in allen Klonen die Expression der CbfA-Derivate kontrolliert werden. Dazu wurden Gesamtzelllysate aller Transformanten auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und CbfA bzw. dessen CTD mit dem primären Antikörper 7F3 detektiert (*Western Blot*, Abbildung 53). Abbildung 53 A zeigt die mit dem leeren Expressionsvektor transformierten Stämme JH.D[ui/pDXA-3H] und JH.D[uivi/pDXA3-H]. Diese exprimierten ebenso wie JH.D[ura$^-$] nur geringe Mengen an CbfA. Zum Vergleich ist jeweils AX2 dargestellt. In Abbildung 53 B sind die Stämme JH.D[ui/pPB1] und JH.D[uivi/pPB1] dargestellt. Diese exprimierten die CTD von CbfA mit einer Molekülmasse von ca. 31,5 kDa. In Abbildung 53 C sind schließlich die Transformanten der Stämme JH.D[ui/pPB4c] und JH.D[uivi/pPB4c] zu sehen, die AX2 entsprechende Mengen von CbfA$^{2\text{-}998}$ exprimierten.

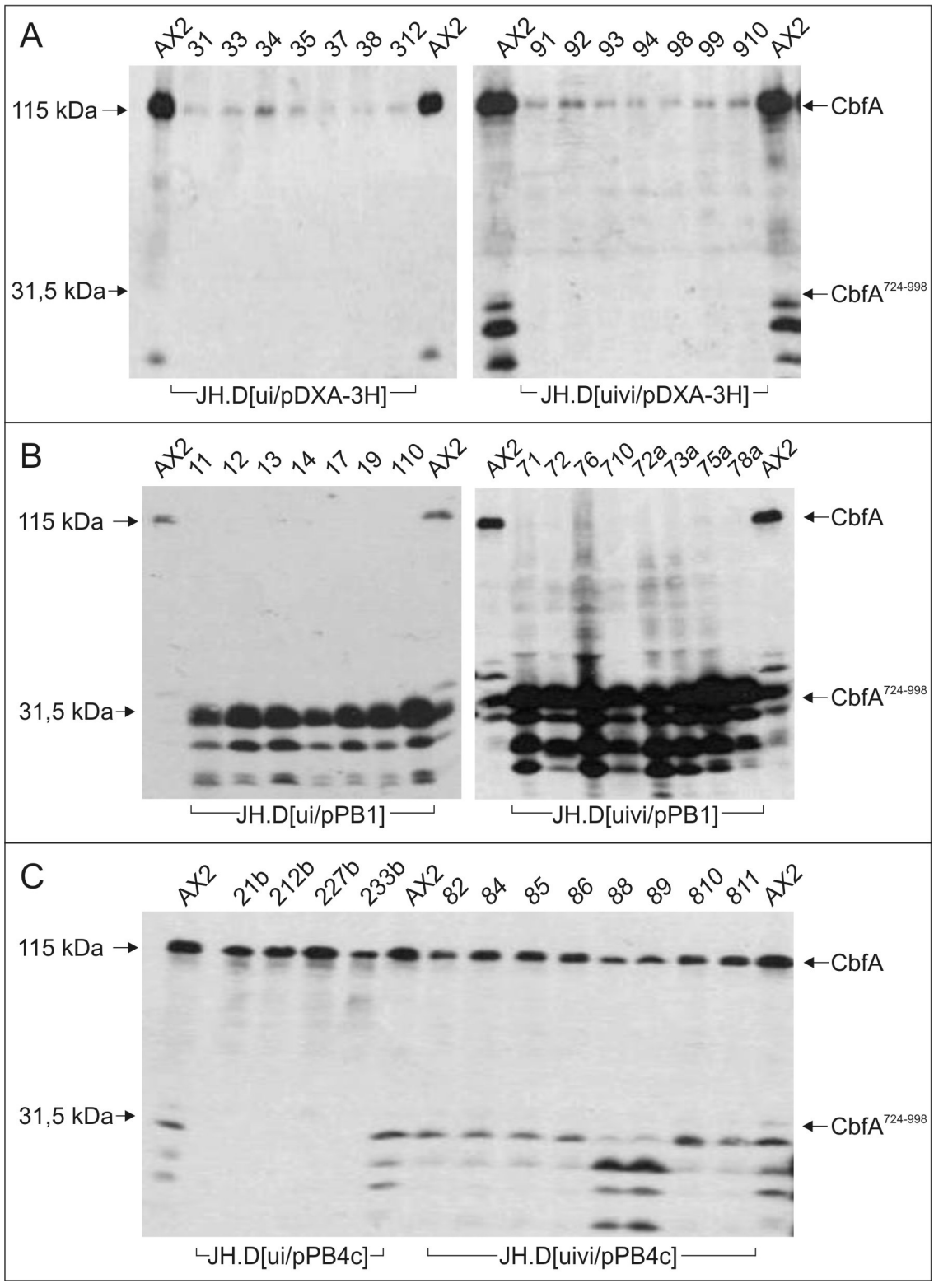



**Abbildung 53: *Western-Blot*-Analyse der Transformanten JH.D[ui] und JH.D[uivi] nach zusätzlicher Transformation mit den Expressionsplasmiden pDXA-3H, pPB1 und pPB4c.** Die Gesamtzelllysate (jeweils 1 x $10^6$ Zellen) wurden auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion von CbfA erfolgte mit dem CbfA-spezifischen Antikörper 7F3.

Mit der erfolgreichen Erzeugung dieser Transformanten konnte die Grundlage zur Untersuchung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA geschaffen werden.

Zunächst sollte jedoch analysiert werden, ob die Expression von TRE5-A-RNA in den CTD- und CbfA-exprimierenden Transformanten erhöht war und somit die Ergebnisse früherer Versuche bestätigt werden konnten. Die Messung der mRNA erfolgte diesmal nicht mittels *Northern Blot*, sondern per qRT-PCR. Diese Methode hat den Vorteil, dass der Einfluss von CbfA bzw. dessen CTD auf die Expression von TRE5-A-RNA quantifiziert werden kann. Im *Northern Blot* ist lediglich eine halbquantitative Auswertung durch visuelle Abschätzung der jeweiligen Bande möglich.

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde Gesamt-RNA aller Klone extrahiert. Diese diente als Matrize zur cDNA-Synthese mittels eines poly(dT)$_{18}$-Primers. Die cDNA wurde als Template in der qRT-PCR eingesetzt. Die Erfassung von TRE5-A erfolgte durch das Primerpaar Rep-110/Rep-181, das im ORF2 des Retrotransposons bindet. Dadurch wurden ausschließlich Retrotransposons vom Typ TRE5-A.1 erfasst. Als Referenzgen diente *gpdA*, das mit den Primern Q-GAPDH-01 und Q-GAPDH-02 amplifiziert wurde. Abbildung 54 zeigt die relative Expression von TRE5-A als Mittelwert aller Klone (n = 4 – 8) eines Stammes im Verhältnis zur Expression im untransformierten Stamm JH.D[ura$^-$]. Als Vergleich ist der Unterschied der Expression von TRE5-A in AX2 zu JH.D[ura$^-$] dargestellt.

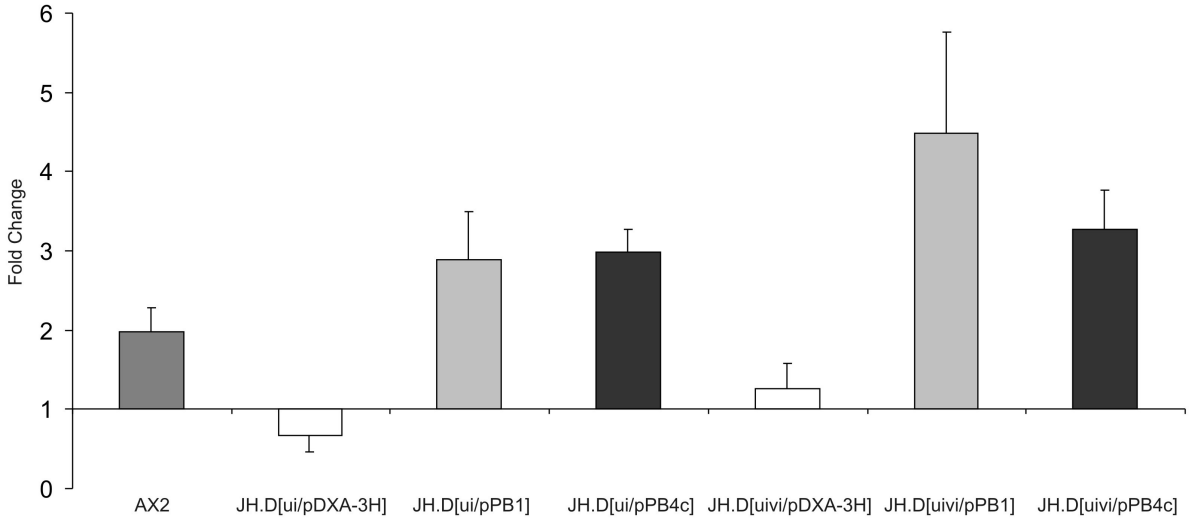



**Abbildung 54: Einfluss auf die Expression von TRE5-A durch Transformation von JH.D[ui] bzw. JH.D[uivi] mit CbfA$^{724-998}$ bzw. komplettem CbfA.** Als Vergleich ist die Expression von TRE5-A in AX2 bzw. in den leer transformierten Stämmen JH.D[ui/pDXA-3H] und JH.D[uivi/pDXA-3H] gezeigt. Dargestellt ist der *Fold Change*, jeweils bezogen auf die Expression in JH.D[ura$^-$]. n = 4 - 8; ± SD. Referenzgen: *gpdA*.

Sowohl Gesamt-CbfA als auch dessen CTD allein sind in der Lage sind, die RNA-Mengen von TRE5-A zu erhöhen. Damit konnten die Ergebnisse aus dem *Northern Blot* bestätigt werden. In allen CTD- bzw. CbfA-exprimierenden Klonen wurde mindestens die gleiche Menge TRE5-A-RNA gebildet wie im Wildtyp-Stamm AX2.

Abschließend sollte untersucht werden, ob mit der Erhöhung der Mengen von TRE5-A-RNA in den vorliegenden Stämmen auch eine verstärkte Retrotranspositionsfrequenz einhergeht. Dazu wurden alle Transformanten einem *In-vivo*-Retrotranspositionsassay unterzogen. Zu diesem Zweck wurden jeweils $5 \times 10^5$ Zellen mit 250 µg/ml 5-Fluoroorotat und 30 µg/ml Uracil versetzt. Zellen, in denen eine Integration von TRE5-A in die TRE-Falle stattfindet, überleben und wachsen klonal. Durch Auszählung der Kolonien und Vergleich mit den Negativkontrollen kann die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A bestimmt werden. Sie ist jeweils bezogen auf $1 \times 10^7$ Zellen dargestellt (Abbildung 55).

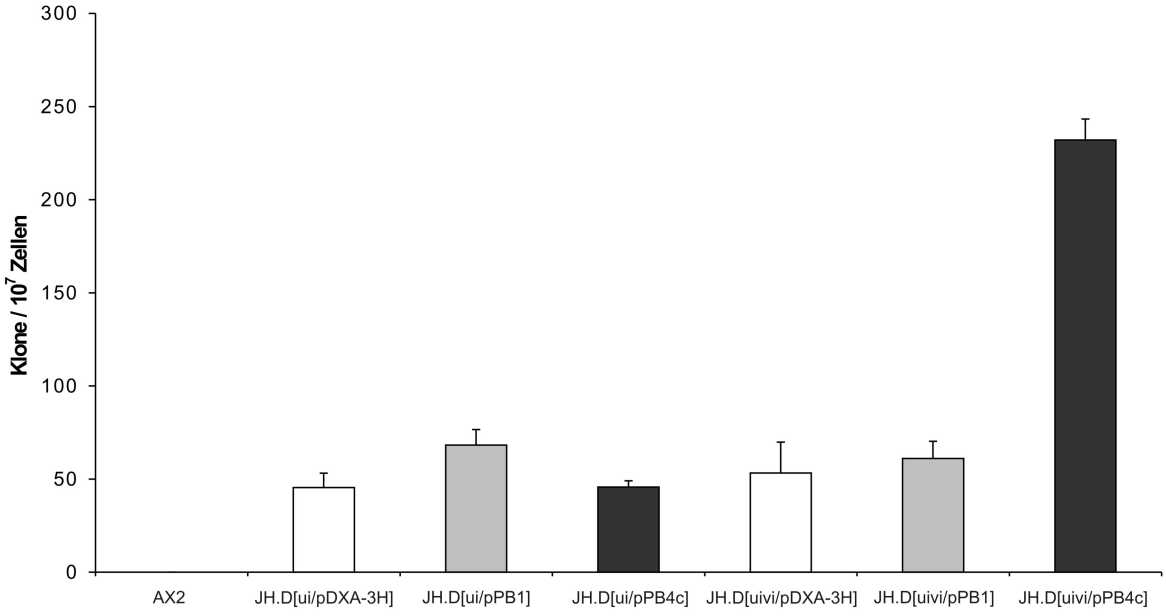



**Abbildung 55: 5-FO-Selektion zur Bestimmung des Einflusses von CbfA$^{724\text{-}998}$ bzw. vollständigem CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A.** Als Negativkontrolle diente der Stamm JH.D[ui], der kein Integrationsziel für TRE5-A bietet. JH.D[ui] wurde mit dem leeren Expressionsvektor pDXA-3H, CbfA$^{724\text{-}998}$ bzw. CbfA$^{2\text{-}998}$ transformiert (Balken 2 bis 4). Die gleichen Plasmide wurden in den Stamm JH.D[uivi] transformiert, der eine TRE-Falle für die Integration des Retrotransposons enthält (Balken 5 bis 7). n = 4 - 8; ± SD.

Basierend auf den in Abbildung 55 dargelegten Ergebnissen können folgende Aussagen getroffen werden: Erstens ist vollständiges CbfA im Stamm JH.D[uivi/pPB4c] in der Lage, die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A zu erhöhen. Die absoluten Zahlenwerte der Klone sind vergleichbar mit den in DH1[uivi] ermittelten [BECK 2002]. Zweitens konnte im Stamm JH.D[uivi/pPB1] keine Erhöhung der Retrotranspositionsfrequenz beobachtet werden, obwohl die Menge an TRE5-A-RNA nachweislich mindestens im gleichen Ausmaß erhöht war wie in JH.D[uivi/pPB4c]. Für eine erfolgreiche Retrotransposition von TRE5-A scheinen folglich weitere Domänen von CbfA außerhalb der CTD erforderlich zu sein.

Die vergleichsweise hohe Anzahl 5-FO-resistenter Klone in den Negativkontrollen JH.D[ui/pDXA-3H], JH.D[ui/pPB1] und JH.D[ui/pPB4c] sowie im leer transformierten Stamm JH.D[uivi/pDXA3-H] ist möglicherweise einer erhöhten genetischen Instabilität und damit

einer erhöhten Mutationsrate von JH.D[ura$^-$] zuzuschreiben. Diese Beobachtung wurde bereits in einem früheren Versuch gemacht [BECK 2002]. Dort kam es in JH.D[ui] zu einer deutlich höheren Anzahl 5-FO-resistenter Klone als in DH1[ui].

## 3.10 Einfluss von TAP-CbfA / mutiertem TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A

Wie in Kapitel 3.9 beschrieben, ist CbfA in der Lage, die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in JH.D zu erhöhen. Nun sollte dieses Ergebnis in den Transformanten JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] bestätigt werden (siehe Kapitel 3.4). Diese enthalten neben dem Plasmid TAP-CbfA auch das Plasmid pUiVi mit der bereits beschriebenen TRE-Falle. Zunächst wurde zur Bestimmung des Einflusses von TAP-CbfA auf die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A mit allen positiven Transformanten des Typs JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] eine 5-FO-Selektion durchgeführt. Es wurden vier Transformanten aus dem ersten Durchgang und acht Transformanten aus dem zweiten Durchgang jeweils in Dreifachbestimmung untersucht (Abbildung 56). Die Expression von TAP-CbfA zum Zeitpunkt des *In-vivo*-Retrotranspositionsassays wurde mittels *Western-Blot*-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

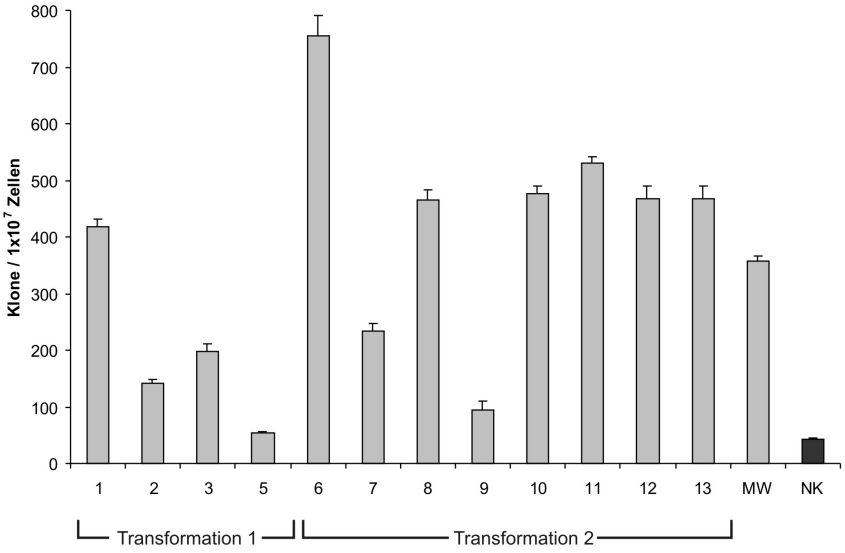



**Abbildung 56: 5-FO-Selektion zur Bestimmung des Einflusses von TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A.** Als Negativkontrolle diente der Stamm JH.D[uivi], der ein tRNA-Gen als Köder für die Integration von TRE5-A enthält, jedoch nur ca. 5 % der Wildtyp-CbfA-Menge exprimiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden durch Auszählung von drei parallelen Selektionen gebildet. Abkürzungen: **MW:** Mittelwert aller Komplementationsklone. **NK:** Negativkontrolle (hier: JH.D[uivi]).

