

**Untersuchungen zum spezifischen  
Integrations-Mechanismus  
der TRE5-A Retrotransposons  
in *Dictyostelium discoideum***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Oliver Siol**  
aus Lüdenscheid

Frankfurt am Main, 2006  
(D30)

vom Fachbereich

Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. Winckler
2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dingermann

Datum der Disputation: 23.6.2006

Was lange währt wird endlich gut,  
der Oli kriegt nen Doktorhut

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der zelluläre Schleimpilz <i>Dictyostelium discoideum</i>	1
1.1.1	Taxonomie und phylogenetischer Ursprung	1
1.1.2	Lebenszyklus	3
1.1.3	Organisation des Genoms	6
1.2	Transposable Elemente	8
1.2.1	Allgemeines	8
1.2.2	DNA-Transposons	11
1.2.3	Retroelemente	13
1.2.4	Spezifische Integrationen mobiler Elemente	20
1.2.5	Auffinden von <i>de novo</i> -Integrationen	22
1.3	Transposons in <i>Dictyostelium discoideum</i>	24
1.3.1	DNA-Transposons	25
1.3.2	LTR-Retrotransposons	26
1.3.3	Non-LTR-Retrotransposons	28
1.4	Pol III-Gene	33
1.4.1	tRNA-Gene	33
1.4.2	Das ribosomale 5S-Gen	35
1.5	Gentherapie	36
1.6	Transposons in der Gentherapie	38
1.7	Zielsetzung der Arbeit	40
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
2.1	Material	41
2.1.1	Verbrauchsmaterial	41
2.1.2	Chemikalien	41
2.1.3	Kits	42
2.1.4	Enzyme	42
2.1.5	Allgemeine Lösungen und Puffer	42
2.1.6	Nährmedien	43
2.1.7	Mikroorganismen	45
2.1.8	Antikörper	45
2.2	Molekularbiologische Methoden	46
2.2.1	Standardmethoden	46
2.2.2	DNA Sequenzierung	46
2.2.3	Gel Shift (EMSA)	47
2.2.4	CPRG-Test	47
2.3	Molekularbiologische Methoden für <i>Dictyostelium discoideum</i>	48
2.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen	48
2.3.2	Transformation	48
2.3.3	5-FO-Selektion	50
2.3.4	Picken von Klonen	51

2.3.5	Herstellung von Gefrier-Stocks .....	51
2.3.6	Herstellung von Zelllysaten (Pellets) .....	52
2.3.7	Präparation von genomischer DNA .....	53
2.3.8	Präparation von Kernextrakten .....	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
3.1	Untersuchung des Integrationszieles der TRE-Elemente .....	55
3.1.1	TRE-Integrationen an einem humanen Met <sup>CAU</sup> -Gen .....	56
3.1.2	Integrationen in der Umgebung des Glu <sup>Sup</sup> -Gens .....	62
3.1.3	Untersuchungen der Promotorregionen von tRNA-Genen .....	66
3.1.4	Ist ein in die TRE-Falle inseriertes tRNA-Gen aktiv? .....	72
3.1.5	B-Box Mutanten von tRNA-Genen .....	74
3.1.6	Welchen Einfluss hat eine externe B-Box? .....	81
3.1.7	TRE-Integrationen an einem ribosomalen 5S-Gen .....	84
3.1.8	Gibt es TRE-Integrationen in die leere TRE-Falle? .....	88
3.2	Konstruktion nichtautonomer TRE5-A-Elemente .....	90
3.2.1	Etablierung des Testsystems .....	92
3.2.2	Retrotranspositionsfrequenzen verschiedener TRE5-A <sup>BSR</sup> -Elemente ..	98
3.2.3	Integrationsorte der TRE5-A <sup>BSR</sup> -Elemente .....	100
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
4.1	TRE-Falle .....	106
4.1.1	Die TRE-Falle als Integrationsziel für TRE-Transposons .....	106
4.1.2	Integrationen in der Umgebung eines heterologen tRNA-Gens .....	107
4.1.3	Integrationen in der Umgebung des ribosomalen 5S-Gens .....	108
4.1.4	Inaktivierte tRNA-Gene .....	109
4.1.5	Externe B-Box .....	110
4.2	TRE5-A <sup>BSR</sup> -Elemente .....	112
4.3	Vergleich der beiden Testsysteme .....	114
4.4	TRE5-A-Integrationen im Vergleich zu L1-Integrationen .....	115
4.4.1	Mikrohomologien und Zielsequenz-Deletionen .....	116
4.4.2	Extra Nukleotide .....	119
4.4.3	Unterschiede zwischen ursprünglichen und <i>de novo</i> -Integrationen ..	120
4.4.4	<i>cis</i> und <i>trans</i> Präferenzen .....	121
4.5	Ungerichtete Integrationen .....	121
4.6	Abstände zwischen der A- und B-Box .....	122
4.7	Integrationen an isolierten B-Boxen .....	123
4.8	TRE-Integrationen benötigen TFIIC .....	124
4.9	Transposons in der Gentherapie .....	125
4.10	Ausblick .....	126
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>127</b>