Als Negativkontrolle (NK) diente der Stamm JH.D[uivi], der zwar die TRE-Falle enthält, jedoch nur ca. 5 % der Wildtyp-CbfA-Menge exprimiert. Dargestellt ist die Anzahl 5-FO-resistenter Klone bezogen auf 1 x $10^7$ Zellen. Von den vier Transformanten des ersten

Durchgangs zeigten drei eine Erhöhung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A, einer bildete eine ähnliche Anzahl 5-FO-resistenter Klone aus wie die Negativkontrolle. Von den acht Transformanten des zweiten Durchgangs zeigten sieben einen deutlich positiven Einfluss auf die Retrotransposition von TRE5-A, einer nur einen sehr geringen Einfluss. Der Mittelwert (MW) aller untersuchten Transformanten lag jedoch sogar leicht über dem in JH.D[uivi/pPB4c] bzw. DH1[uivi] beobachteten (siehe Kapitel 3.9. bzw. BECK 2002).

Anschließend sollten die für die Retrotransposition von TRE5-A essentiellen Proteindomänen von CbfA eingegrenzt werden. Dazu wurde mit den bereits in Kapitel 3.7 beschriebenen Transformanten mit mutiertem TAP-CbfA ebenfalls eine 5-FO-Selektion durchgeführt. Es sollte der Einfluss verschiedener Mutationen in TAP-CbfA auf die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A bestimmt werden.

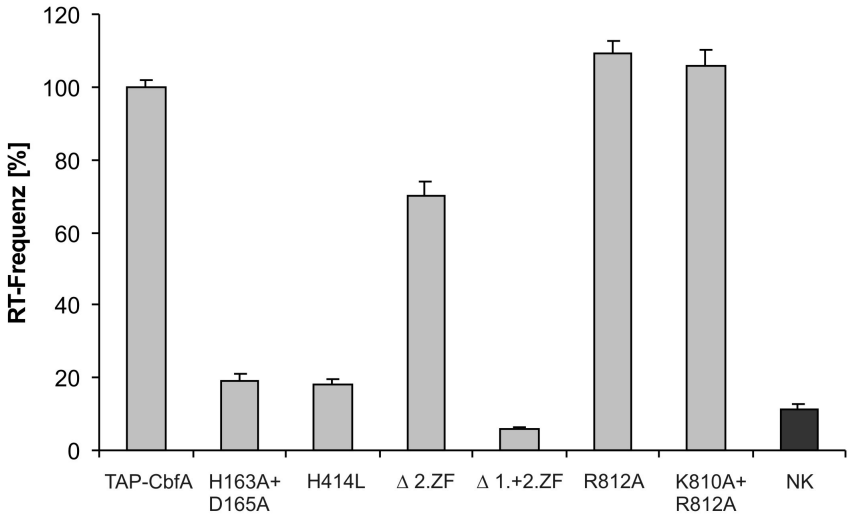



**Abbildung 57: 5-FO-Selektion zur Bestimmung des Einflusses von Mutationen in TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A.** Als Negativkontrolle diente der Stamm JH.D[uivi], der ein tRNA-Gen als Köder für die Integration von TRE5-A enthält, jedoch nur ca. 5 % der Wildtyp-CbfA-Menge exprimiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden durch Auszählung von drei parallelen Selektionen jeweils aller Transformanten eines Typs gebildet. Die Werte sind prozentual dargestellt, wobei die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] gleich 100 % gesetzt wurde. Abkürzungen: **RT-Frequenz:** Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A; **NK:** Negativkontrolle (hier: JH.D[uivi]).

In Abbildung 57 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. Als Negativkontrolle diente erneut der Stamm JH.D[uivi]. Als Positivkontrolle wurde der Mittelwert aller JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]-Transformanten verwendet und gleich 100 % gesetzt (siehe Abbildung 56). Eine deutlich eingeschränkte Komplementation der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A wurde in den Transformanten mit Mutationen im Bereich der JmjC-Domäne (H163A+D165A) von TAP-CbfA beobachtet. Auch CbfA mit Punktmutation im ersten Zinkfinger (H414L) bzw. einer Deletion beider Zinkfinger (Δ1.+2.ZF) führte zu einer stark verringerten Mobilisierung von TRE5-A. Die Expression von CbfA mit einer Deletion des zweiten Zinkfingers (Δ2.ZF)

hingegen bewirkte eine Wiederherstellung der Retrotranspositionsfrequenz zu ca. 75 %. Beide Mutationen im Bereich des AT-Hakens der C-terminalen Domäne von CbfA hatten keine Auswirkung auf die CbfA-abhängige Regulation der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A.

## 3.11 Einfluss von CbfA auf die Expression von RNAi-Komponenten

CbfA bindet nur an das C-Modul, also den Promotor der Minus-Strang-RNA von TRE5-A [HORN *et al.* 1999], nicht jedoch an das A-Modul, das als Promotor der Plus-Strang-RNA fungiert. Daher stellte sich die Frage, wieso auch die Plus-Strang-RNA in Abhängigkeit von CbfA differentiell exprimiert wird. In diesem Zusammenhang wäre ein Eingreifen der RNAi-Maschinerie in *Dictyostelium discoideum* in die Expression von TRE5-A denkbar. Dieser Frage sollte abschließend nachgegangen werden.

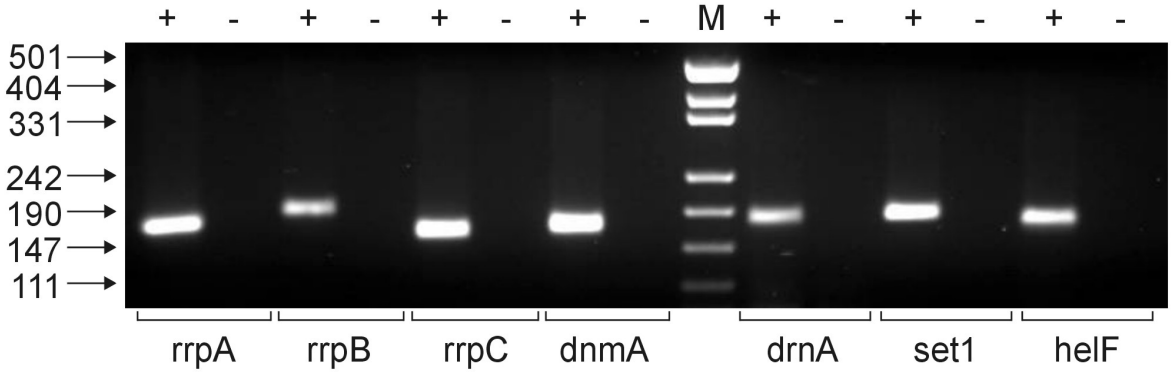



**Abbildung 58: PCR-Analyse der Expression von PTGS-Komponenten in AX2.** Die PCRs wurden jeweils an unspezifischer cDNA (+) und an einer noRT-Kontrolle (-) durchgeführt. Verwendete Primer siehe Kapitel 2.8. **M:** Marker (pUC19 DNA, geschnitten mit MspI). Alle Größenangaben in bp.

Zunächst wurde die Expression von sieben Genen, die im Zusammenhang mit der PTGS-Maschinerie stehen, an cDNA des Stammes AX2 überprüft. Es wurden drei Gene, die für RNA-abhängige RNA-Polymerasen kodieren (*rrpA, rrpB* und *rrpC*), und jeweils ein Gen, das für eine DNA-Methylase (*dnmA*), ein Dicer-Homolog (*drnA*), eine DNA-Methyltransferase (*set1*) bzw. eine Helicase (*helF*) kodiert, erfasst. Dieser Vorversuch diente zudem der Kontrolle der Primerspezifität. Vor allem eine spezifische Amplifikation von *rrpA* und *rrpB*, die sich nur in wenigen Nucleotiden unterscheiden, sollte sichergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 58) und Sequenzierung untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte gezeigt werden, dass *rrpA* und *rrpB* spezifisch erfasst werden. Auch die Identität der anderen Komponenten konnte mittels Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde die differentielle Expression aller sieben Gene in AX2 im Vergleich zu JH.D mittels qRT-PCR bestimmt. Es wurde unspezifische, mit einem poly(dT)$_{18}$-Primer

erzeugte, cDNA als Template eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA wurden neben der relativen Expression der sieben bereits erwähnten Gene zusätzlich die Expression je eines positiv (DDB0167552) und eines negativ (DDB0191229) von CbfA regulierten Genes sowie von TRE5-A bestimmt.

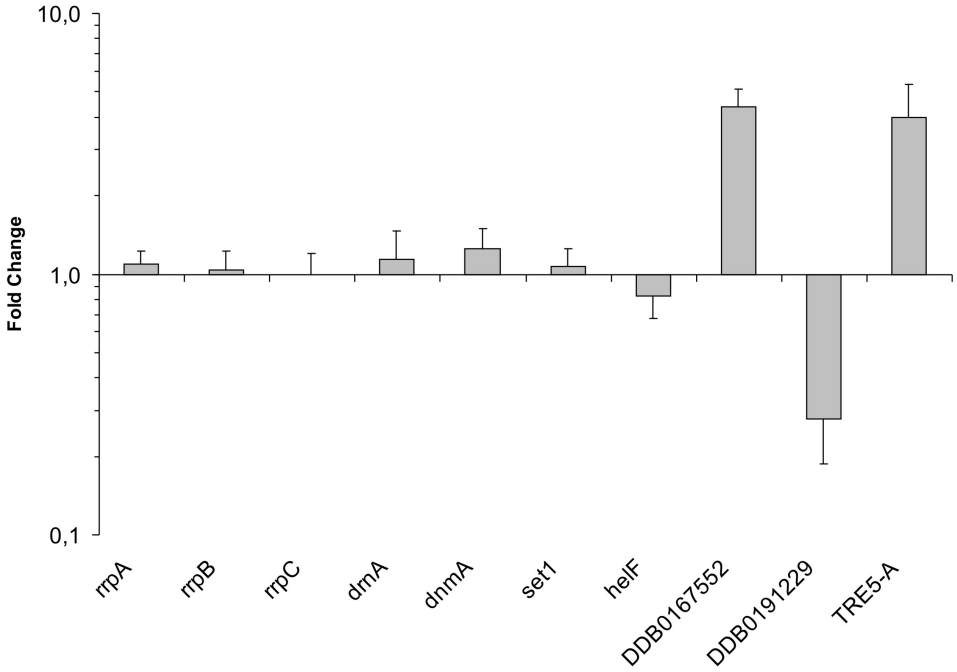



**Abbildung 59: Expression von RNAi-Komponenten in Abhängigkeit von CbfA.** Es wurde die Expression von sieben Genen, die wahrscheinlich in den Mechanismus der RNAi bzw. PTGS eingreifen, in AX2 im Vergleich zur CbfA-Suppressionsmutante JH.D bestimmt. Zur Kontrolle erfolgte die Messung der Expression je eines positiv und eines negativ von CbfA beeinflussten Gens (DDB0167552 bzw. DDB0191229). Zusätzlich wurde die differentielle Expression von TRE5-A bestimmt. Dargestellt ist der *Fold Change*, wobei Werte > 1eine höhere Expression des Gens in AX2, Werte < 1 eine geringere Expression des Gens in AX2 gegenüber JH.D bedeuten. n = 3; ± SD. Referenzgen: *catA*.

Abbildung 59 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR. Es ist die Expression aller Komponenten in AX2 zu JH.D dargestellt. Die drei Kontrollgene wurden in bereits bekanntem Ausmaß und in der entsprechenden Richtung CbfA-abhängig exprimiert. Die sieben Komponenten der PTGS-Maschinerie hingegen wurden in AX2 zu JH.D nicht signifikant differentiell exprimiert. Das Ergebnis deutet auf eine von diesen sieben PTGS-assoziierten Komponenten unabhängige Regulation der TRE5-A-Expression hin.

# 4. Diskussion

Der C-Modul-bindende Faktor A ist ein Protein, das in vegetativ wachsenden Zellen und zu allen Zeitpunkten der multizellulären Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* gebildet wird [BECK 2002]. Die Suppression von CbfA im Stamm JH.D ergab, dass CbfA als Transkriptionsfaktor fungiert und so direkt bzw. indirekt die Expression mehrerer hundert Gene reguliert [LUCAS *et al.* 2009]. Neben der fehlenden Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung weist JH.D eine verringerte Expression von Transkripten des Retrotransposons TRE5-A auf [WINCKLER *et al.* 2001, 2004; BECK 2002; LUCAS 2009].

## 4.1 Einfluss von CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A

In Experimenten vor dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Menge von TRE5-A-RNA in JH.D im Vergleich zu AX2 stark verringert ist [BECK 2002]. Dieses traf sowohl für die Minus-Strang-RNA als auch für die Plus-Strang-RNA zu. Die Expression von rekombinantem CbfA in JH.D führte zu einer Erhöhung beider TRE5-A-RNAs. Der gleiche Effekt wurde durch die Expression der CTD ($CbfA^{724-998}$) erzielt (siehe Abbildung 47). Daher stellte sich die Frage, ob CbfA bzw. dessen CTD nicht nur die Expression, sondern auch die Retrotransposition von TRE5-A beeinflussen könnten. Mittels *In-vivo*-Retrotranspositionsassay konnte gezeigt werden, dass die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A im CbfA-Wildtyp-Stamm DH1 um den Faktor 20 höher war als im CbfA-Suppressionsstamm JH.D [BECK 2002]. DH1 ist ein Abkömmling von AX3, während JH.D von AX2 abstammt. Aufgrund der unterschiedlichen Genese beider Stämme könnte ein formaler Grund für die unterschiedliche Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A darin liegen, dass die TRE5-A-Population in AX2 und damit auch in dessen Abkömmling JH.D inaktiv, in AX3 und damit in DH1 jedoch aktiv ist. Um diese Ursache ausschließen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Retrotransposition von TRE5-A in JH.D durch Komplementationsanalysen untersucht. Als Grundlage des Experimentes wurde der CbfA-unterexprimierende Stamm JH.D[$ura^-$] verwendet, der auxotroph für Uracil ist. Er weist eine vollständige Deletion des *pyr5-6*-Gens auf, das für die UMP-Synthase kodiert. Daher konnte über die Einführung der sogenannten TRE-Falle (Plasmid pUiVi) eine Uracil-Prototrophie erreicht und gleichzeitig ein Integrationsziel für TRE5-A in artifizieller Umgebung geschaffen werden (Stamm JH.D[uivi]).

Der anschließende *In-vivo*-Retrotranspositionsassay führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Expression von $CbfA^{2-998}$ führte zu einer um den Faktor 4 erhöhten Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A im Vergleich zu den Negativkontrollen. Dieses Ergebnis bestätigte die früheren Experimente [BECK 2002]. Dort waren eine Erhöhung der TRE5-A-RNA durch CbfA sowie eine erhöhte Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in

DH1 im Vergleich zu JH.D zu verzeichnen gewesen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch erstmals direkt im CbfA-Suppressionsstamm JH.D eine CbfA-Abhängigkeit der Retrotransposition von TRE5-A gezeigt werden (siehe Abbildung 55).

2. Die Expression von CbfA$^{724\text{-}998}$ führte nicht zu einer erhöhten Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A im Vergleich zu den Negativkontrollen. Dieses Ergebnis war überraschend, da die CTD von CbfA allein in der Lage ist, die RNA-Menge von TRE5-A zu erhöhen (siehe Abbildung 54). Dieses gilt sowohl für die Plus- als auch für die Minus-Strang-RNA (siehe Abbildung 47). Es scheint so zu sein, dass die CTD von CbfA zur Erhöhung der Expression von TRE5-A ausreichend ist, dass jedoch zur Retrotransposition weitere Bereiche von CbfA außerhalb der CTD benötigt werden. Denkbar wäre, dass ein bislang unbekannter Faktor zur Retrotransposition, z. B. für die Integration von TRE5-A, nicht von der CTD aktiviert bzw. dass ein Faktor, der der Integration entgegensteht, nicht von der CTD allein reprimiert wird. *Microarray*-Experimente zeigten, dass nur etwa die Hälfte aller CbfA-abhängig regulierten Gene von der CTD beeinflusst wird [LUCAS *et al.* 2009].

Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine wichtige Funktion der JmjC-Domäne von CbfA für die Retrotransposition von TRE5-A sein. Möglicherweise weist die JmjC-Domäne eine Histon-Demethylase-Aktivität auf, wie sie für andere Jumonji-Proteine, z. B. JHDM1, JMJD6 und KDM2A im Menschen [TSUKADA *et al.* 2006; CHANG *et al.* 2007; TANAKA *et al.* 2010], JMJ14 in *Arabidopsis* [JEONG *et al.* 2009; LU *et al.* 2010] sowie Rph1 aus *Saccharomyces cerevisiae* [CHANG *et al.* 2010] nachgewiesen werden konnte. In dem Fall könnte CbfA durch seine JmjC-Domäne eine Demethylierung von Histonen bewirken. Möglicherweise wird dadurch ein Faktor positiv von CbfA reguliert, der für die Retrotransposition wichtig ist, zum Beispiel für die DNA-Reparatur. Ein Einfluss von Komponenten der DNA-Reparatur auf die Transposition eines mittels TPRT-Mechanismus (*target primed reverse transcription*) inserierenden Retrotransposons wurde für das humane L1 gezeigt [ICHIYANAGI *et al.* 2007]. Ein Indiz für eine durch CbfA-Mangel gestörte DNA-Reparatur könnte die beobachtete erhöhte Anzahl 5-FO-resistenter Klone im Stamm JH.D[ui] im Vergleich zum CbfA-Wildtyp-Stamm DH1[ui] sein (vgl. BECK 2002). In JH.D scheint es eine erhöhte Mutationsrate zu geben.

Wie der N-terminale Bereich von CbfA in die Erhöhung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A eingreift, wird in weiteren Experimenten zu untersuchen sein. Es kann jedoch als sehr wahrscheinlich angesehen werden, dass er für die Mobilisierung bzw. Integration des Retrotransposons von besonderer Bedeutung ist. Bekräftigt wird diese Aussage von weiteren im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten. Es wurde beobachtet, dass durch CbfA-Mutanten, die im Bereich der JmjC-Domäne und der Zinkfinger verändert waren, nur

eine eingeschränkte Komplementation der Retrotranspositionsaktivität von TRE5-A erreicht werden konnte (siehe Kapitel 3.10, 4.3.2 und 4.3.3).

## 4.2 Einfluss von CbfA auf die PTGS-Maschinerie der Zelle

Amplifikation und Integration von Transposons stellen eine Gefahr für die Wirtszelle dar. Es kann zur Insertionsmutagenese essentieller Gene und zur Genominstabilität kommen. Dies ist besonders problematisch in haploiden bzw. sehr dichten Genomen wie dem von *Dictyostelium discoideum*, das zu 67 % kodierend ist. Aus diesem Grund muss die Amplifikation mobiler genetischer Elemente durch die Wirtszelle kontrolliert werden. CbfA konnte aufgrund seiner Fähigkeit, an das C-Modul des Retrotransposons TRE5-A zu binden, identifiziert und aufgereinigt werden [GEIER *et al.* 1996]. Daher wurde dieses Protein als möglicher Wirtsfaktor für die negative Kontrolle des Retrotransposons vermutet.

Die ursprüngliche Hypothese war, dass CbfA eine Erhöhung der Minus-Strang-RNA-Menge bewirkt, die von der PTGS-Maschinerie erkannt und in doppelsträngige RNA (dsRNA) vervollständigt würde [MARTENS *et al.* 2002]. In der Folge käme es zur Prozessierung dieser dsRNA zu siRNAs, die den Abbau von Plus- und Minus-Strang-RNA von TRE5-A bewirkten.

Im CbfA-Suppressionsstamm JH.D wurde jedoch eine geringere Menge von TRE5-A-Transkripten gefunden (siehe Abbildung 47). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass CbfA zur Akkumulation von TRE5-A-Transkripten beiträgt und nicht zu deren Suppression.

Um zu zeigen, dass die Verringerung der TRE5-A-Transkriptmenge wirklich auf CbfA-Mangel beruht, wurden Komplementationsstudien durchgeführt. Sowohl CbfA als auch dessen CTD führten zu einer verstärkten Expression der Plus- und Minus-Strang-RNA von TRE5-A (siehe Abbildung 47). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die CbfA-abhängige Aufrechterhaltung hoher TRE5-A-Transkriptlevel mit einer erhöhten Retrotranspositionfrequenz korreliert (siehe Kapitel 3.9 und 4.1). Es liegt der Schluss nahe, dass CbfA die Retrotransposition von TRE5-A durch die Kontrolle der absoluten Transkriptmenge reguliert, die für die Translation der TRE5-A-Proteine sowie die Reverse Transkription der Plus-Strang-RNA von TRE5-A und deren nachfolgende Integration in chromosomale Regionen verfügbar ist. Ausgehend von den bislang vorgestellten Ergebnissen waren zwei sich gegenseitig ausschließende Hypothesen denkbar:
Erstens könnte CbfA *in vivo* gleichzeitig die Aktivitäten von A-Modul und C-Modul regulieren. Dadurch käme es zum gleichzeitigen Anstieg bzw. zur gleichzeitigen Abnahme von Plus- und Minus-Strang-RNA-Menge in Abhängigkeit von CbfA. Zweitens könnten die TRE5-A-Expressionslevel von einem PTGS-Mechanismus kontrolliert werden, der zur gleichzeitigen Degradation von Plus- und Minus-Strang-RNA führt.

Beide Hypothesen sollen im Folgenden analysiert werden. Eine Erklärung für das gleichzeitige Absinken von Plus- und Minus-Strang-RNA könnte eine regulierende Funktion von CbfA an beiden Promotoren, dem A-Modul und dem C-Modul, von TRE5-A sein. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden in einer parallelen Arbeit beide Promotoren in einen Luciferase-Reportergen-Vektor kloniert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität jeweils in AX2 und JH.D ergab keinen signifikanten Unterschied der Promotoraktivität [WINCKLER, nicht veröffentlichte Daten]. Dieser Versuch deutet darauf hin, dass CbfA keinen regulierenden Effekt auf die Promotoren von TRE5-A ausübt.

Im Folgenden soll daher der Einfluss von PTGS-Mechanismen auf die Expression von TRE5-A betrachtet werden. Um zu untersuchen, ob PTGS die TRE5-A-Transkriptmenge reguliert, wurden in parallelen Arbeiten weitere Versuche durchgeführt.

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob die TRE5-A-Expression in Mutanten beeinflusst ist, die Defekte in Genen haben, die mit PTGS in Verbindung stehen. In diesem Falle wäre eine Stabilisierung von TRE5-A-Transkripten zu beobachten. Es wurden Mutanten folgender Gene mittels qRT-PCR untersucht [DÖLZ 2010]:

- alle drei RNA-abhängigen RNA-Polymerasen des *Dictyostelium-discoideum*-Genoms, die vermutlich verschiedene Funktionen in PTGS haben (kodiert von *rrpA*, *rrpB* und *rrpC*) [MARTENS *et al.* 2002],
- eine Mutante mit Defekt einer PTGS-assoziierten Helicase (kodiert von *helF*) [POPOVA *et al.* 2006],
- eine Mutante mit Defekt eines Proteins der epigenetischen DNA-Methylierung (kodiert von *dnmA*) [KUHLMANN *et al.* 2005],
- eine Mutante, der die H3K4-Methyltransferase Set1 (kodiert von *set1*) fehlt [CHUBB *et al.* 2006].

Zusätzlich zur TRE5-A-Transkriptmenge wurden auch die Expressionslevel der Retrotransposons DIRS-1 und *Skipper* untersucht, da beide sensitiv für PTGS-Mechanismen sind [KUHLMANN *et al.* 2005]. Die Expression von Skipper stieg in *rrpA* $^-$-, *rrpC* $^-$- und *dnmA* $^-$-Mutanten an und ist nur zu einem geringem Grad abhängig von der HelF-Funktion bzw. der H3K4-Methylierung. DIRS-1 hingegen war in der *rrpC* $^-$- und der *helF* $^-$-Mutante überexprimiert und in *set1* $^-$ stark verringert. Im Vergleich dazu wurde TRE5-A von allen Komponenten nur gering beeinflusst [DÖLZ 2010]. In *rrpA* $^-$- und *rrpC* $^-$-Mutanten war eine ca. 2-fache Überexpression von TRE5-A zu verzeichnen. Möglicherweise ist CbfA in der Lage, die Expression von TRE5-A durch Modulierung der PTGS-Aktivität zu beeinflussen. Daher stellte sich die Frage, ob die PTGS-abhängigen Retrotransposons *Skipper* und DIRS-1 in der CbfA-Mangelmutante JH.D differentiell exprimiert werden. Die Expression von DIRS-1 war in

JH.D unverändert [DÖLZ 2010]. Es wurde jedoch eine 3,2-fache Unterexpression von *Skipper* in JH.D gemessen. Die ursprüngliche Transkriptmenge konnte durch ektopische Expression von CbfA wiederhergestellt werden, nicht jedoch durch Expression der CTD [DÖLZ 2010]. Dieses Ergebnis zeigte, dass ein mechanistischer Unterschied zur Beeinflussung der Expression von TRE5-A besteht, da dessen Transkriptmenge sowohl durch ektopische Expression von CbfA als auch von dessen CTD erhöht werden konnte (siehe Kapitel 4.1). Die Regulierung des *Skipper*- und TRE5-A-Transkriptlevels folgt somit vermutlich verschiedenen Mechanismen.

Die nächste Frage war, ob die Expression eines oder mehrerer der oben genannten Gene, die für PTGS benötigt werden, von CbfA abhängig ist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit qRT-PCR-Messungen der relativen Expression aller genannten Gene in AX2 zu JH.D durchgeführt. In die Messungen wurde ebenfalls das Gen für ein *Dicer*-Homolog in *Dictyostelium discoideum* (*drnA*) einbezogen. Dieser Versuch ergab, dass die Expression keines der getesteten PTGS-assoziierten Gene von CbfA abhängig war (siehe Kapitel 3.11).

Aus den vorherigen Betrachtungen lässt sich folgern, dass CbfA ein Wirtsfaktor für die Retrotransposition von TRE5-A ist. Vermutlich steuert CbfA die Retrotransposition von TRE5-A aufgrund seiner generellen Rolle als Transkriptionsregulator. In *Microarray*- und Illumina-RNA-Sequenzierungs-Experimenten wurde gezeigt, dass CbfA mehrere hundert Gene reguliert [LUCAS *et al.* 2009; WINCKLER, Manuskript in Vorbereitung]. Da die CTD von CbfA zwar ausreichend ist, um die Transkriptmenge von TRE5-A zu erhöhen, aber nicht die Retrotranspositionsfrequenz, sind die folgenden Erklärungen möglich: Ein noch zu identifizierender CbfA-, aber nicht CTD-abhängiger Faktor könnte für die Retrotransposition von TRE5-A erforderlich sein. Alternativ könnten Teile des CbfA-Proteins außerhalb der CTD (z. B. die JmjC-Domäne) eine Chromatin-modulierende Aktivität besitzen, die für die Integration von TRE5-A erforderlich ist.

Die TRE5-A-Expression ist weniger empfindlich gegenüber PTGS als *Skipper* und DIRS-1 [KUHLMANN *et al.* 2005; DÖLZ 2010]. Es könnte jedoch dennoch ein empfindliches Gleichgewicht des TRE5-A-Transkriptlevels existieren und unter Kontrolle der PTGS-Maschinerie stehen. Ob die Regulation von TRE5-A durch PTGS in CbfA-abhängiger Weise erfolgt, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden. Möglicherweise kann der starke Effekt von CbfA dadurch erklärt werden, dass ein in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchtes Genprodukt, das kritisch in PTGS involviert ist, durch CbfA reguliert wird.

## 4.3 Funktionen der CbfA-Domänen

### 4.3.1 Komplementation von JH.D und JH.D[ura$^-$] mit Gesamt-CbfA

CbfA ist ein Multi-Domänen-Protein. Die Funktion der einzelnen Domänen sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu musste in JH.D zunächst rekombinantes CbfA exprimiert werden. Anschließend sollten in dem Komplementationsstamm die Auswirkungen von Mutationen in verschiedenen Domänen von CbfA untersucht werden.

In JH.D[pPB4c] wurde CbfA$^{2\text{-}998}$ unter Kontrolle des starken Aktin-15-Promotors exprimiert. Die Selektion durch G418 führte zu einer *High-Copy*-Situation. JH.D[pPB4c] exprimierte ähnliche Mengen CbfA-Protein wie AX2 (siehe Abbildung 32). Die Expression von CbfA führte in JH.D[pPB4c] zur Heilung des Entwicklungsphänotyps sowie zur Erhöhung der Transkriptmenge und der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A (siehe Abbildungen 22, 54 und 55). JH.D besitzt zwei Allele für *cbfA*, von denen eines nicht funktionell ist. Eine Rekombination zwischen den genomischen Kopien und der Plasmid-kodierten *cbfA*-Kopie war nicht auszuschließen. Diese könnte in der Rekonstitution eines intakten *cbfA*-Gens resultiert haben, welches die eingeführte zu untersuchende Mutation nicht trägt. Daher sollte die Möglichkeit geschaffen werden, zwischen rekombinantem und endogenem Protein unterscheiden zu können. CbfA wurde deshalb N-terminal mit einem TAP-Tag fusioniert. Um die Expression von TAP-CbfA den physiologischen Bedingungen anzupassen, wurde *cbfA* unter die Kontrolle des eigenen Promotors und des eigenen Terminators gestellt. Dieses TAP-CbfA sollte in zwei verschiedenen Stämmen exprimiert werden. In JH.D erfolgte die Selektion von Transformanten mittels G418, so dass eine *High-Copy*-Situation entstand (siehe Kapitel 3.3). Die Transformanten vom Typ JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] exprimierten das Fusionsprotein, das von Wildtyp-CbfA mittels *Western Blot* eindeutig unterschieden werden konnte. Die Expression war etwas geringer als die CbfA-Expression in AX2 (siehe Abbildung 32 B). Dagegen wurden in JH.D[ura$^-$] Transformanten mittels Uracil-Prototrophie selektioniert (siehe Kapitel 3.4). Damit wurde eine *Low-Copy*-Situation geschaffen, um eine Überexpression zu vermeiden und den physiologischen Gegebenheiten besser zu entsprechen. Die Transformanten vom Typ JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] exprimierten etwas geringere Mengen TAP-CbfA als JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA]. Die Expression war deutlich geringer als die CbfA-Expression in AX2 (siehe Abbildung 32 A/B).

Durch Expression des TAP-CbfA-Fusionsproteins war eine Unterscheidung des rekombinanten Proteins von Wildtyp-CbfA möglich. Damit konnte sicher belegt werden, dass die Plasmid-kodierte Kopie exprimiert wurde und eine Grundlage für die Untersuchung von Mutationen verschiedener Aminosäuren in CbfA geschaffen werden. Allerdings ergab sich durch die Methode der TAP-CbfA-Expression die folgende Schwierigkeit: Das Plasmid

TAP-CbfA enthielt nicht das gesamte *cbfA*-Gen. Auf das Intron wurde verzichtet, um Rekombinationsereignisse zu verhindern, da sich eine Kopie des Introns im *pyr5-6*-Gen der TRE-Falle des Plasmides pUiVi befindet. Dieses Plasmid wurde in JH.D[ura$^-$] co-transformiert, um die Selektion von Transformanten und die Untersuchung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA zu ermöglichen. Daher konnte das *cbfA*-Gen beim Klonieren nicht komplett amplifiziert werden. Zunächst wurde deshalb das Exon 2 mit Terminator in den Vektor pGEM-T kloniert (Plasmid siehe Abbildung 19). Danach wurde der *cbfA*-Promotor in pGEM_cbfA-Ex2+Term kloniert. Da der TAP-Tag N-terminal an CbfA fusioniert werden sollte, konnte das Exon 1 nicht zusammen mit dem *cbfA*-Promotor amplifiziert werden. Die Klonierung der 180 bp, die für Exon 1 kodieren, in den bereits ca. 8,3 kb großen Vektor (pGEM_cbfAp-NTAPNYFP+Ex2+Term) gelang nicht. Da CbfA-Proteine verschiedener Spezies im Bereich von Exon 1 nicht homolog zueinander sind, wurde letztendlich auf eine Klonierung von Exon 1 verzichtet. Somit kodiert das Plasmid TAP-CbfA für das Protein CbfA$^{61\text{-}1000}$. Obwohl eine Beeinträchtigung der CbfA-Funktion durch den N-terminalen TAP-Tag nicht zu erwarten war, konnte diese Möglichkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden. So könnte eine falsche Faltung des Proteins die Folge gewesen sein. Daher wäre eine schlechtere Funktionalität von TAP-CbfA im Vergleich zu CbfA$^{2\text{-}998}$ möglich.