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>135</b>
7.1	Abkürzungen .....	135
7.2	Abbildungen .....	137
7.3	Synthetische Oligonukleotide .....	138
7.3.1	Oligonukleotide, die in TRE-Elementen binden.....	138
7.3.2	Oligonukleotide, die im Blasticidin-Gen binden .....	139
7.3.3	Oligonukleotide, die in tRNA-Genen oder im 5S-Gen binden.....	139
7.3.4	Oligonukleotide, die im UMPS-Gen binden .....	140
7.3.5	Sonstige Oligonukleotide.....	140
7.4	Vektoren und Plasmide .....	140
7.4.1	Kommerzielle Ausgangsvektoren.....	140
7.4.2	Hergestellte Vektorkonstrukte mit Insert .....	141
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>145</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>146</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>147</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*

*Dictyostelium* ist ein zellulärer Schleimpilz, der natürlicherweise in humusreichen Waldböden der gemäßigten Zonen zu finden ist. Bei ausreichender Nahrung kommt *Dictyostelium* als einzellige Amöbe vor, während er bei Nahrungsmangel in einen Entwicklungszyklus übergeht und dann in Form eines vielzelligen Organismus vorkommt. Die erste entdeckte Art, *Dictyostelium mucuroides*, wurde 1869 von O. Brefeld beschrieben (Brefeld 1869). *Dictyostelium discoideum*, die Art mit der die Versuche in dieser Dissertation durchgeführt wurden, wurde Anfang der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts von K. B. Raper in den Wäldern von North Carolina entdeckt und charakterisiert (Raper 1935).

### 1.1.1 Taxonomie und phylogenetischer Ursprung

Die Bezeichnung „Schleimpilz“ für *Dictyostelium discoideum* ist irreführend, da dieser Organismus weder den eigentlichen plasmodischen Schleimpilzen, noch den echten Pilzen zugeordnet werden kann. Von den echten Pilzen unterscheidet sich *D. discoideum* durch das Fehlen von Hyphen. Im Gegensatz zu den echten Schleimpilzen, lebt *D. discoideum* weder saprophytisch, noch bildet er ein Plasmodium aus.

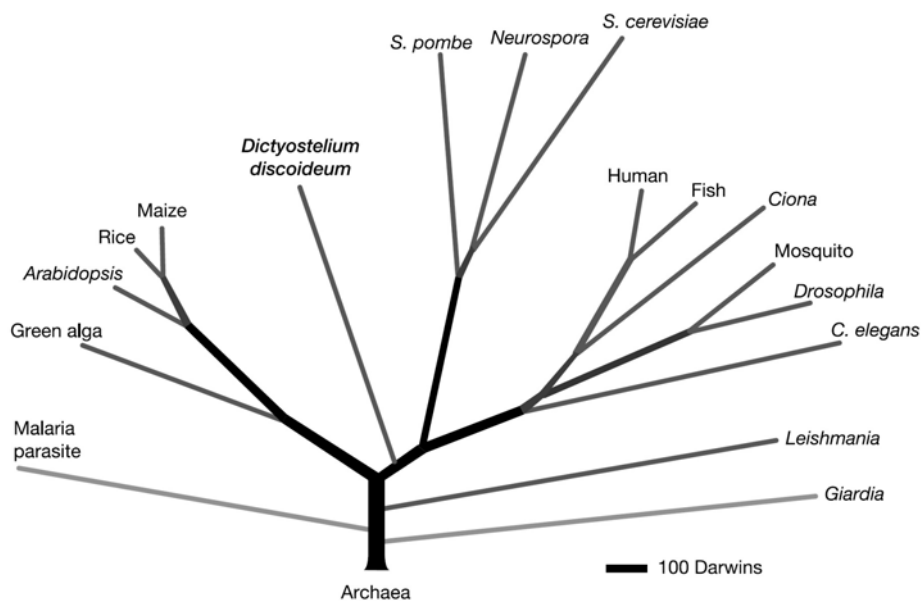
Aufgrund seiner widersprüchlichen Erscheinungsform und phylogenetischen Beziehungen war die evolutionäre Stellung von *Dictyostelium* eine Streitfrage, die für eine lange Zeit nicht befriedigend beantwortet werden konnte (Baldauf 1999; Loomis 1995). Die Chemotaxis der Amöben und die Photo- und Thermotaxis der Amöben im Slug-Stadium stehen im scharfen Kontrast zu der pilzartigen Erscheinung der Fruchtkörper und der zellulosehaltigen Zellwand späterer Entwicklungsstadien von *Dictyostelium discoideum*.

Inzwischen sind circa 70 Arten zellulärer Schleimpilze (*Dictyostelidae*) bekannt. Zu den *Dictyostelidae* gehören nach neuesten phylogenetischen Untersuchungen neben der Gattung *Dictyostelium* auch die Gattungen *Polysphondylium* und *Acytostelium*. Die *Dictyostelidae* werden in vier Gruppen eingeteilt, wobei *Dictyostelium discoideum* zu der am weitesten entwickelten Gruppe 4 gezählt wird (Alvarez-Curto 2005).