Die Expression von TAP-CbfA in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] führte zur Komplementation der Regulation CbfA-abhängiger Gene (siehe Abbildung 29). Der Entwicklungsphänotyp konnte jedoch nicht vollständig geheilt werden (siehe Abbildung 22). Dafür sind mehrere Gründe denkbar: Erstens konnte im *Western Blot* ermittelt werden, dass die Menge des gebildeten Proteins etwas geringer war als die Wildtyp-CbfA-Menge in AX2. Möglicherweise war sie nicht ausreichend zur Vermittlung der multizellulären Entwicklung. Zweitens kodierte das Plasmid TAP-CbfA für die Aminosäuren 61 bis 1000 von CbfA. Allerdings könnte Exon 1, welches für die ersten 60 Aminosäuren kodiert, eine Rolle für die Funktionsfähigkeit von CbfA spielen. Diese beiden Gründe konnten im Verlauf der Experimente ausgeschlossen werden, da TAP-CbfA in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] trotz geringerer Expression und Fehlens von Exon 1 zur Komplementation der Entwicklung führte. Drittens könnte das in JH.D gebildete TAP-CbfA nicht funktionell sein, z. B. aufgrund einer nicht korrekten Faltung des Proteins oder in JH.D fehlender posttranskriptioneller Prozessierung. Mittels *Pulldown-Assay* erfolgte ein *In-vitro*-Nachweis der Fähigkeit zur Sequenz-spezifischen Bindung von TAP-CbfA aus JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] an das C-Modul und den *acaA*-Promotor. Dennoch kann eine falsche Faltung bzw. Prozessierung des N-Terminus von TAP-CbfA nicht ausgeschlossen werden. Viertens wäre es möglich, dass JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] nicht zur Induktion der entwicklungsrelevanten Gene *acaA* und *csaA* fähig war, obwohl TAP-CbfA *in vitro* an den *acaA*-Promotor binden konnte. Nach dem Pulsen mit nanomolaren Mengen von cAMP zeigte

JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] jedoch die Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung (siehe Abbildung 45 A). Die entstandenen Fruchtkörper ähnelten in Größe und Anzahl denen von AX2. Auch JH.D ist nach dem Pulsen mit cAMP in der Lage, vereinzelte und kleinere Fruchtkörper zu bilden und eine erhöhte Menge Adenylatcyclase A im Gegensatz zu ungepulsten Zellen zu exprimieren. Die Expression entwicklungsrelevanter Gene und die Entwicklung treten jedoch in gepulsten JH.D zeitverzögert auf [WINCKLER *et al.* 2004]. Das heißt, dass durch cAMP-Gabe nicht alle Funktionen von CbfA ersetzt werden können. Die Menge an *acaA*-mRNA in JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] überstieg die Menge in leer transformierten JH.D[pDXA-3H] (siehe Abbildung 45 A). Diese Tatsache zeigte, dass TAP-CbfA nicht nur *in vitro* an den *acaA*-Promotor binden, sondern nach cAMP-Pulsen auch *in vivo* zu einer Expressionssteigerung von *acaA* führen konnte. Möglicherweise war JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] nicht in der Lage, einen anderen Faktor im Regelkreislauf der multizellulären Entwicklung zu aktivieren.

In JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] konnte durch Expression von TAP-CbfA eine Komplementation des Entwicklungsphänotyps erreicht werden. Zwölf Transformanten aus mehreren unabhängigen Transformationen zeigten sowohl auf Phosphatagar-Platten als auch auf *Klebsiella planticola* eine multizelluläre Entwicklung. Allerdings waren die Fruchtkörper kleiner und zahlreicher als in AX2 und im Stamm JH.D[pPB4c] (siehe Abbildungen 22 und 27). Im Unterschied zu JH.D[neo$^R$/TAP-CbfA] konnte in hungernden JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] bereits ohne cAMP-Gabe eine erhöhte Expression von *acaA* und *csaA* im Vergleich zu JH.D[ura$^-$] nachgewiesen werden (siehe Abbildung 46 A/B). Das heißt, TAP-CbfA aus JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] war in der Lage, die aggregationsspezifische Adenylatcyclase A zu aktivieren und damit die multizelluläre Entwicklung zu komplementieren. Die Komplementation der Entwicklung, die Induktion der *acaA*-Expression und der *In-vitro*-Nachweis der Sequenz-spezifischen Bindung von TAP-CbfA aus JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] an das C-Modul von TRE5-A und den *acaA*-Promotor (siehe Abbildung 33) sowie eine erhöhte Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A (siehe Abbildung 56) bewiesen die Funktionalität des rekombinanten Fusionsproteins. Eine Komplementation der Regulation weiterer untersuchter CbfA-abhängiger Gene ergab sich jedoch nicht (siehe Abbildung 31).

Zusammenfassend ist somit zu vermuten, dass für eine AX2 entsprechende Komplementation von multizellulärer Entwicklung, CbfA-abhängiger Genregulation und der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A eine *High-Copy*-Situation erforderlich ist. Das in JH.D[pPB4c] exprimierte CbfA ist jedoch nicht von Wildtyp-CbfA zu unterscheiden und daher nicht für die Analyse von Mutationen geeignet. Die Expression von TAP-CbfA in JH.D führte nicht zur Komplementation des Entwicklungsphänotyps und war nicht stabil. Daher wurde letztlich entschieden, die Funktion der einzelnen CbfA-Domänen im JH.D[ura$^-$]-Hintergrund

zu untersuchen. Dieses Vorgehen bot zudem die Möglichkeit, die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA und mutiertem CbfA zu untersuchen.

### 4.3.2 Auswirkungen von Mutationen in der JmjC-Domäne in CbfA

Wie bereits in Punkt 4.3.1 beschrieben, wurden die folgenden Komplementationsversuche in JH.D[ura$^-$] durchgeführt, da sich dieser Stamm in vorherigen Experimenten als geeignet zur Komplementation erwiesen hatte. In das Plasmid TAP-CbfA wurden Mutationen in verschiedenen Bereichen, die für funktionelle Proteindomänen von CbfA kodieren, eingeführt. Anschließend wurde die multizelluläre Entwicklung der Transformanten sowie die Expression der Entwicklungsgene *acaA* und *csaA* untersucht. Ebenfalls bestimmt wurde die CbfA-abhängige Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A.

Aufgrund einer Strukturähnlichkeit von JmjC-Proteinen zu Cupinen wurde eine Metalloenzymfunktion solcher Domänen vermutet. Vermutlich dienen dabei konservierte Aminosäuren in dem Motiv HX(D/E)$X_n$H der Komplexierung eines Eisen-Ions [ELKINS *et al.* 2003]. CbfA enthält alle erforderlichen Aminosäuren an konservierten Positionen. Diese sind H163, D165 und H246 [CLISSOLD & PONTING 2001]. Es wurden zahlreiche Mitglieder aus der Familie der JmjC-Proteine als Histon-Demethylasen identifiziert [u.a. AGGER *et al.* 2008]. Möglicherweise handelt es sich bei CbfA aufgrund seiner JmjC-Domäne ebenfalls um eine Histon-Demethylase.

In der vorliegenden Arbeit wurden Histidin an Position 163 und Asparaginsäure an Position 165 in TAP-CbfA jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Der Austausch von H163 und D165 bewirkt sehr wahrscheinlich eine Zerstörung der katalytischen Aktivität der JmjC-Domäne [CLISSOLD & PONTING 2001; HONDA *et al.* 2010; YU *et al.* 2010]. Die Untersuchung des Entwicklungsphänotyps positiver Transformanten zeigte jedoch, dass die Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung nicht beeinträchtigt war. Alle sechs Transformanten aus zwei unabhängigen Transformationen waren in der Lage, sich zu entwickeln und Fruchtkörper zu bilden (siehe Abbildung 39). Anzahl und Größe der Fruchtkörper waren mit denen von JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] vergleichbar. Die Transformanten waren ebenfalls bereits ohne exogene cAMP-Pulse zur Expression der Entwicklungsgene *acaA* und *csaA* fähig (siehe Abbildung 46 A/B).

Es wäre denkbar, dass der Austausch von H163 und D165 die enzymatische Funktion der JmjC-Domäne nicht zerstört. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie Studien an weiteren Jumonji-Proteinen sprechen jedoch dafür, dass der Austausch dieser beiden konservierten Aminosäuren die enzymatische Funktion von JmjC eliminiert. Honda und Kollegen zeigten

an DMM-1, einem Modulator der DNA-Methylierung aus *Neurospora crassa*, dass der Austausch H216A zum Ausfall der Funktion des Proteins führte. Die Mutation bewirkte eine Zerstörung der Fe(II)-Bindestelle in der JmjC-Domäne [HONDA *et al.* 2010]. Für den Prozess der oxidativen Demethylierung von Histonen werden Fe(II) und α-Ketoglutarat als Co-Faktoren benötigt [KLOSE *et al.* 2006]. Yu und Mitarbeiter zeigten an Gis1 aus der Hefe, dass durch den Austausch von H204 und D206 die Bindung von Fe(II) als Co-Faktor der Enzymfunktion nicht mehr möglich war [YU *et al.* 2010]. An der dritten konservierten Position befindet sich in Gis1 kein Histidin, sondern Tyrosin, das nicht an der Fe(II)-Bindung beteiligt ist. Im menschlichen JMJD2 sind die drei Aminosäuren H188, E190 und H276 konserviert und für die Fe(II)-Bindung verantwortlich [WHETSTINE *et al.* 2006; siehe Abbildung 60].

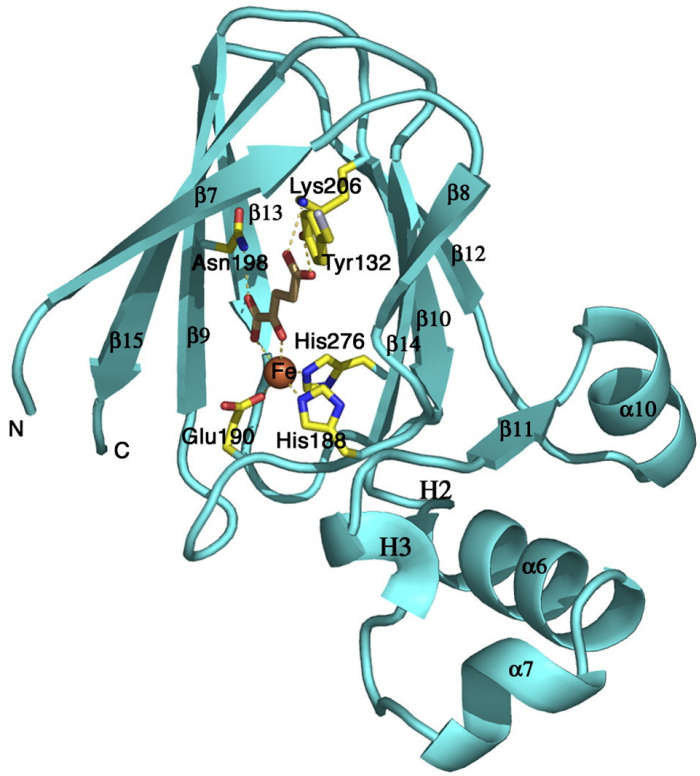



**Abbildung 60: Darstellung der JmjC-Domänen-Struktur von JMJD2.** Die Koordination des Fe(II)-Ions durch die Aminosäuren His 188, Glu 190 und His 276 ist farblich gekennzeichnet. Abbildung aus CHEN *et al.* 2006.

Der Austausch des Histidins an Position 188 durch Alanin führte zur Zerstörung der Demethylase-Aktivität des Proteins. Im Protein Rph1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, das ortholog zu menschlichem JMJD2A ist, wird die Fe(II)-Bindung durch H235, E237 und H323 vermittelt [CHANG *et al.* 2010]. Alle drei Aminosäuren wurden einzeln gegen Alanin ausgetauscht. Die Mutationen führten ohne Unterschied zum Ausfall der H3-K36me3-Demethylaseaktivität. Im Protein Yjr119Cp der Hefe bewirkte der Austausch von H427 innerhalb der JmjC-Domäne ebenso einen Ausfall der H3-K4me3-Demethylaseaktivität [SEWARD *et al.* 2007].

In der vorliegenden Arbeit konnte in Versuchen zum Einfluss von CbfA auf die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A gezeigt werden, dass der Austausch von H163 und D165 gegen Alanin die Funktion von CbfA stark beeinträchtigte (siehe Kapitel 3.10). Dieser Austausch im Bereich des katalytischen Zentrums der JmjC-Domäne von CbfA führte zu einer um ca. 80 % verringerten Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A im Vergleich zu JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA]. Dieses Ergebnis lieferte erstmals einen Beleg dafür, dass die enzymatische Funktion der JmjC-Domäne von CbfA durch den Austausch von H163 und D165 durch Alanin tatsächlich zerstört wird. Die JmjC-Domäne von CbfA ist somit essentiell für die Vermittlung der Retrotransposition von TRE5-A. Diese Aussage wird gestützt durch weitere Ergebnisse aus Experimenten zur CbfA-abhängigen Retrotransposition von TRE5-A. Es konnte ein Einfluss von Gesamt-CbfA, nicht jedoch von dessen CTD (der die JmjC-Domäne, die Zinkfinger-Motive und ein Teil des Poly-Asparagin-Bereiches fehlen) auf die Retrotranspositionsfrequenz ermittelt werden (siehe Abbildung 55).

Obwohl diese Versuche auf die Zerstörung des katalytischen Zentrums der JmjC-Domäne durch den Austausch H163A und D165A hinweisen, war das mutierte Protein in der Lage, die multizelluläre Entwicklung zu komplementieren. Folglich wäre zu vermuten, dass die Funktion der JmjC-Domäne von CbfA bezüglich der Vermittlung der multizellulären Entwicklung in *Dictyostelium discoideum* nicht auf einer Histon-Demethylase-Aktivität beruht. Dieses würde bedeuten, dass JmjC eine nicht-enzymatische Funktion vermitteln könnte. An Gis1 aus der Hefe konnte gezeigt werden, dass die Funktion des gesamten Proteins bezüglich der Aktivierung von Genen zur Synthese der Sporenwand im Verlauf der Sporulation nicht durch den Austausch von H204 und D206 beeinflusst wurde. Auch eine Deletion der kompletten JmjC-Domäne zeigte keinen Einfluss auf die Funktionalität, sondern lediglich auf die Stabilität von Gis1 [YU *et al.* 2010]. Ähnliches wurde für das Protein Epe1 aus *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben [ZOFALL & GREWAL 2006; TREWICK *et al.* 2007]. Epe1 bewirkt eine Modifizierung von Heterochromatin, für die die JmjC-Domäne essentiell ist, obwohl keine Histon-Demethylase-Aktivität gezeigt werden konnte. Zudem konnte an der H3-K4me3-Demethylase Lid aus *Drosophila* gezeigt werden, dass deren enzymatische Aktivität nicht essentiell für die Entwicklung ist [LI *et al.* 2010]. Der Austausch von H637 und E639 in der JmjC-Domäne durch Alanin führte zum Ausfall der Demethylase-Funktion. Trotzdem konnte der durch Lid-Mangel verursachte Phänotyp mittels ektopischer Expression des mutierten Proteins geheilt werden. Diese Versuche deuten auf die Möglichkeit einer Demethylase-unabhängigen Funktion der JmjC-Domäne hin, wie sie in der vorliegenden Arbeit für die Vermittlung der multizellulären Entwicklung in *Dictyostelium discoideum* durch CbfA gezeigt wurde.

### 4.3.3 Auswirkungen von Mutationen der Zinkfinger-Motive in CbfA

Als nächstes wurden Mutationen bzw. Deletionen im Bereich der Zinkfingermotive in TAP-CbfA eingeführt. Die Deletion des 2. Zinkfinger-Motivs bewirkte eine eingeschränkte Komplementation der multizellulären Entwicklung (siehe Abbildung 42). Es traten wenige und kleine Fruchtkörper auf. Der gesamte Entwicklungszyklus war im Gegensatz zu AX2 und JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] verlangsamt. Die Deletion beider Zinkfinger-Motive führte zum Verlust der Funktionalität des Proteins. Der Entwicklungsphänotyp konnte nicht geheilt werden (siehe Abbildung 42). Der Austausch von H414 im ersten Zinkfinger-Motiv gegen Leucin führte ebenfalls zur Bildung eines nicht funktionellen Proteins. Transformanten waren nicht fähig zur multizellulären Entwicklung und konnten die Expression von *acaA* und *csaA* nicht induzieren (siehe Abbildungen 42 und 46 A/B). Auch cAMP-Pulse bewirkten keinen Anstieg der Expression beider Gene. Die Funktionalität von TAP-CbfA wurde somit durch den Austausch H414L zerstört.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Mutation und der Deletionen im Bereich der Zinkfinger-Motive von TAP-CbfA auf die Retrotransposition von TRE5-A untersucht. Der Austausch des CbfA-spezifischen Histidins an Position 414 durch Leucin führte zu einem Rückgang der Komplementation der Retrotransposition von TRE5-A auf ca. 20 % im Vergleich zum nicht mutierten TAP-CbfA. Während TAP-CbfA nach Deletion des 2. Zinkfinger-Motivs die Komplementation der Retrotransposition zu ca. 75 % wiederherstellte, bewirkte die Deletion beider Zinkfinger-Motive einen Rückgang der Komplementation auf ca. 10 %, jeweils bezogen auf nicht mutiertes TAP-CbfA (siehe Abbildung 57).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der N-terminale Teil von CbfA für die Integration des Retrotransposons TRE5-A benötigt wird. Zinkfinger können neben einer DNA-Bindung [MILLER *et al.* 1985] auch die Bindung an RNA vermitteln [BROWN 2005; HALL 2005]. Theoretisch wäre eine Bindung der Zinkfinger an die mRNA von TRE5-A denkbar. Alle bisher vorliegenden Daten sagen voraus, dass es sich bei TRE5-A um ein typisches Non-LTR-Retrotransposon handelt, das mittels TPRT-Mechanismus integriert. Dabei entstehen keine freien RNA-Intermediate. Wahrscheinlich ist die TRE5-A-RNA durch ORF1-Proteine dekoriert und daher nicht frei zugänglich [HENTSCHEL *et al.* 2001; WINCKLER, nicht publizierte Ergebnisse]. Zudem bewirkte die Punktmutation H414L nicht nur einen Ausfall der Komplementation der TRE5-A-Retrotransposition, sondern hatte ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Komplementation weiterer Phänotypen. Somit ist eine direkte Interaktion der Zinkfinger von CbfA mit der TRE5-A-RNA unwahrscheinlich.

Da die Deletion des zweiten Zinkfinger-Motivs nur eine geringfügige Einschränkung der Funktionalität von TAP-CbfA bewirkte, die Deletion beider Zinkfinger-Motive jedoch zu einem nicht funktionellen Protein führte, scheint der erste Zinkfinger für die Funktion von CbfA essentiell zu sein. Dem Histidin an Position 414 kommt dabei vermutlich eine wichtige, bislang noch unbekannte Funktion, zu. Es ist nur in CbfA konserviert, nicht jedoch in CbfB und CbfA-ähnlichen Proteinen anderer Organismen [SCHMITH & WINCKLER, unveröffentlichte Daten]. Evolutionäre Betrachtungen lassen vermuten, dass sich CbfA möglicherweise durch Genduplikation aus einem CbfB-ähnlichen Vorläufer entwickelt hat. Es gewann das Histidin an Position 414 hinzu und könnte damit CbfA-spezifische Funktionen erworben haben. CbfA und CbfB haben vermutlich unterschiedliche genregulatorische Funktionen, da die CbfA-Mutante einen distinkten Phänotyp besitzt.

Prinzipiell könnte der Austausch des Histidins zur Destabilisierung oder einer Beeinträchtigung der Konformation von TAP-CbfA geführt haben. Die Lokalisation des Proteins im Zellkern konnte jedoch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 41). Proteine mit falscher Faltung hingegen unterliegen einem Abbau. Deshalb ist davon auszugehen, dass TAP-CbfA/H414L stabil ist.

Die erste bekannte Funktion von Zinkfingern war die Fähigkeit zur Bindung an DNA [MILLER *et al.* 1985]. Die Zinkfinger könnten somit die durch die CTD vermittelte DNA-Bindung von CbfA unterstützen und eine Induktion entwicklungsrelevanter Gene bewirken. Durch diesen Einfluss auf die Transkription könnte CbfA ebenfalls ein Gen, dessen Produkt an der Integration von TRE5-A beteiligt ist, regulieren. Zinkfinger können neben einer DNA-Bindung auch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. Dadurch könnte CbfA Teil eines Transkriptionskomplexes werden [BRAYER & SEGALL 2008]. Zudem wurde beschrieben, dass JmjC-Proteine über ihre Zinkfinger an methylierte Histone binden können und so an Chromatin rekrutiert werden [LI *et al.* 2010; FORTSCHEGGER & SHIEKHATTAR 2010; HORTON *et al.* 2010]. Möglicherweise wird eine Chromatin-Bindung von CbfA durch H414 bewirkt. Die JmjC-Domäne könnte eine Modifikation des Methylierungsstatus der Histone und damit direkt eine Transkriptionsregulation bewirken. Dies ist für JmjC-Domänen anderer Proteine bekannt [u.a. TSUKADA *et al.* 2006; KLOSE *et al.* 2006; CHANG *et al.* 2007; SEWARD *et al.* 2007; LI *et al.* 2010]. Yamane und Mitarbeiter zeigten an menschlichem JHDM2A sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass die Demethylase-Aktivität von der JmjC-Domäne und den Zinkfingern abhängig ist [YAMANE *et al.* 2006]. Ferner wäre auch die Modifikation eines anderen Transkriptionsfaktors denkbar, z. B mittels Sumoylierung, wie in TRONNERSJÖ *et al.* 2007 beschrieben.

### 4.3.4 Auswirkungen von Mutationen des AT-Hakens in CbfA

Abschließend sollen die Ergebnisse aus Untersuchungen zu Mutationen im Bereich des AT-Hakens diskutiert werden. Das Arginin im zentralen $GR_{812}P$-Motiv wurde durch Alanin ersetzt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass der Aminosäure-Austausch R812A *in vitro* zum Ausfall der Bindung von CbfA-CTD an das C-Modul führt [HORN *et al.* 1999]. Zudem bewirkte R812A in $CbfA^{724-998}$ eine etwas geringere Kernlokalisation des Proteins sowie einen Verlust der Genregulation CTD-abhängiger Gene [LUCAS *et al.* 2009].

In Transformanten des Typs JH.D[$ura^+$/TAP-CbfA/R812A] konnte keine Komplementation der multizellulären Entwicklung erreicht werden (siehe Abbildung 44). Nach einer regulären Aggregation verblieben die Zellen im *Tipped-Mound*-Stadium. TAP-CbfA/R812A konnte im Zellkern nachgewiesen werden (siehe Abbildung 43). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die mangelnde Komplementation des Entwicklungsphänotyps nicht die Folge einer zu geringen Kernlokalisierung des mutierten Proteins ist.

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp ist eine schlechtere Bindung des mutierten Proteins an die DNA, da durch den Austausch des Asparagins an Position 812 nachweislich der AT-Haken und damit die DNA-Bindung zerstört wird [HORN *et al.* 1999; LUCAS 2009]. Da sich JH.D[$ura^-$] nicht entwickelt, JH.D[$ura^+$/TAP-CbfA] jedoch eine multizelluläre Entwicklung zeigt, wäre allerdings zu erwarten gewesen, dass sich nach der Zerstörung der CbfA-Funktion ein Phänotyp wie in JH.D[$ura^-$] ergibt. Zudem konnte in JH.D[$ura^+$/TAP-CbfA/R812A] im Gegensatz zu JH.D[$ura^-$] eine Aktivierung der Expression von *acaA* und *csaA* beobachtet werden. Diese überstieg die Expression beider Entwicklungsgene in JH.D[$ura^+$/TAP-CbfA] erheblich und war unabhängig von cAMP-Pulsen. Daher stellte sich die Frage, ob der beobachtete Phänotyp eine Folge der Überexpression von *acaA* oder *csaA* sein könnte. Frühere Studien zeigten jedoch nach Überexpression des durch *csaA* kodierten Zell-Zell-Adhäsionsproteins gp80 einen vollständig anderen Phänotyp. Dort waren sehr große *Slugs* und in der Folge sehr große Fruchtkörper aufgrund der erhöhten Zell-Zell-Adhäsion zu beobachten [KAMBOJ *et al.* 1990]. Die Dauer des Entwicklungszyklus war verkürzt. Nullmutanten von gp80 hingegen zeigten eine erhöhte Zell-Substrat-Adhäsion und eine verringerte Zellmotilität [PONTE *et al.* 1998].

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass TAP-CbfA/R812A zwar in der Lage war, an DNA zu binden, z. B. auch über die intakten Zinkfinger-Motive, die Sequenzspezifität dieser Bindung jedoch aufgrund der Zerstörung des AT-Hakens nicht mehr gegeben war. Dieses könnte dazu geführt haben, dass durch TAP-CbfA/R812A nicht die von nativem CbfA bzw. TAP-CbfA regulierten Gene beeinflusst wurden. Möglicherweise kam es durch die mangelnde Sequenzspezifität zur Aktivierung bzw. Reprimierung normalerweise nicht von

CbfA regulierter Gene. Denkbar wäre eine Fehlregulation von Genen, die eine Arretierung der Zellen bewirken. Dieses könnte zu einem Defekt in der multizellulären Entwicklung geführt haben, der nicht wie in JH.D[ura$^-$] durch einen Ausfall der CbfA-Funktion erklärt werden kann.

Im Gegensatz zur eingeschränkten Funktionalität des Proteins bezüglich der multizellulären Entwicklung wurde eine Erhöhung der Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A durch TAP-CbfA/R812A beobachtet (siehe Abbildung 57). Dieses Ergebnis war überraschend, weil die CTD in mehreren unabhängigen Versuchen als ausreichend für die Aufrechterhaltung der Expression von TRE5-A-RNA erkannt wurde (siehe Abbildung 54). Da der AT-Haken eine wichtige Funktion für die Bindung von CbfA an die DNA besitzt [HORN *et al.* 1999], wäre nach Zerstörung des AT-Hakens ein ähnliches Ausmaß der Expression und Retrotransposition von TRE5-A wie im CbfA-Suppressionsstamm JH.D zu erwarten gewesen. Dieser weist eine geringere Transkriptmenge von TRE5-A als der Wildtyp-Stamm AX2 auf sowie eine eingeschränkte Retrotranspositionsfrequenz. Die ektopische Expression von CbfA in JH.D führte zur Erhöhung der Transkriptmenge und Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A. Damit konnte der ursächliche Zusammenhang beider Faktoren belegt werden (siehe Abbildungen 54 und 55). Folglich musste davon ausgegangen werden, dass die Expression von CbfA mit nicht funktionellem AT-Haken die Transkriptmenge von TRE5-A nicht erhöhen kann. Daher war eine Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A, die derjenigen in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA] entspricht, nicht zu erwarten. Andererseits zeigten die Experimente zur Komplementation der multizellulären Entwicklung, dass TAP-CbfA/R812A eine Restaktivität aufweist. Es wurde der Einfluss auf die Expression der Entwicklungsgene *acaA* und *csaA*, deren Genprodukte für die Vermittlung der Aggregation wichtig sind, untersucht. Die Aggregation der Einzelzellen funktioniert in JH.D[ura$^+$/TAP-CbfA/R812A] regulär. Das heißt, der Defekt tritt nach diesem Stadium auf und ist möglicherweise unabhängig von der *acaA*- und *csaA*-Expression. In Kombination mit einer eventuellen Überexpression könnte die Restaktivität von TAP-CbfA/R812A ausreichen, um die Expression und folglich die Retrotranspositionsaktivität von TRE5-A wiederherzustellen.

Zusammenfassend kann Folgendes gesagt werden: Die Funktionalität von CbfA bezüglich der Expression von TRE5-A beruht auf dessen CTD. Die Regulation der Retrotransposition von TRE5-A ist jedoch von der JmjC-Domäne und den Zinkfingern abhängig. Vermutlich agieren beide gemeinsam als Chromatin-Remodeler, zum Beispiel durch Histon-Demethylierung. Auf die Funktionalität von CbfA in der Vermittlung der multizellulären Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* hingegen haben der erste Zinkfinger und der AT-Haken im Bereich der CTD den größten Einfluss. Die katalytische Aktivität der JmjC-Domäne scheint hierfür entbehrlich zu sein.

## 4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit über die Funktion des Transkriptionsfaktors CbfA in *Dictyostelium discoideum* untersucht zum einen seine Bedeutung für die multizelluläre Entwicklung. Der Entwicklungsphänotyp des CbfA-Suppressionsstammes JH.D[ura$^-$] konnte mit ektopischem CbfA, fusioniert mit einem TAP-Tag, revertiert werden. Mutationen in funktionellen Proteindomänen gaben Aufschluss über die Essentialität bestimmter Aminosäuren in CbfA.

An dieser Stelle wäre die Untersuchung weiterer Mutationen sinnvoll. Denkbar wäre ein Austausch des Cysteins an Position 384 im Bereich des ersten Zinkfinger-Motivs. Dieses ist in CbfA konserviert, nicht jedoch in CbfB und CbfA-ähnlichen Proteinen anderer Organismen. Im Bereich des AT-Hakens befinden sich mehrere Lysine. Deren Anteil an der Funktion von CbfA könnte durch Mutation ebenfalls ermittelt werden, zumal frühere Untersuchungen der C-terminalen Domäne auf eine Bedeutung bestimmter Lysine im Rahmen der CbfA-vermittelten Genregulation hinwiesen.

Zentraler Bestandteil der weiteren Forschung sollte jedoch die Untersuchung der JmjC-Funktion sein. Hier wäre eine komplette Deletion der JmjC-Domäne zu erwägen, um die Auswirkungen auf die multizelluläre Entwicklung zu beobachten. Zudem sind Untersuchungen zur vermuteten Histon-Demethylase-Aktivität von CbfA empfehlenswert. Da es sich bei CbfA um einen Transkriptionsfaktor handelt, wäre die Durchführung von Chromatin-Immunopräzipitationen zur Identifizierung weiterer direkt von CbfA regulierter Gene sinnvoll. Dies könnte zur Aufklärung der Bindungsspezifität von CbfA beitragen, da das Protein in der Lage ist, homopolymere Thymidin-Abschnitte im sehr AT-reichen Genom von *Dictyostelium discoideum* spezifisch zu erkennen.

Zum anderen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Funktion von CbfA im Prozess der Transkription und Retrotransposition des Retrotransposons TRE5-A. Es konnte erstmalig belegt werden, dass CbfA als Wirtsfaktor die Retrotransposition beeinflusst. Trotzdem bleiben einige Fragenstellungen unbeantwortet, die in weiteren Arbeiten untersucht werden könnten: Wie ist die JmjC-Domäne in die Mobilisierung bzw. die Integration von TRE5-A involviert? Wie ist der Unterschied der CbfA-Funktion bezüglich multizellulärer Entwicklung und Retrotransposition von TRE5-A zu erklären? Warum bewirkt die Zerstörung des katalytischen Zentrums der JmjC-Domäne keinen Ausfall der Entwicklung, führt jedoch zu einer stark eingeschränkten Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A?

Des Weiteren deutet sich eine Beeinflussung der Transkriptmenge von TRE5-A durch CbfA-abhängige Regulation eines Faktors des posttranskriptionellen Gen-*Silencings* an. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten PTGS-assoziierten Gene zeigten keine differentielle

Expression in Abhängigkeit von CbfA. Es wurden jedoch in neueren RNA-Sequenzierungs-Experimenten zwei Argonaut-Gene als potentiell CbfA-reguliert identifiziert [WINCKLER, persönliche Mitteilung]. Argonaut-Proteine sind als Bestandteile des RISC-Komplexes an der siRNA-abhängigen Degradation von RNA beteiligt. Sie agieren unterhalb der Rrps. Untersuchungen des Einflusses von CbfA auf die Expression dieser Argonaut-Gene werden zur Zeit durchgeführt und könnten Aufschluss darüber geben, auf welche Weise CbfA in den PTGS-Prozess eingreift.

# 5 Zusammenfassung

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte C-Modul-bindende Faktor A (CbfA) konnte aufgrund seiner Interaktion mit dem C-Modul des Retrotransposons TRE5-A identifiziert werden. Frühere Arbeiten zeigten, dass CbfA ein wichtiger Faktor für die multizelluläre Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* ist und als Transkriptionsfaktor die Expression mehrerer hundert Gene beeinflusst.

Die ektopische Expression von Gesamt-CbfA unter Kontrolle des starken Aktin-15-Promotors bewirkte in der CbfA-Mutante JH.D eine Heilung des Entwicklungsphänotyps. Es war jedoch keine Unterscheidung zwischen rekombinantem und endogenem Protein möglich, das durch Rekombination zwischen originalen und Vektor-kodierten Allelen entstanden sein könnte. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Komplementationen mit einem CbfA-Fusionsprotein durchgeführt. Dieses Vorgehen führte zur Expression eines größeren Proteins (TAP-CbfA), das mittels *Western Blot* eindeutig von endogenem CbfA zu unterscheiden war. Um der physiologischen Expression von CbfA möglichst nahe zu kommen, wurde *cbfA* unter die Kontrolle des eigenen Promotors und Terminators gestellt. Die Expression von TAP-CbfA in einer *High-Copy*-Situation führte zur Komplementation der CbfA-abhängigen Genexpression, die multizelluläre Entwicklung konnte jedoch nicht vollständig wiederhergestellt werden. Die Expression von TAP-CbfA in einer *Low-Copy*-Situation bewirkte allerdings dennoch eine Heilung des Phänotyps, weshalb dieses System genutzt werden konnte, um durch Expression mutierter CbfA-Proteine Hinweise auf die Funktionen einzelner CbfA-Domänen zu gewinnen.