Entsprechend phylogenetischen Untersuchungen werden neben den zellulären Schleimpilzen sowohl die plasmodischen (*Myxogastridae*), als auch die protosteliden Schleimpilze zur Klasse der *Mycetozoa* gezählt. Alle Spezies aus der Klasse der *Mycetozoa* haben die

gemeinsame Eigenschaft eines definierten Entwicklungszyklus zur Ausbildung eines quasi multizellulären Fruchtkörpers befähigt zu sein (Baldauf 1997; 2000).

Neueren phylogenetischen Berechnungen zufolge, zweigt die Klasse der *Mycetozoa* monophyletisch sehr spät vom eukaryotischen Stammbaum ab und ist somit in der Krone des eukaryotischen Stammbaumes positioniert (Baldauf 2000). Unterstützt wird diese Annahme durch eine gemeinsame Genfusion, die nur bei *Dictyostelium*, Pilzen und *Metazoen* vorhanden ist (Nara 2000). Untersuchungen von mehr als 100 Proteinen zeigen, dass *Dictyostelium* nach der Spaltung der Pflanzen von den Tieren, aber noch vor den Pilzen abzweigt (Baptiste 2002). Durch das fertig sequenzierte Genom von *Dictyostelium discoideum* konnten mittlerweile über 5.000 Proteinsequenzen von *Dictyostelium* mit denen anderer Eukaryoten verglichen werden, daraus ergibt sich folgender Stammbaum nach Eichinger 2005:



**Abbildung 1.1.1: Proteom-basierter Stammbaum**

Der Stammbaum wurde aus 5.279 Proteinfamilien der 17 komplett sequenzierten Eukaryoten berechnet und wurzelt auf 159 Proteinclustern von 6 Archaea-Proteomen. Der Stammbaum basiert auf dem Prinzip des „maximum likelihood“ (Eichinger 2005).



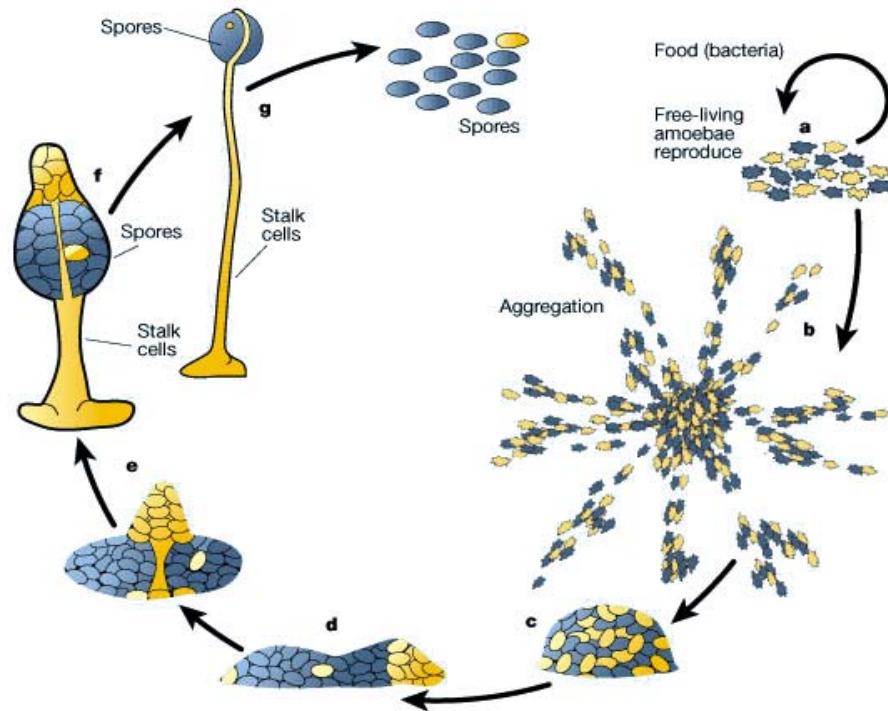
## 1.1.2 Lebenszyklus

*Dictyostelium discoideum* ernährt sich von Bakterien, die durch Phagozytose aufgenommen werden. Die Bakterien werden von einem unspezifischen, zellmembranständigen Rezeptor erkannt, von Pseudopodien umschlossen, endozytotisch aufgenommen und in den Lysosomen zersetzt (Bozzaro 1995). Für eine einzige Zellteilung phagozytiert *D. discoideum* ca. 1.000 Bakterien (Mutzel 1991). In dieser Phase des Lebenszyklus befindet sich *D. discoideum* im vegetativen Wachstum und liegt als ca. 8 bis 12 µm große, einzellige Amöbe vor, die sich durch Aktin- und Myosinfilamente amöboid fortbewegen kann (Abbildung 1.1.2a). Sobald die bakterielle Nahrungsquelle nicht mehr ausreichend ist, oder bestimmte Temperaturgrenzen überschritten werden, geht *D. discoideum* aus der Phase des vegetativen Wachstums in eine ca. 24 bis 30 Stunden andauernde Entwicklungsphase über. Hier bilden die Amöben einen multizellulären Organismus aus, der durch morphologische Umformung und Zelldifferenzierung in der Bildung eines Fruchtkörpers endet (Abbildung 1.1.2b-g).