Um den Einfluss verschiedener Proteindomänen von CbfA auf die multizelluläre Entwicklung zu untersuchen, wurden Mutationen im Bereich der JmjC-Domäne, der Zinkfinger und des AT-Hakens eingeführt. Es zeigte sich, dass die katalytische Aktivität der JmjC-Domäne nicht essentiell für die Vermittlung der multizellulären Entwicklung durch CbfA war. Der Austausch eines in CbfA konservierten Histidins durch Alanin im ersten Zinkfinger-Motiv oder die Deletion beider Zinkfinger bewirkten jedoch einen Funktionsverlust des CbfA-Proteins. Die Komplementation des CbfA-Suppressionsstammes mit CbfA, das Mutationen im Bereich des AT-Hakens aufwies, führte zur Wiederherstellung der Aggregation. Es kam jedoch zum vorzeitigen Abbruch der multizellulären Entwicklung.

Im Stamm JH.D wurde in früheren Arbeiten eine geringes Level an TRE5-A-RNA beobachtet, das durch ektopische Expression von vollständigem CbfA ($CbfA^{2-998}$) oder dessen Carboxy-terminaler Domäne ($CbfA^{724-998}$, CTD) angehoben werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass CbfA nicht nur die Expression, sondern auch die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A *in vivo* erhöht. Somit wurde CbfA als

Wirtsfaktor für die Amplifikation von TRE5-A Retrotransposons in *D. discoideum* etabliert. Es wurde festgestellt, dass die CTD zwar zur Vermittlung der Expression von TRE5-A ausreichte, jedoch nicht dessen Retrotranspositionsfrequenz steigern konnte. Daraus kann auf eine wichtige Funktion des N-Terminus von CbfA für die Retrotransposition, vermutlich für die Integration, von TRE5-A geschlossen werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss von CbfA-Mutanten auf die Mobilisierung von TRE5-A bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten die Bedeutung des N-Terminus von CbfA für die Retrotransposition von TRE5-A. Die katalytische Funktion der JmjC-Domäne und die Zinkfinger-Motive erwiesen sich als essentiell für die CbfA-abhängige Mobilisierung von TRE5-A. Die JmjC-Domäne weist vermutlich eine Histon-Demethylase-Aktivität auf und agiert möglicherweise gemeinsam mit dem ersten Zinkfinger, der die Bindung von CbfA an methylierte Histone vermitteln könnte, um die Retrotransposition von TRE5-A zu ermöglichen.

CbfA bindet an das C-Modul, das als Promotor für die Synthese der Minus-Strang-RNA von TRE5-A fungiert. In früheren Arbeiten konnte jedoch keine Bindung von CbfA an das A-Modul nachgewiesen werden, das als Promotor der Plus-Strang-RNA-Synthese dient. Trotzdem wurden sowohl die Expression der Minus-Strang-RNA als auch der Plus-Strang-RNA von TRE5-A durch CbfA bzw. dessen CTD gleichzeitig beeinflusst. Daher stellte sich die Frage, ob Mechanismen des posttranskriptionellen Gen-*Silencings* (PTGS) in diesen Prozess eingreifen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von sieben PTGS-assoziierten Genen im Wildtyp-Stamm AX2 im Vergleich zu JH.D mittels qRT-PCR bestimmt. Es konnte keine differentielle Expression dieser Gene in Abhängigkeit von CbfA festgestellt werden, was jedoch nicht ausschließt, dass in dieser Arbeit nicht untersuchte PTGS-Gene an der CbfA-abhängigen Regulation von TRE5-A beteiligt sind.

# 6 Summary

The *Dictyostelium discoideum* C-module-binding factor A (CbfA) was discovered through its binding to the C-module of the retrotransposon TRE5-A. Previous studies showed that CbfA is an important factor for the multicellular development of *Dictyostelium discoideum.* It acts as a transcription regulator, that influences the expression of several hundred genes.

Ectopic expression of full length CbfA under control of the strong actin15 promoter cured the developmental phenotype in the CbfA-depleted mutant JH.D, but it was not possible to discriminate between recombinant and endogenous protein that might have formed by recombination between the original and vector-encoded *cbfA* alleles. Therefore, in this work, complementation studies were conducted using TAP-tagged CbfA fusion proteins. The specific detection of TAP-CbfA by western blotting ensured the expression of plasmid-borne CbfA that could eventually be altered by mutation. To achieve nearly physiological expression of CbfA, the *cbfA* gene was controlled by its own promoter and terminator sequences. The expression of TAP-CbfA in a high-copy situation resulted in the rescue of CbfA-dependent gene expression, but the multicellular development could not be fully restored. In contrast, the expression of TAP-CbfA in a low-copy situation reverted both the aberrant CbfA-dependent gene expression and the developmental phenotype. Thus, this system was suitable to analyse the function of single CbfA-domains by expressing mutated CbfA proteins.

To examine the functions of different protein domains of CbfA in the regulation of multicellular development, mutations were introduced into the JmjC-domain, the zinc-finger-motifs and the AT-hook. Surprisingly, an inactivation of the catalytic centre of the JmjC-domain had no effect on CbfA function. In contrast, conversion of a conserved histidine into alanine in the first zinc-finger-motif, or the deletion of both zinc-fingers caused a loss of CbfA function. Expression of CbfA with mutations concerning the AT-hook restored aggregation, but development was arrested in the tipped mound stage.

In the CbfA-depleted strain JH.D a drastically reduced expression of TRE5-A was observed, which could be restored by ectopic expression of full length CbfA$^{2\text{-}998}$ (CbfA) or its carboxy-terminal domain (CbfA$^{724\text{-}998}$, CbfA-CTD). In this work it could be shown for the first time that not only the expression but also the retrotransposition frequency of TRE5-A is positively affected by CbfA *in vivo*. Thus, this study established CbfA as host factor for the amplification of TRE5-A retrotransposons in *D. discoideum* cells. It was discovered that although the CbfA-CTD was sufficient to mediate the expression of TRE5-A it was not able to increase the retrotransposition frequency, suggesting that the amino-terminal part of CbfA is essential for the retrotransposition of TRE5-A.

The impact of CbfA mutants on the retrotransposition activity of TRE5-A was investigated. The results of these experiments confirmed that the amino-terminal part of CbfA is essential for the retrotransposition of TRE5-A. The catalytic function of the JmjC-domain and the zinc-finger-motifs also proved to be required for the CbfA-dependent mobilisation of the retrotransposon TRE5-A. The JmjC-domain presumably posesses histone demethylase activity that could act together with the first zinc-finger, which could mediate the binding of CbfA to methylated histones, to facilitate TRE5-A retrotransposition.

CbfA binds to the C-module, which acts as promoter for the synthesis of minus-strand-RNA of TRE5-A. Previous experiments did not reveal binding of CbfA to the A-module that serves as the promoter for plus-strand-RNA synthesis. Nevertheless, the expression of both minus-strand-RNA and plus-strand-RNA of TRE5-A was influenced by CbfA and its CTD simultaneously. This raised the question if posttranscriptional gene silencing (PTGS) might be involved in this process. In this work the expression of seven presumably PTGS-associated genes was measured in wild-type *D. discoideum* cells compared to the CbfA mutant JH.D by means of quantitative RT-PCR. None of the tested genes was expressed in a CbfA-dependent manner, which does at the present state of the work not necessarily rule out the possibility that TRE5-A expression is regulated by PTGS in a CbfA-dependent manner.

# 7 Literaturverzeichnis

**Aasland R., Gibson T.J., Stewart A.F.** (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **20:**56-59.

**Agger K., Christensen J., Cloos P.A.C., Helin K.** (2008) The emerging functions of histone demethylases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18:**159-168.

**Alvarez-Curto E., Rozen D.E., Ritchie A.V., Fouquet C., Baldauf S.L., Schaap P.** (2005) Evolutionary origin of cAMP-based chemoattraction in the social amoebae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102(18):**6385-6390.

**Anjard C., Loomis W.F.** (2005) Peptide signaling during terminal differentiation in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102(21):**7607-7611.

**Aravin A., Tuschl T.** (2005) Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett.* **579:**5830-5840.

**Aravind L., Landsman D.** (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **26(19):**4413-4421.

**Ashworth J.M., Watts D.J.** (1970) Metabolism of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. *Biochem. J.* **119(2):**175-182.

**Attwood J.T., Yung R.L., Richardson B.C.** (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* **59:**241-257.

**Aubry L., Firtel R.** (1999) Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15:**469-517.

**Balciunas D., Ronne H.** (2000) Evidence of domain swapping within the *jumonji* family of transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **25:**274-276.

**Baldauf S.L., Doolittle W.F.** (1997) Origin and evolution of the slime molds (*Mycetazoa*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94:**12007-12012.

**Baldauf S.L., Roger A.J., Wenk-Siefert I., Doolittle W.F.** (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290:**972-77.

**Beck P.** (2002) Etablierung eines *in vivo* Testsystems zur Untersuchung der Mobilität tRNA-Gen gerichteter Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum. Dissertationsschrift.*

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

**Berks M., Kay R.R.** (1990) Combinatorial control of cell differentiation by cAMP and DIF-1 during development of *Dictyostelium discoideum*. *Development* **110:**977-984.

**Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409:**363-366.

**Bienz M.** (2006) The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.* **31(1):**35-40.

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

**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:**254-263.

**Bonner J.T.** (1947) Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.* **106(1):**1-26.

**Bonner J.T.** (1952) The pattern of differentiation in amoeboid slime molds. *Am. Nat*. **86(827):**79-89.

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

**Brazill D.T., Gundersen R., Gomer R.H.** (1997) A cell-density factor regulates the lifetime of a chemoattractant-induced Gα-GTP conformation. *FEBS Lett.* **404:**100-104.

**Brazill D.T., Lindsey D.F., Bishop J.D., Gomer R.H.** (1998) Cell density sensing mediated by a G protein-coupled receptor activating phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **273(14):**8161-8168.

**Brefeld O.** (1869) *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt* **7:**85-107.

**Brefeld O.** (1884) *Polysphondylium violaceum* und *Dictyostelium mucoroides* nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze. *Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie* **6:**1-34.

**Brown R.S.** (2005) Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15:**94-98.

**Capello J., Cohen S.M., Lodish H.F.** (1984) *Dictyostelium* transposable element DIRS-1 preferentially inserts into DIRS-1 sequences. *Mol. Cell. Biol.* **4(10):**2207-2213.

**Capello 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:**105-115.

**Caterina M.J., Milne J.L.S., 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.

**Ceccarelli A., Mahbubani H., Williams J.G.** (1991) Positively and negatively acting signals regulating stalk cell and anterior-like cell differentiation in *Dictyostelium*. *Cell* **65:**983-989.

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

**Chang B., Chen Y., Zhao Y., Bruick R.K.** (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **318:**444-447.

**Chang Y., Wu J., Tong X.-J., Zhou J.-Q., Ding J.** (2010) Crystal structure of the catalytic core of *Saccharomyces cerevesiae* histone demethylase Rph1: insights into the substrate specificity and catalytic mechanism. *Biochem. J.* **433:**295-302.

**Chen M.Y., Long Y., Devreotes P.N.** (1997) A novel cytosolic regulator, pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* **11:**3218-3231.

**Chen Z., Zang J., Whetstine J., Hong X., Davrazou F., Kutateladze T.G., Simpson M., Mao Q., Pan C.-H., Dai S., Hagman J., Hansen K., Shi Y., Zhang G.** (2006) Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* **125:**691-702.

**Chubb J.R., Bloomfield G., Xu Q., Kaller M., Ivens A., Skelton J., Turner B.M., Nellen W., Shaulsky G., Kay R.R., Bickmore W.A., Singer R.H.** (2006) Developmental timing in *Dictyostelium* is regulated by the Set1 histone methyltransferase. *Dev. Biol.* **292:**519-532.

**Chung T.** (2007) Interaktionsanalysen zur spezifischen Integration des Retrotransposons TRE5-A.1 in *Dictyostelium discoideum. Dissertationsschrift.*

**Chung T., Siol O., Dingermann T., Winckler T.** (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.

**Clarke M., Kaymann S.C., Riley K.** (1987) Density-dependent induction of discoidin-I synthesis in exponentially growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* **34:**79-87.

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

**Clow P.A., Chen T.L.L., Chisholm R.L., McNally J.G.** (2000) Three-dimensional *in vivo* analysis of *Dictyostelium* mounds reveals directional sorting of prestalk cells and defines a role for the myosin II regulatory light chain in prestalk cell sorting and tip protrusion. *Development* **127:**2715-2728.

**Cotter D.A., Sands T.W., Virdy K.J., North M.J., Klein G., Satre M.** (1992). Patterning of development in *Dictyostelium discoideum* - factors regulating growth, differentiation, spore dormancy, and germination. *Biochem. Cell Biol.* **70:**892-919.

**Cox E.C., Vocke C.D., Walter S., Gregg K.Y., Bain E.S.** (1990) Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87:**8247-8251.

**Craig N.L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A.M.** (2002) Mobile DNA II. *ASM Press, Washington DC*.

**Curcio M.J., Morse R.H.** (1996) Tying together integration and chromatin. *Trends Genet.* **12(11):**436-438.

**de Gunzburg J., Veron M.** (1982) A cAMP-dependent protein kinase is present in differentiating *Dictyostelium discoideum* cells. *EMBO J.* **1(9):**1063-1068.

**de Gunzburg J., Part D., Guiso N., Veron M.** (1984) An unusual adenosine 3´/5´-phosphate dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry* **23:**3805-3812.

**Deininger P.L., Moran J.V., Batzer M.A., Kazazian H.H.jr** (2003) Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13:**651-658.

**Devreotes P. N.** (1994) G-protein-linked signaling pathways control the developmental program of *Dictyostelium*. *Neuron* **12:**235-241.

**Dingermann T., Reindl N., Brechner T., Werner H., Nerke K.** (1990) Nonsense suppression in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* **11:**410-417.

**Dingermann T., Werner H., Schutz A., Zündorf I., Nerke K., Knecht D., Marschalek R.** (1992) Establishment of a system for conditional gene expression using an inducible tRNA suppressor gene. *Mol. Cell. Biol.* **12(9):**4038-4045.

**Dölz H.** (2010) Funktion von CbfA in der epigenetischen Kontrolle des TRE5-A-Retrotransposons aus *Dictyostelium discoideum*. *Dissertationsschrift*.

**Dunwell J.M., Khuri S., Gane P.J.** (2000) Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(1):**153-179.

**Durston A.J.** (1974) Pacemaker activity during aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **37:**225-235.

**Dutnall R.N.** (2003) Cracking the histone code: one, two, three methyls, you're out! *Mol. Cell* **12:**3-4.

**Dynes J.L., Clark A.M., Shaulsky G., Kuspa A., Loomis W.F., Firtel R.A.** (1994) LagC is required for cell-cell interactions that are essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* **8:**948-958.

**Early A.E., Gaskell M.J., Traynor D., Williams, J.G.** (1993) Two distinct populations of prestalk cells within the tip of the migratory *Dictyostelium* slug with differing fates at culmination. *Development* **118:**353-362.

**Eichinger L., Pachebat J.A., Glöckner G., Rajandream M.A., Sucgang R., Berriman M., Song J., Olsen R., Szafranski K., Xu Q., Tunggal B., Kummerfeld S., Madera M., Konfortov B.A., Rivero F., Bankier A.T., Lehmann R., Hamlin N., Davies R., Gaudet P., Fey P., Pilcher K., Chen G., Saunders D., Sodergren E., Davis P., Kerhornou A., Nie X., Hall N., Anjard C., Hemphill L., Bason N., Farbrother P., Desany B., Just E., Morio T., Rost R., Churcher C., Cooper J., Haydock S., van Driessche N., Cronin A., Goodhead I., Muzny D., Mourier T., Pain A., Lu M., Harper D., Lindsay R., Hauser H., James K., Quiles M., Madan Babu M., Saito T., Buchrieser C., Wardroper A., Felder M., Thangavelu M., Johnson D., Knights A., Loulseged H., Mungall K., Oliver K., Price C., Quail M.A., Urushihara H., Hernandez J., Rabbinowitsch E., Steffen D., Sanders M., Ma J., Kohara Y., Sharp S., Simmonds M., Spiegler S., Tivey A., Sugano S., White B., Walker D., Woodward J., Winckler T., Tanaka Y., Shaulsky G., Schleicher M., Weinstock G., Rosenthal A., Cox E.C., Chisholm R.L., Gibbs R., Loomis W.F., Platzer M., Kay R.R., Williams J., Dear P.H., Noegel A.A., Barrell B., Kuspa A.** (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435(7038):**43-57.

**Eichler E.E., Sankoff D.** (2003) Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* **301:**793-797.

**Eickbush T.H., Furano A.V.** (2002) Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. *Curr. Op. Genet. Dev.* **12:**669-674.