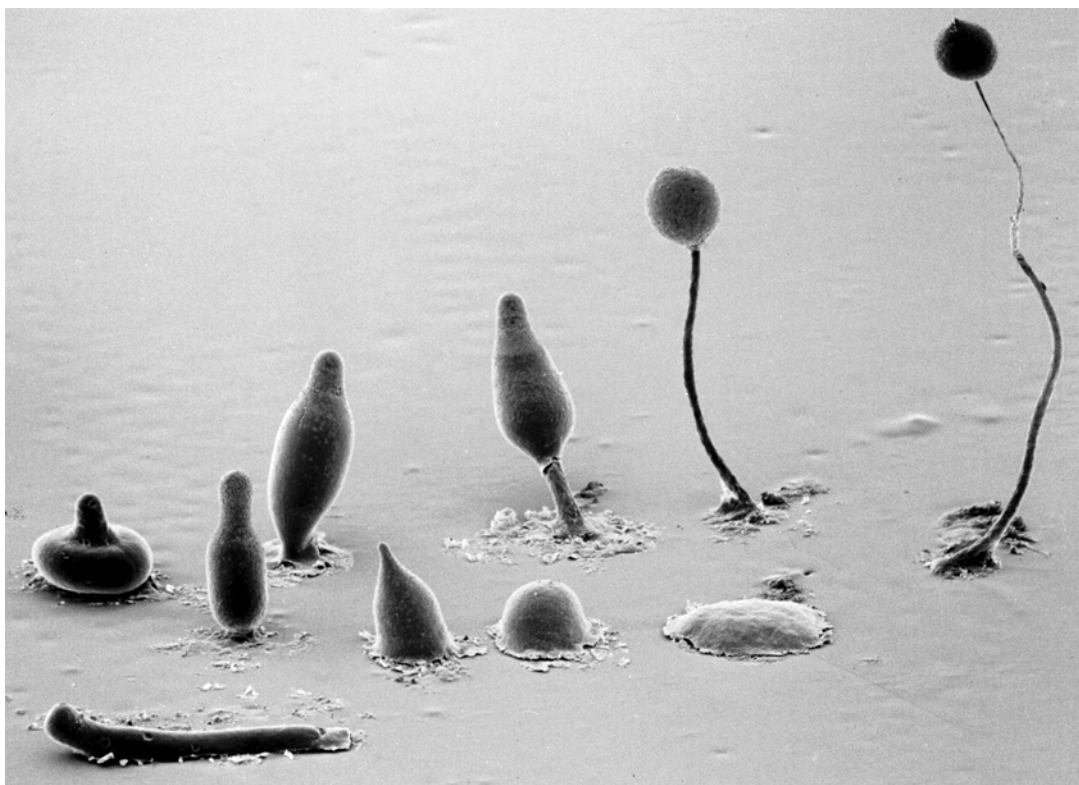
In der Entwicklungsphase geben die einzelnen Zellen ihre Unabhängigkeit und Individualität auf. Sie wandern durch cAMP-vermittelte Chemotaxis auf ein Zentrum zu und bilden innerhalb von 6 bis 7 Stunden ein, aus ca.  $10^5$  Zellen bestehendes, multizelluläres Aggregat. Anhand des cAMP-Gradienten in der Umgebung erhalten die Zellen eine Orientierung und bewegen sich stets in Richtung steigender cAMP-Konzentration. Die cAMP-Sezernierung erfolgt hauptsächlich auf der zur Bewegungsrichtung der Zelle abgewandten Seite. Da sich jede Zelle somit auf das hintere Ende einer benachbarten Zelle zubewegt, kommt es zur Ausbildung der charakteristischen, astförmigen Bahnen, auf denen die Amöben in Richtung eines Aggregationszentrums wandern (Abbildung 1.1.2b). In dem Aggregat fusionieren die einzelnen Zellen, im Gegensatz zu den echten plasmodischen Schleimpilzen, jedoch nicht zu einem Plasmodium, sondern bilden unter Aufrechterhaltung der einzelnen Zellen ein sogenanntes Pseudoplasmodium (Abbildung 1.1.2c). Bereits nach ca. 10 Stunden in der Phase der frühen Entwicklung, kommt es zu einer Veränderung der Aktivität von entwicklungsrelevanten Genen und damit zur Differenzierung der Zellen in Präsporenzellen und Prästielzellen. Das Pseudoplasmodium besteht zu ca. 15% aus Prästielzellen und zu ca. 75% aus Präsporenzellen. Ca. 10% der Zellen sind noch nicht differenziert. Die Prästielzellen sind als geschlossener Verband an der Spitze des Zellaggregates lokalisiert (Abbildung 1.1.2d) (Parent 1996). Zwischen den Präsporenzellen befinden sich vereinzelt Zellen, welche den Prästielzellen ähneln. Diese bilden später den „upper cup“ und den „lower cup“ des Sporenkopfes aus (Feit 1990; Jermyn 1989). Das Pseudoplasmodium kann sich entweder direkt zu einem reifen Fruchtkörper

(Sorokarp) weiterentwickeln, oder sich zunächst in die Länge strecken und schneckenartig, mit Hilfe einer Zellulose/Protein-Schleimscheide aufgrund photo-, chemo- oder thermotaktischer Reize umherbewegen. Schließlich stellt das Pseudoplasmodium seine Wanderbewegungen ein und es kommt zur Kulmination der Entwicklung von *D. discoideum*. Ein Teil, der an der Spitze des Pseudoplasmodiums positionierten Prästielzellen, wandert in die Masse der Präsporencellen ein und stößt zum Boden vor (Abbildung 1.1.2e). Die Prästielzellen differenzieren jetzt unter der Ausbildung eines Stiels zu fertigen Stielzellen aus, in dem sie durch Vakuolisierung stark anschwellen und schließlich absterben. Dadurch wird die Masse der Präsporencellen in die Höhe gehoben und es entsteht der charakteristische Fruchtkörper (Abbildung 1.1.2f). Die Präsporencellen differenzieren unter Ausbildung eines Sporenkopfes zu reifen Sporencellen aus, in dem sie Wasser abgeben und zum Schutz vor extremen Umweltbedingungen, wie Hitze oder Trockenheit, eine Mukosaccharid-Kapsel ausbilden. Der Sporenkopf wird durch die „upper cup“ und „lower cups“ am Stiel des Fruchtkörpers fixiert. Die Sporencellen gehen im Gegensatz zu den abgestorbenen Stielzellen in einen Ruhezustand über und können unter günstigeren Umweltbedingungen wieder auskeimen (Abbildung 1.1.2g). Somit können sie erneut in die Phase des vegetativen Wachstums eintreten (Cotter 1992). *D. discoideum* hat durch diesen Lebenszyklus die Fähigkeit erlangt, unter ungünstigen Lebensbedingungen durch teilweise Opferung von Zellen einem bestimmten Anteil an Zellen das Überleben zu ermöglichen. Ein mikroskopischer Überblick der Entwicklungsphase von *D. discoideum* ist in Abbildung 1.1.3 dargestellt.

*Dictyostelium discoideum* ist aufgrund dieses einfachen Entwicklungszyklusses, der strikt von dem Wachstumszyklus getrennt ist, in nur zwei Zelltypen und der nahen Verwandtschaft zu den „höheren“ Eukaryoten ein beliebter biologischer Modellorganismus. Zu den wichtigsten Forschungsgebieten an *Dictyostelium discoideum* gehören u. a. die molekularbiologische Aufklärung von Zelldifferenzierung, Chemotaxis, Zellmotilität und Signal-Transduktion (Gross 1994).



**Abbildung 1.1.2: *D. discoideum* Entwicklungszyklus (schematisch)**  
 Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* (Kessin 2000).



**Abbildung 1.1.3: *D. discoideum* Entwicklungszyklus (mikroskopisch)**  
 Mikroskopische Aufnahmen des Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* (Copyright, M.J. Grimson & R.L. Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University).

### 1.1.3 Organisation des Genoms

*Dictyostelium discoideum* besitzt ein ca. 34 Mb umfassendes, haploides Genom. Dieses verteilt sich auf sechs 4-8 Mb große Chromosomen und auf ein ca. 88 kb großes extra-chromosomales Palindrom, welches mit ca. 100 Kopien im Zellkern lokalisiert ist und für die Gene der 5,8S-, 17S-, 26S- und 5S-rRNA kodiert (Eichinger 2005; Sucgang 2003). Jedes Palindrom besteht aus zwei komplementären Armen. Kopien von Teilen dieses Palindroms befinden sich in den Telomerregionen der Chromosomen. Zusätzlich befinden sich wenigstens die zentralen 3,2 kb des Palindroms als Kopie auf Chromosom 4 (Eichinger 2005). Da an dieser Stelle das Genom nicht assembliert werden konnte, ist nicht ganz sicher ob sich dort eine komplette Kopie des Palindroms befindet. Ob sich das Palindrom selbst reproduzieren kann und sich nach der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen aufteilt (Eichinger 2005), oder ob es nach jeder Zellteilung neu von der chromosomalen Kopie gebildet wird (Sucgang 2003), ist ebenfalls nicht bekannt. Die Struktur des Palindroms lässt aber vermuten, dass es sich durch Doppelstrangtrennung, selbst-priming und anschließende Zweitstrangsynthese selbst repliziert (Eichinger 2005).