**Elkins J.M., Hewitson K.S., McNeill L.A., Seibel J.F., Schlemminger I., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Schofield C.J.** (2003) Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1$\alpha$. *J. Biol. Chem.* **278(3):**1802-1806.

**Escalante R., Vicente J.J.** (2000) *Dictyostelium discoideum*: a model system for differentiation and patterning. *Int. J. Dev. Biol.* **44(8):**819-835.

**Faix J., Gerisch G., Noegel A.** (1992) Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promotor impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.* **102:**203-214.

**Faure M., Franke J., Hall A.L., Podgorski G.J., Kessin R.H.** (1990) The cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum* contains 3 promotors specific for growth, aggregation and late development. *Mol. Cell. Biol.* **10(5):**1921-1930.

**Feng Q., Moran J.V., Kazazian H.H. Jr., Boeke J.D.** (1996) Human L1 Retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* **87:**905-916.

**Fey P., Cox E.C.** (1997) Gene trapping with GFP: the isolation of developmental mutants in the slime mold *Polysphondylium*. *Curr. Biol.* **7:**909-912.

**Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391:**806-811.

**Firtel R.A.** (1991) Signal transduction pathways controlling multicellular development in *Dictyostelium*. *Trends Genet.* **7(11/12):**381-388.

**Firtel R.A.** (1995) Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes Dev*. **9:**1427-1444.

**Firtel R.A., Chapman A.L.** (1990) A role for cAMP-dependent protein kinase-A in early *Dictyostelium* development. *Genes Dev.* **4:**18-28.

**Fortschegger K., Shiekhattar R.** (2010) Plant homeodomain fingers form a helping hand for transcription. *Epigenetics* **6(1):**4-8.

**Fosnaugh K.L., Loomis W.F.** (1989a) Sequence of the *Dictyostelium discoideum* spore coat gene SP96. *Nucleic Acids Res.* **17(22):**9489-9490.

**Fosnaugh K.L., Loomis W.F.** (1989b) Spore coat genes SP60 and SP70 of *Dictyostelium discoideum*. *Moll. Cell. Biol.* **9(11):**5215-5218.

**Fosnaugh K.L., Loomis W.F.** (1991) Coordinate regulation of the spore coat genes in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* **12:**123-132.

**Franke J., Kessin R.H.** (1981) The cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein of *Dictyostelium discoideum* - purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **256(14):**7628-7637.

**Franke J., Faure J., Hall A.L., Podorski G.J., Kessin R.H.** (1991) Cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum* and its glycoprotein inhibitor - structure and expression of their genes. *Dev. Genet.* **12:**104-112.

**Frankel S., Condeelis J., Leinwand L.** (1990) Expression of Actin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265(29):**17980-17987.

**Freeze H., Loomis W.** (1977a) The isolation and characterization of a component of the surface sheath of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **252(3):**820-824.

**Freeze H., Loomis W.** (1977b) The role of the fibrillar component of the surface sheath in the morphogenesis of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **56:**184-194.

**Friedman M.J., Shah A.G., Fang Z.H., Ward E.G., Warren S.T., Li S., Li X.J.** (2007) Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* **10(12):**1519-1528.

**Gane P.J., Dunwell J.M., Warwicker J.** (1998) Modeling based on the structure of vicilins predicts a histidine cluster in the active site of oxalate oxidase. *J. Mol. Evol*. **46:**488-493.

**Gaskell M.J., Jermyn K.A., Watts D.J., Treffry T., Williams J.G.** (1992). Immunolocalization and separation of multiple prestalk cell types in *Dictyostelium*. *Differentiation* **51:**171-176.

**Geier A., Horn J., Dingermann T., Winckler T.** (1996) Nuclear protein factor binds specifically to the 3´-regulatory module of the long-interspersed-nuclear-element-like *Dictyostelium* repetitive element. *Eur. J. Biochem.* **241:**70-76.

**Gerisch G.** (1961) Zellfunktionen und Zellfunktionswechsel in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* V Stadienspezifische Zellkontaktbildung und ihre quantitative Erfassung. *Exp. Cell Res.* **25:**535-554.

**Glöckner G., Szafranski K., Winckler T., Dingermann T., Quail M.A., Cox E., Eichinger L., Noegel A.A., Rosenthal A.** (2001) The complex repeats of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Res.* **11(4):**585-594.

**Glöckner G., Eichinger L., Szafranski K., Pachebat J.A., Bankier A.T., Dear P.H., Lehmann R., Baumgart C., Parra G., Abril J.F., Guigo R., Kumpf K., Tunggal B., Cox E., Quail M.A., Platzer M., Rosenthal A., Noegel A.A.** (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **418:**79-85.

**Goll M.G., Bestor T.H.** (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74:**481-514.

**Hall T. M.** (2005) Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15:**367-373.

**Hamilton A. J., Baulcombe D. C.** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286:**950-952.

**Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J.** (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404:**293-296.

**Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R., Hannon G.J.** (2001) Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293:**1146-1150.

**Harrison B.R., Yazgan O., Krebs J.E.** (2009) Life without RNAi: noncoding RNAs and their functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Cell Biol.* **87:**767-779.

**Hartig J.V., Esslinger S., Böttcher R., Saito K., Förstemann K.** (2009) Endo-siRNAs depend on a new isoform of *loquacious* and target artificially introduced, high-copy sequences. *EMBO J.* **28(19):**2932-2944.

**Hentschel U., Zündorf I., Dingermann T., Winckler T.** (2001) On the problem of establishing the subcellular localization of *Dictyostelium* retrotransposon TRE5-A proteins by biochemical analysis of nuclear extracts. *Anal. Biochem.* **296:**83-91.

**Hinas A., Johan Reimegard J., Wagner E.G.H., Nellen W., Ambros V.R., Söderbom F.** (2007) The small RNA repertoire of *Dictyostelium discoideum* and its regulation by components of the RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.* **35(20):**6714-6726.

**Hjorth A.L., Khanna, N.C., Firtel R. A.** (1989). A *trans-acting* factor required for cAMP-induced gene expression in *Dictyostelium* is regulated developmentally and induced by cAMP. *Genes Dev.* **3:**747-759.

**Hjorth A.L., Pears C., Williams J.G., Firtel R.A.** (1990) A developmentally regulated *trans*-acting factor recognizes dissimilar G/C-rich elements controlling a class of cAMP-inducible *Dictyostelium* genes. *Genes Dev.* **4:**419-432.

**Honda S., Lewis Z.A., Huarte M., Cho L.Y., David L.L., Shi Y., Selker E.U.** (2010) The DMM complex prevents spreading of DNA methylation from transposons to nearby genes in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **24:**443-454.

**Horn J.** (1999) Isolierung und Charakterisierung des Gens für ein DNA-bindendes Protein aus *Dictyostelium discoideum*. *Dissertationsschrift*.

**Horn J., Dietz-Schmidt A., Zündorf I., Garin J., Dingermann T., Winckler T.** (1999) A *Dictyostelium* protein binds to distinct oligo(dA)-oligo(dT) DNA sequences in the C-module of the retrotransposable element DRE. *Eur. J. Biochem.* **265:**441-448.

**Horton J.R., Upadhyay A.K., Hashimoto H., Zhang X., Cheng X.** (2010) Structural basis for human PHF2 jumonji domain interaction with metal ions. *J. Mol. Biol.* (in press) DOI 10.1016/j.jmb.2010.12.013

**Houseley J., Tollervey D.** (2008) The nuclear RNA surveillance machinery: The link between ncRNAs and genome structure in budding yeast? *Biochim. Biophys. Acta* **1779:**239-246.

**Huisinga K.L., Brower-Toland B., Elgin S.C.R.** (2006) The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* **115:**110-122.

**Huth J.R., Bewley C.A., Nissen M.S., Evans J.N., Reeves R., Gronenborn A.M., Clore G.M.** (1997) The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat. Struct. Biol.* **4(8):**657-665.

**Ichiyanagi K., Nakajima R., Kajikawa M., Okada N.** (2007) Novel retrotransposon analysis reveals multiple mobility pathways dictated by hosts. *Genome Res.* **17:**33-41.

**Iranfar N, Fuller D, Loomis W** (2006): Transcriptional regulation of post-aggregation genes in *Dictyostelium* by a feed-forward loop involving GBF and lagC. *Dev. Biol.* **290:**460-469.

**Jaenisch R., Bird A.** (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33:**245-254.

**Jain R, Yuen I.S., Taphouse C.R., Gomer R.H.** (1992) A density-sensing factor controls development in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* **6:**390-400.

**Jenuwein T., Allis C.D.** (2001) Translating the histone code. *Science* **293:**1074-1080.

**Jeong J.H., Song H.R., Ko J.H., Jeong Y.M., Kwon Y.E., Seol J.H., Amasino R.M., Noh B., Noh Y.S.** (2009) Repression of *FLOWERING LOCUS T* chromatin by functionally redundant histone H3 lysine 4 demethylases in Arabidopsis. *PLoS One* **4(11):**e8033. Epub 2009 Nov 25.

**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., Traynor D., Williams J.** (1996). The initiation of basal disc formation in *Dictyostelium discoideum* is an early event in culmination. *Development* **122:**753-760.

**Johnson K.R., Lehn D.A., Elton T.S., Barr P.J., Reeves R.** (1988) Complete murine cDNA sequence, genome structure, and tissue expression of the high-mobility group protein HMG-I(Y). *J. Biol. Chem.* **263(34):**18338-18342.

**Johnson R.L., Gunderson R., Hereld D., Pitt G.S., Tugendreich S., Saxe C.L., Kimmel A.R., Devreotes P.N.** (1992) G-protein linked signaling pathways mediate development in *Dictyostelium*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **57:**169-176.

**Kaller M., Nellen W., Chubb J.R.** (2006) Epigenetics in *Dictyostelium*. In: *Dictyostelium discoideum*. *Methods in Molecular Biology*. Editors: Eichinger L. and Rivera F. *Humana Press*. **346:**491-494.

**Kalpaxis D., Zündorf I., Werner H., Reindl N., Boy-Marcotte E., Jacquet M., Dingermann T.** (1991) Positive selection for *Dictyostelium discoideum* mutants lacking UMP synthase activity based on resistance to 5-fluoroorotic acid. *Mol. Gen. Genet.* **225:**492-500.

**Kamboj R.K., Lam T.Y., Siu C.H.** (1990) Regulation of slug size by the cell adhesion molecule gp80 in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Regul.* **1:**715-729.

**Katoh M., Curk T., Xu Q., Zupan B., Kuspa A., Shaulsky G.** (2006) Developmentally regulated DNA methylation in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell* **5(1):**18-25.

**Kazazian H.H.jr, Goodier J.L.** (2002) LINE Drive: retrotransposition and genome instability. *Cell* **110:**277-280.

**Kessin R.H.** (2000) Evolutionary biology – cooperation can be dangerous. *Nature* **408:**917-919.

**Kessin R.H.** (2001) *Dictyostelium*: Evolution, Cell Biology and the Development of Multicellularity. Cambridge: *Cambridge Univ. Press*.

**Ketting R. F., Haverkamp T. H. A., van Luenen H. G. A. M., Plasterk R. H. A.** (1999) *mut-7* of *C. elegans,* required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome helicase and RnaseD. *Cell* **99:**133-141.

**Kim J.M., Vanguri S., Boeke J.D., Gabriel A., Voytas D.F.** (1998) Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.* **8:**464-478.

**Kimmel A.R., Firtel R.A.** (1991) cAMP signal transduction pathways regulating development of *Dictyostelium discoideum*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1:**383-390.

**Kirchner J., Connolly C.M., Sandmeyer S.B.** (1995) Requirement of RNA polymerase III transcription factors for *in vitro* position-specific integration of a retrovirus like element. *Science* **267:**1488-1491.

**Klose R.J., Kallin E.M., Zhang Y.** (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **7(9):**715-27.

**Knecht D.A., Fuller D.L., Loomis W.F.** (1987) Surface glycoprotein, gp24, involved in early adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **121:**277-283.

**Kortschak R.D., Tucker P.W., Saint R.** (2000) ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem. Sci.* **25:**294–299.

**Krishna S.S., Majumdar I., Grishin N.V.** (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res.* **31(2):**532-550.

**Kuhlmann M., Borisova B.E., Kaller M., Larsson P., Stach D., Na J., Eichinger L., Lyko F., Ambros V., Söderbom F., Hammann C., Nellen W.** (2005) Silencing of retrotransposons in *Dictyostelium* by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res*. **33(19):**6405-6417.

**Kuhlmann M., Popova B., Nellen W.** (2006) RNA interference and antisense mediated gene silencing in *Dictyostelium*. In: *Dictyostelium discoideum*. *Methods in Molecular Biology*. Editors: Eichinger L., Rivera F. *Humana Press*.

**Kuspa A., Maghakian D., Bergesch P., Loomis W.F.** (1992) Physical mapping of genes to specific chromosomes in *Dictyostelium discoideum. Genomics* **13:**49-61.

**Lachner M., O'Sullivan R.J., Jenuwein T.** (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell. Sci.* **116(11):**2117-2124.

**Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:**680-685.

**Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J. *et al.*** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409:**860-921.

**Leichtling B.H., Majerfeld I.H., Spitz E., Schaller K.L., Woffendin C., Kakinuma S., Rickenberg H.V.** (1984) A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. II. Developmental regulation. *J. Biol. Chem.* **259(1):**662-668.

**Li L., Greer C., Eisenman R.N., Secombe J.** (2010) Essential functions of the histone demethylase Lid. *PloS Genet.* **6(11):**1-11.

**Lilly P.J., Devreotes P.N.** (1994) Identification of CRAC, a cytosolic regulator required for guanine nucleotide stimulation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* **269(19):**14123-14129.

**Loomis W.F.** (1996) Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells. *Microbiol. Rev.* **60(1):**135-150.

**Loomis W.F., Smith D.W.** (1995) Consensus phylogeny of *Dictyostelium*. *Experientia* **51:**1110-1115.

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

**Louis J.M., Saxe C.L., Kimmel A.R.** (1993) Two transmembrane signaling mechanisms control expression of the cAMP receptor gene CAR1 during *Dictyostelium* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90:**5969-5973.

**Lu F., Cui X., Zhang S., Liu C., Cao X.** (2010) JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in Arabidopsis. *Cell Res.* **20:**387-390.

**Lucas J.** (2009) Struktur und Funktion der Carboxy-terminalen Domäne des Transkriptionsfaktors CbfA aus *Dictyostelium discoideum*. *Dissertationsschrift.*

**Lucas J**., **Bilzer A**., **Moll L**., **Zündorf I**., **Dingermann T**., **Eichinger L**., **Siol O**., **Winckler T.** (2009) The carboxy-terminal domain of *Dictyostelium* C-module-binding factor is an independent gene regulatory entity. *PLOS ONE* **4(4):** e5012. Epub 2009 Apr 3.

**Luger K., Rechsteiner T.J., Flaus A.J., Waye M.M.Y., Richmond T.J.** (1997) Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* **272:**301-311.

**Maeda M.** (2004) Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science* **304:**875-878.

**Majerfeld I.H., Leichtling B.H., Meligeni J.A., Spitz E., Rickenberg H.V.** (1984) A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. I. Properties. *J. Biol. Chem.* **259(1):**654-661.

**Malchow D., Nägele B., Schwarz H., Gerisch G.** (1972) Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28(1):**136-142.

**Malik H.S., Burke W.D., Eickbush T.H.** (1999) The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol. Biol. Evol.* **16(6):**793-805.

**Manfioletti G., Giancotti V., Bandiera A., Buratti E., Sautiere P., Cary P., Crane-Robinson C., Coles B., Goodwin G.H.** (1991) cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes. *Nucleic Acids Res.* **19(24):**6793-6797.

**Maniak M., Nellen W.** (1989) pISAR, a tool for cloning genomic sequences adjacent to the site of vector integration. *Nucleic Acids Res.* **17(12):**4894.

**Mann S.K.O., Firtel R.A.** (1991) A developmentally regulated, putative serin/threonin protein kinase is essential for development in *Dictyostelium*. *Mech. Dev.* **35:**89-101.

**Mann S.K.O, Brown J.M., Briscoe C., Parent C., Pitt G., Devreotes P.N., Firtel R.A.** (1997) Role of a cAMP-dependent protein kinase in controlling aggregation and postaggregative development in *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* **183:**208-221.

**Manstein D.J., Schuster H.P., Morandini P., Hunt D.M.** (1995) Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* **162:**129-134.

**Marnef A., Sommerville J., Ladomery M.R.** (2009) RAP55: insights into an evolutionarily conserved protein family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41(5):**977-981.

**Marschalek R., Brechner T., Amon-Böhm E., Dingermann T.** (1989) Transfer RNA genes: landmarks for integration of mobile genetic elements in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **244:**1493-1496.

**Marschalek R., Hofmann J., Schumann G., Gosseringer R., Dingermann T.** (1992a) Structure of DRE, a retrotransposable element which integrates with position specificity upstream of *Dictyostelium discoideum* tRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* **12(1):**229-239.

**Marschalek R., Hofmann J., Schumann G., Dingermann T.** (1992b) Two distinct subforms of the retrotransposable DRE element in NC4 strains of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **20(23):**6247-6252.

**Marschalek R., Hofmann J., Schumann G., Bach M., Dingermann T.** (1993) Different organization of the transfer RNA-gene-associated repetitiv element, DRE, in NC4-derived strains and in other wild-type *Dictyostelium discoideum* strains. *Eur. J. Biochem.* **217:**627-631.

**Martens H., Nellen W.** (2002) Epigenetisches *Genesilencing*: RNA Interferenz und Antisense RNA. *Biospektrum 4/02, 8. Jahrgang*.

**Martens H., Novotny J., Oberstrass J., Steck T.L., Postlethwait P., Nellen W.** (2002) RNAi in *Dictyostelium*: the role of RdRPs and dsRNase. *Mol. Biol. Cell.* **13:**445-453.

**Matthews J.M., Sunde M.** (2002) Zinc fingers - folds for many occasions. *IUBMB Life* **54:**351-355.

**Mayr B., Montminy M.** (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylationdependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2(8):**599-609.

**McClintock B.** (1938) The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behaviour of ring-shaped chromosomes. *Genetics* **23:**315-376.

**McClintock B.** (1948) Mutable loci in maize. *Year B Carnegie Inst Wash* **47:**155-169.

**Meima M.E., Weening K.E., Schaap P.** (2007) Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in *Dictyostelium. Protein Expr. Purif.* **53:**283-288.

**Miller J., McLachlan A.D., Klug, A.** (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4(6):**1609-1614.

**Miller W.J., McDonald J.F., Nouaud D., Anxolabehere D.** (1999) Molecular domestication - more than a sporadic episode in evolution. *Genetica* **107:**197-207.

**Montgomery M.K., Xu S.Q., Fire A.** (1998) RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95:**15502-15507.

**Moran J.V., DeBerardinis R.J., Kazazian H.H.** (1999) Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* **283:**1530-1534.

**Mülhardt C.** (2003) Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. 4. Auflage. Heidelberg: *Spektrum Akademischer Verlag.*

**Nellen W., Firtel R.A.** (1985) High-copy-number transformants and co-transformation in *Dictyostelium*. *Genes* **39:**155-163.

**Nelson H.C.M., Finch J.T., Luisi B.F., Klug A.** (1987) The structure of an oligo(dA) oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature* **330:**221-226.

**Ng H.H., Bird A.** (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9:**158-163.

**Noegel A., Gerisch G., Stadler J., Westphal M.** (1986) Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *EMBO J.* **5(7):**1473-1476.

**Novotny J., Diegel S., Schirmacher H., Möhrle A., Hildebrandt M., Nellen W.** (2001) dsRNAse in *Dictyostelium*. *Meth. Enzymol.* **342:**193-212.

**Olive L.S., Stoianovitch C.** (1975) The Mycetozoans. New York: *Academic Press*.

**Otsuka H., van Haastert P.J.M.** (1998) A novel Myb homolog initiates *Dictyostelium* development by induction of adenylyl cyclase expression. *Genes Dev.* **12:**1738-1748.

**Pang K.M., Lynes M.A., Knecht D.A.** (1999). Variables controlling the expression level of exogenous genes in *Dictyostelium*. *Plasmid* **41:**187-197.

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

**Parikh A., Huang E., Dinh C., Zupan B., Kuspa A., Subramanian D., Shaulsky G.** (2010) New components of the *Dictyostelium* PKA pathway revealed by Bayesian analysis of expression data. *BMC Bioinformatics* **11:**163-172.

**Pears C.J., Mahbubani H.M., Williams J.G.** (1985) Characterization of two highly diverged but developmentally coregulated cysteine proteases in *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **13(24):**8853-8866.

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

**Pitt G.S., Milona N., Borleis J., Lin K.C., Reed R.R., Devreotes P.N.** (1992) Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell* **69(2):**305-315.

**Ponger L., Li W.H.** (2005). Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.* **22(4):**1119-1128.

**Ponte E., Bracco E., Faix J., Bozzaro S.** (1998) Detection of subtle phenotypes: the case of the cell adhesion molecule csA in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95:**9360-9365.

**Popova B., Kuhlmann M., Hinas A., Söderbom F., Nellen W.** (2006) HelF, a putative RNA helicase acts as a nuclear suppressor of RNAi but not antisense mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res*. **34(3):**773-784.

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

**Primpke G., Iassonidou V., Nellen W., Wetterauer B.** (2000) Role of cAMP-dependent protein kinase during growth and early development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **221:**101-111.

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

**Rathi A., Kayman S.C., Clarke M.** (1991) Induction of gene expression in *Dictyostelium* by prestarvation factor, a factor secreted by growing cells. *Dev. Genet.* **12:**82-87.

**Reeves R. (2001)** Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* **277:**63-81.

**Reeves R., Beckerbauer L.** (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1519:**13-29.

**Riggs A.D.** (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* **14:**9-25.

**Riley B.E., Orr H.T.** (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev.* **20:**2183-2192.

**Roisin-Bouffay C., Jang W., Caprette D.R., Gomer R.H.** (2000) A precise group size in *Dictyostelium* is generated by a cell- counting factor modulating cell-cell adhesion. *Mol. Cell* **6:**953-959.

**Romeralo M., Spiegel F.W., Baldauf S.L.** (2010) A fully resolved phylogeny of the social amoebas (*Dictyostelia*) based on combined SSU and ITS rDNA sequences. *Protist* **161(4):**539-548.

**Salozhin S.V., Prokhorchuk E.B., Georgiev G.P.** (2005) Methylation of DNA–one of the major epigenetic markers. *Biochemistry Mosc.* **70(5):**525-532.

**Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

**Schaap P., Winckler T., Nelson M., Alvarez-Curto E., Elgie B., Hagiwara H., Cavender J., Milano-Curto A., Rozen D.E., Dingermann T., Mutzel R., Baldauf S.L.** (2006) Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science* **314(5799):**661-663.

**Schnitzler G., Fischer W., Firtel R.** (1994) Cloning and characterization of the G-box binding factor, an essential component of the developmental switch between early and late development in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* **8:**502-514.

**Schulkes C., Schaap P.** (1995) cAMP-dependent protein kinase activity is essential for preaggregative gene expression in *Dictyostelium*. *FEBS Lett.* **368:**381-384.

**Schumann G., Zündorf I., Hofmann J., Marschalek R., Dingermann T.** (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.

**Segall J., Kuspa A., Shaulsky G., Ecke M., Maeda M., Gaskins C., Firtel R., Loomis W.** (1995) A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* **128(3):**405-413.

**Seward D.J., Cubberley G., Kim S., Schonewald M., Zhang L., Tripet B., Bentley D.L.** (2007) Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 *in vivo* by JARID1 JmjC proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14(3):**240-242.

**Shabalina S.A, Koonin E.V.** (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* **23(10):**578-587.

**Shaulsky G., Fuller D., Loomis W. F.** (1998) A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development* **125:**691-699.

**Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y.** (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119:**941-953.

**Shiio Y., Eisenman R.N.** (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100(23):**13225-13230.

**Singal R., Ginder G.D.** (1999) DNA methylation. *Blood* **93(12):**4059-4070.

**Singleton C.K., McPherson C.E., Manning S.S.** (1988) Deactivation of gene expression upon the onset of development in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* **9:**327-336.

**Siol O.** (2006) Untersuchungen zum spezifischen Integrations-Mechanismus der TRE5-A Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum. Dissertationsschrift.*

**Siol O., Dingermann T., Winckler T.** (2006a) The C-module binding factor mediates expression of the *Dictyostelium* aggregation-specific adenylyl cyclase ACA. *Eukaryotic Cell* **5(4):**658-664.

**Siol O., Boutliliss M., Chung T., Glöckner G., Dingermann T., Winckler T.** (2006b) 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.

**Siu C.-H., Harris T.J.C., Wang J., Wong E.** (2004) Regulation of cell-cell adhesion during *Dictyostelium* development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15:**633-641.

**Smardon A., Spoerke J.M., Stacey S.C., Klein M.E., Mackin N., Maine E.M.** (2000) EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase, and functions in germ-line development, and RNA interference in *C. elegans. Curr. Biol.* **10(4):**169-178.

**Smit A.F.A.** (1999) Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9:**657-663.

**Smith S.S., Ratner D.I.** (1991) Lack of 5-methylcytosine in *Dictyostelium discoideum* DNA. *Biochem. J.* **277(1):**273-275.

**Snaar-Jagalska B.E., Kesbeke F., Van Haastert P.J.M.** (1988) G-proteins in the signal-transduction pathways of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* **9:**215-226.

**Souza G.M., Lu S., Kuspa A.** (1998) YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development* **125:**2291-2302.

**Souza G.M., da Silva A.M., Kuspa A.** (1999) Starvation promotes Dictyostelium development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development* **126:**3263-3274.

**Spudich J.A.** (1987). Methods in cell biology - *Dictyostelium discoideum*: Molecular approaches to cell biology. *Acad. Press*, Orlando.

**Stadler J., Keenan T.W., Bauer G., Gerisch G.** (1989) The contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* carries a phospholipid anchor of a novel type. *EMBO J.* **8(2):**371-377.

**Sucgang R., Chen G., Liu W., Lindsay R., Lu J., Muzny D., Shaulsky G., Loomis W., Gibbs R., Kuspa A.** (2003) Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Res.* **31(9):**2361-2368.

**Suganuma T., Workman J.L.** (2010) Features of the PHF8/KIAA1718 histone demethylase. *Cell Res.* **20(8):**861-862.

**Sun T.J., Devreotes P.N.** (1991) Gene targeting of the aggregation stage cAMP receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* **5:**572-582.

**Sussman R., Sussman M.** (1967) Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29(1):**53-55.

**Szafranski K., Glöckner G., Dingermann T., Dannat K., Noegel A.A., Eichinger L., Rosenthal A., Winckler T.** (1999) Non-LTR retrotransposons with unique integration preferences downstream of *Dictyostelium discoideum* transfer RNA genes. *Mol. Gen. Genet.* **262:**772-780.

**Tabara H., Sarkissian M., Kelly W.G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello C.C.** (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C.elegans*. *Cell* **99:**123-132.

**Takeuchi T., Yamazaki Y., Katoh-Fukui Y., Tsuchiya R., Kondo S., Motoyama J., Higashinakagawa T.** (1995) Gene trap capture of a novel mouse gene, *jumonji*, required for neural tube formation. *Genes Dev*. **9:**1211-1222.

**Takeuchi T., Watanabe Y., Takano-Shimizu T., Kondo S.** (2006) Roles of *jumonji* and *jumonji* family genes in chromatin regulation and development. *Dev. Dyn.* **235:**2449-2459.

**Tanaka Y., Okamoto K., Teye K., Umata T., Yamagiwa N., Suto Y., Zhang Y., Tsuneoka M.** (2010) JmjC enzyme KDM2A is a regulator of rRNA transcription in response to starvation. *EMBO J.* **29(9):**1510-1522.

**Travers A.A.** (1989) DNA conformation and protein binding. *Annu. Rev. Biochem.* **58:**427-452.

**Trewick S.C., Minc E., Antonelli R., Urano T., Allshire R.C.** (2007) The JmjC domain protein Epe1 prevents unregulated assembly and disassembly of heterochromatin. *EMBO J.* **26(22):**4670-4682.

**Tronnersjö S., Hanefalk C., Balciunas D., Hu G.Z., Nordberg N., Murén E., Ronne H.** (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., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y.** (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439(7078):**811-816.

**Turner B.M.** (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* **111:**285-291.

**van Tieghem P.** (1880) Sur quelques myxomycetes a plasmode agrege. *Bul. Soc. Bot. Fr.* **27:**317-322.

**Varney T.R., Casademunt E., Ho H.N., Petty C., Dolman J., Blumberg D.D.** (2002) A novel *Dictyostelium* gene encoding multiple repeats of adhesion inhibitor-like domains has effects on cell-cell and cell-substrate adhesion. *Dev. Biol.* **243:**226-248.

**Vaughan R.A., Devreotes P.N.** (1988) Ligand-induced phosphorylation of the cAMP receptor from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **263(28):**14538-14543.

**Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G. *et al.*** (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291:**1304-1351.

**Veron M., Mutzel R., Lacombe M.-L., Simon M.-N., Wallet V.** (1988) cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* **9:**247-258.

**Voytas D.F., Boeke J.D.** (1993) Yeast retrotransposons and tRNAs. *Trends Genet.* **9(12):**421-426.

**Watts D.J., Ashworth J.M.** (1970) Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119:**171-174.

**Wemmer D.E., Dervan P.B.** (1997) Targeting the minor groove of DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7:**355-361.

**Whetstine J.R., Nottke A., Lan F., Huarte M., Smolikov S., Chen Z., Spooner E., Li E., Zhang G., Colaiacovo M., Shi Y.** (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125:**467-481.

**Wilkins M.R., Williams K.L.** (1995) The extracellular matrix of the *Dictyostelium discoideum* slug. *Experientia* **51:**1189-1196.

**Williams J.** (1995) Morphogenesis in *Dictyostelium*: new twists to a not-so-old tale. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5:**426-431.

**Wilsker D., Probst L., Wain H.M., Maltais L., Tucker P.W., Moran E.** (2005) Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics* **86:**242-251.

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

**Winckler T., Trautwein C., Tschepke C., Neuhäuser C., Zündorf I., Beck P., Dingermann T.** (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:**703-714.

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

**Winckler T., Iranfar N., Beck P., Jennes I., Siol O., Baik U., Loomis W.F., Dingermann T.** (2004) CbfA, the C-module DNA-binding factor, plays an essential role in the initiation of *Dictyostelium discoideum* development. *Eukaryotic 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:**288-298.

**Wong L.M., Siu C.-H.** (1986) Cloning of cDNA for the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83:**4248-4252.

**Yamada Y., Kay R.R., Bloomfield G., Ross S., Ivens A., Williams J.G.** (2010) A new *Dictyostelium* prestalk cell sub-type. *Dev. Biol*. **339(2-3):**390-397.

**Yamane K., Toumazou C., Tsukada Y.I., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y.** (2006) JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125:**483-495.

**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:**7847-7852.

**Yanisch-Perron C., Viera J., Messing J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33:**103-119.

**Yoder J.A., Walsh C.P., Bestor T.H.** (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13(8):**335-340.

**Yu Y., Neiman A.M., Sternglanz R.** (2010) The JmjC domain of Gis1 is dispensable for transcriptional activation. *FEMS Yeast Res.* **10:**793-801.

**Yuen I.S., Jain R., Bishop J.D., Lindsey D.F., Deery W.J., van Haastert P.J.M., Gomer R.H.** (1995) A density-sensing factor regulates signal transduction in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* **129(5):**1251-1262.

**Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel, D. P.** (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101:**25-33.

**Zhang Y., Reinberg D.** (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15:**2343-2360.

**Zhou-Chou T., Wilkins M.R., Vardy P.H., Gooley A.A., Williams K.L.** (1995) Glycoprotein complexes interacting with cellulose in the ''cell print'' zones of the *Dictyostelium discoideum* extracellular matrix. *Dev. Biol.* **168:**332-341.

**Zofall M., Grewal S.I.S.** (2006) Swi6/HP1 recruits a JmjC domain protein to facilitate transcription of heterochromatic repeats. *Mol. Cell* **22:**681-692.

**Zoghbi H.Y., Orr H.T.** (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **23:**217-247.

## Wissenschaftliche Publikationen:

**Bilzer A., Dölz H., Reinhardt A., Schmith A., Siol O., Winckler T.** (2011)
The C-module-binding factor supports the amplification of TRE5-A retrotransposons in the *Dictyostelium discoideum* genome. *Eukaryotic Cell*, **10(1):**81-86.

**Lucas J., Bilzer A., Moll L., Zündorf I., Dingermann T., Eichinger L., Siol O., Winckler T.** (2009)
The carboxy-terminal domain of *Dictyostelium* C-module-binding factor is an independent gene regulatory entity. *PLOS ONE* **4(4):** e5012. Epub 2009 Apr 3.

## Tagungsbeiträge:

**Lucas J., Dölz H., Bilzer A., Siol O., Winckler T.** (2007)
Two-hybrid screening for binding partners of C-module-binding factor CbfA.
Posterpräsentation, Annual International *Dictyostelium* Conference 2007
Rotenburg an der Fulda (Deutschland)

**Lucas J., Bilzer A., Moll L., Bohnert M., Urushihara H., Eichinger L., Glöckner G., Siol O., Winckler T.** (2009)
The carboxy-terminal domain of *Dictyostelium* C-module-binding factor (CbfA) is an independent gene regulatory entity.
Vortrag, Annual International *Dictyostelium* Conference 2009
Estes Park (USA)

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist,

- dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe,

- dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und

- dass ich die vorliegende Arbeit weder komplett noch in Form einer in wesentlichen Teilen ähnlichen oder anderen Abhandlung bei der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung vorgelegt habe.

Jena, 27. Januar 2011