Ähnlich wie *Saccharomyces cerevisiae*, besitzen *Dictyostelien* im Zellkern zusätzlich bis zu 300 Kopien eines 1,5 bis 27 kb großen Plasmides, wobei die Art des Plasmids abhängig vom jeweiligen *Dictyostelium*-Stamm ist (Kiyosawa 1993). Diese Plasmide besitzen einen Replikationsursprung und kodieren für ein Protein (Rep-Protein), welches für die autonome Replikation und Regulation der Anzahl der Plasmide benötigt wird (Shammat 1998; 1999). Außer diesem Rep-Gen wurden auf dem Plasmid keine weiteren Gene gefunden, die Aufschluss über die Funktion des Plasmides geben.

Jede Zelle enthält in den ca. 200 Mitochondrien je eine Kopie einer 55 kb großen mitochondrialen DNA, die hauptsächlich für Gene des Energie-Stoffwechsels kodiert.

Die Sequenzierung des Genoms des *Dictyostelium discoideum* Stammes AX4 durch das „*Dictyostelium*-Genom-Projekt“ ist 2005 fertig gestellt worden (Eichinger 2005). Das Genom von *Dictyostelium discoideum* ist mit einem Gehalt von 78% ausgesprochen A/T-reich. In Exons liegt der A/T-Gehalt im Mittel bei 73% und in nichtkodierenden Regionen bei 85%. Homopolymere poly(dA)- bzw. poly(dT)-Sequenzen können eine Länge von bis zu 180 bp erreichen. An einigen dieser Stellen und an einigen repetitiven Orten im Genom sind auch im fertig sequenzierten Genom noch Lücken vorhanden, die nicht geschlossen werden können.

Das *Dictyostelium*-Genom kodiert für ca. 12.500 Gene und ist damit ein sehr dichtes Genom, d. h. 71% des Genoms werden durch Gene repräsentiert bzw. 63% des Genoms sind Exon-kodierend. Durchschnittlich fällt auf ca. 2.600 bp ein Gen, sodass zwischen den kodierenden Regionen der Gene durchschnittlich nur ein Abstand von 780 bp besteht.

Innerhalb dieser Abstände liegen auch die regulatorischen Bereiche, wie Promotoren und Terminatoren. Gemessen an der extrem hohen genomischen Dichte, enthält das *Dictyostelium*-Genom mit ca. 10% einen bemerkenswert großen Anteil mobiler genetischer Elemente (Eichinger 2005). Wie die Tabelle 1-1 zeigt, ist das humane Genom im Vergleich zum *Dictyostelium*-Genom ca. 85 mal größer, besitzt aber nur ca. 1,8 mal so viele Gene. Der durchschnittliche Abstand zwischen humanen Genen beträgt ca. 58.000 bp (Lander 2001). Hieran ist deutlich erkennbar, dass mobile DNA-Elemente nur wenig Platz haben in das extrem dicht gepackte Genom von *D. discoideum* zu integrieren, ohne Gene oder regulatorische Bereiche zu treffen und dadurch zu mutieren.

	Mensch	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Genomgröße	2.900 Mb	34 Mb
Zahl der Chromosomen	2x23	1x6
G/C-Gehalt	41%	22%
Intron G/C-Gehalt	38%	12%
Anzahl der Gene	~22.300	~12.500
<b>kodierende Regionen</b>	<b>~1%</b>	<b>~60%</b>
Genlänge	~27.000 bp	~1.700 bp
Länge der kodierenden Regionen pro Gen	1.340 bp	1.414 bp
<b>Abstand zwischen Genen</b>	<b>~58.000 bp</b>	<b>780 bp</b>
tRNA-Gene	497	391
Transposongehalt	45%	10%

**Tabelle 1-1: Vergleich der Genome von Mensch und *Dictyostelium***

Gegenüberstellung einiger markanter Merkmale des humanen- und des *Dictyostelium*-Genoms erstellt nach Lander (2001) und Eichinger (2005).

## 1.2 Transposable Elemente

### 1.2.1 Allgemeines

Transposable Elemente sind nicht infektiöse mobile genetische Elemente, welche die Fähigkeit besitzen, ihre genetische Position im Genom einer Zellen zu verändern. Transposons wurden bereits in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts von der späteren Nobelpreis-Trägerin Barbara McClintock in *Zea mays* entdeckt (McClintock 1948). Das war zu einer Zeit, in der weder die molekularbiologischen Methoden, noch die Struktur der DNA bekannt waren. Barbara McClintock entdeckte dicentrische Chromosomen (Chromosomen mit zwei Centromeren) und erklärte diese durch Fusionen von längeren Chromosomenstücken, die beide ihre Centromerregion beinhalteten. Weiterhin beobachtete McClintock, dass solche Pflanzen überdurchschnittlich viele Nachkommen mit gescheckten oder ganz dunklen Maiskörnern hatten, was für Mutationen in Genen für die Pigmentierung spricht. McClintock untersuchte die Chromosomenbrüche im Maisgenom genauer und fand heraus, dass diese immer an definierten Stellen im Genom auftraten. Sie nannte diese Stellen daher *dissociation*-(Ds)-Loci. Zwar stand fest, dass diese Ds-Loci die Orte des Chromosomenbruchs sind, doch trat dieses Ereignis nur ein, wenn ein zweiter Locus vorhanden war, der daher *activator* (Ac) genannt wurde. McClintock konnte zeigen, dass auch der Ac-Locus instabil ist. Für beide Elemente wurde später gezeigt, dass sie ihren angestammten Platz auf dem Chromosom verlassen können (Fedoroff 1989). Doch während Ac dazu allein in der Lage ist, benötigt Ds offenbar die Anwesenheit von Ac bzw. seiner Proteine. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Mutationen in den Pigmentgenen tatsächlich auf Insertionen von Ds-Elementen beruhten (Xiao 2000).

Als es möglich war die Molekularstruktur eines solchen mobilen Elements zu untersuchen, stellte sich heraus, dass diese Transposons aus einer kodierenden Sequenz bestehen, welche von zwei umgekehrt liegenden Sequenzwiederholungen (ITR) flankiert ist. Das Genprodukt der kodierenden Sequenz ermöglicht den Transposons ihre Mobilität. Dieses Protein wurde daher als Transposase (TR) bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass in den ITRs die Erkennungssequenzen für die Transposase liegen (Plasterk 1999). Durch einen Sequenzvergleich von Ac und Ds wurde deutlich, dass ein Ds-Element ein verkürztes Ac-Element ist, dessen Fähigkeit, selbst eine Transposase zu bilden, deletiert ist. Die ITR-Sequenzen des Ds-Elements können aber von der Transposase eines aktiven Ac-Elementes erkannt werden und so das Ds-Element mobilisieren (Fedoroff 1989).

Mittlerweile sind Transposons in fast allen untersuchten Eukaryoten und Prokaryoten gefunden worden. Sie können einen beträchtlichen Anteil eines Genoms einnehmen, ihre

Anteile reichen von 0,1% im *Arabidopsis thaliana* (Konieczny 1991) über 3% bei der Hefe (Kim 1998), 45% beim Menschen (Lander 2001) bis zu 70%-85% bei Mais (Kumar 1999). Früher wurde dieser Genomanteil nur als sogenannte „junk DNA“ oder sogar „selfish DNA“ interpretiert (Flavell 1995). Aber die ubiquitäre Verbreitung von Transposons spricht gegen eine Anschauung von einem nutzlosem Ballast oder gar molekularen Parasiten. Sie deutet eher auf einen positiven Beitrag, den Transposons zur evolutionären Entwicklung des Wirtsgenoms leisten können hin. Die zahlreichen genomischen Kopien solcher repetitiven Elemente provozieren durch Rekombination häufig Inversionen, Duplikationen oder Deletionen und generieren teilweise auch Pseudogene. Sie tragen so zur Flexibilität und zum Reorganisationspotential eines Genoms bei. Die genetische Variabilität ist die Grundvoraussetzung für die Anpassung von Organismen an ihre Umwelt. Transposons werden deshalb heute als maßgebliche Werkzeuge der Evolution (Garfinkel 2005; Mourier 2005) betrachtet. Diese Tatsache wird dadurch untermalt, dass für unterschiedliche Wirtszellen gezeigt werden konnte, dass sobald sie einem evolutionären Druck ausgesetzt sind, sich die Aktivität ihrer Transposons erhöht und einige Zellen aufgrund der erhöhten Mutationsrate einen Überlebensvorteil erhalten (Grandbastien 2005; Li 2001). Es konnte auch gezeigt werden, dass mehrere entscheidende genetische Unterschiede zwischen den Genomen des Menschen und der Affen auf Rekombinationen beruhen, welche durch Alu-Elemente vermittelt wurden (Mourier 2005).

Die Rearrangements durch transposable Elemente im Genom können natürlich auch negative Auswirkungen auf ihren Wirt haben. Insgesamt sind beim Menschen bis heute fast 50 schwere Erkrankungen dokumentiert, deren Ursachen auf die Mobilität von Retrotransposons zurückzuführen sind. So hat z. B. die Integration des Retrotransposons L1 in das Faktor VIII-Gen zu einer Hämophilie A und die somatische L1-Integration in das APC-Gen in Dickdarm-Epithelzellen zur Entwicklung eines Kolon-Karzinoms geführt (Chen 2005; Kazazian 1998).

Transposons und Wirtszelle stehen in einer Art Symbiose zum beiderseitigen Nutzen. Allerdings scheint ein empfindliches Gleichgewicht zwischen der notwendigen Aktivität seitens der Transposons und der tolerierten Aktivität seitens der Wirtszelle zu herrschen. Es liegt nicht nur im Interesse der Wirtszelle, dass die Transposons zu keiner letalen Mutation im Genom führen, sondern auch im Interesse der Transposons selbst, da ihre Existenz im Gegensatz zu Retroviren, welche die Zelle verlassen können, zwingend an das Überleben der Wirtszelle gebunden ist.

Neben einer Erhöhung der Variabilität eines Genoms bieten Transposons weitere Vorteile für die Wirtszelle. So können Retrotransposons für die Aufrechterhaltung von Telomeren verantwortlich sein (Pardue 2005) und DNA-Doppelstrangbrüche reparieren indem sie diese durch ihre Integration verschließen (Miskey 2005; Morrish 2002). Dass sich im Laufe

der Evolution Transposon und Wirtszelle auf einander abgestimmt haben, ist auch an weiteren Eigenschaften zu erkennen:

- Retrotransposons, welche den größten Anteil der humanen Transposons stellen, sind von der Transkriptions-Maschinerie der Wirtszelle abhängig. Ihre RNA wird von der Wirtszelle amplifiziert bevor ihre eigene Reverse Transkriptase daran die cDNA synthetisieren kann. Für die Initiation der reverse Transkription des RNA-Intermediats benötigen LTR-Retrotransposons eine partiell komplementäre, zelluläre tRNA (Wilhelm 2005).
- Die Wirtszelle kann durch Methylierung von Retrotransposon-Promotoren die Transkription von Retrotransposons und damit ihre Frequenz regulieren. Andererseits kann auch die Methylierung benachbarter Gene durch Transposonaktivität verändert werden (Mourier 2005).
- Das genomische Imprinting ist vermutlich aus einer Reaktion auf das mutagene Potential von transposablen Elementen entstanden (McDonald 2005).
- Viele Retrotransposons zeigen eine Entwicklungs- oder Gewebespezifität in ihrer Transkriptionsstärke und damit auch in ihrer Retrotranspositionsfrequenz. Die meisten Retrotransposons sind insbesondere in Keimbahnzellen aktiv, da nur deren genetische Information an nachfolgende Generationen weitergegeben wird (Ostertag 2001a; Tchenio 2000)
- Die Wirtszelle kann Transposon-Sequenzen oder Transposon-kodierte Proteine in ihre eigenen molekularbiologischen Abläufe einbinden (molekulare Domestifikation) (Malik 2005).
- Einige Retrotransposons haben die Fähigkeit erlangt, nicht zufällig, sondern spezifisch in unkritische Bereiche des Genoms der Wirtszelle zu integrieren, um dadurch eine für die Zelle schädliche Insertions-Mutation zu vermeiden (vgl. 1.2.4).

Diese Beispiele der zellbiologisch engen Verzahnung von Wirtszelle und Transposon zeigen, dass diese Beziehung evolutionär schon sehr früh begonnen haben muss. Phylogenetische Berechnungen schätzen das Alter von Retrotransposons auf ca. 600 Millionen Jahre, was auch dem Alter der frühesten eukaryotischen Organismen entspricht (Kazazian 2000).

Bei der Integration in die Ziel-DNA erzeugen die meisten Transposons einen versetzten Schnitt von einigen wenigen Basen bis zu mehreren Tausend Basen Länge. Dieser wird komplementär von zellulären Reparaturmechanismen aufgefüllt, wobei sogenannte Zielsequenz-Verdopplungen (TSD) oberhalb und unterhalb des Transposons zustande kommen. Die Länge der TSDs ist charakteristisch für die Art des Transposons (Gilbert 2002; 2005).



## Einteilung von Transposons

Transposons werden nach ihrem Transpositionsmechanismus in DNA-Transposons und Retrotransposons eingeteilt. DNA-Transposons werden als DNA-Fragment aus dem Genom herausgeschnitten und an anderer Stelle wieder integriert. DNA-Transposons transponieren somit nach einem Exzisions-Integrations-Mechanismus („cut and paste“). Die Anzahl der DNA-Transposons ändert sich durch ihre Mobilisierung nicht und sie können Introns enthalten. Retrotransposons werden über eine RNA-Kopie und anschließende reverse Transkription an einer anderen Stelle in das Genom integriert. Retrotransposons werden somit durch einen Kopier-Integrations-Mechanismus („copy and paste“) mobilisiert. Bei jeder Integration eines Retrotransposons steigt ihre Anzahl im Genom (Deininger 2002). Während DNA-Transposons sowohl in Prokaryoten, wie auch in Eukaryoten vorkommen, wurden Retrotransposons nur in eukaryotischen Genomen gefunden (Malik 2001).

### 1.2.2 DNA-Transposons

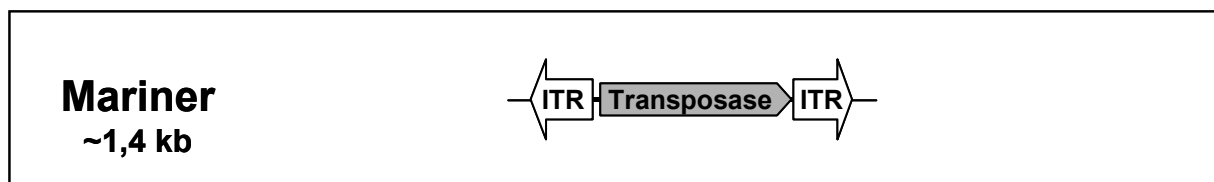
Da das Springen von DNA-Transposons normalerweise in einer nicht-replikativen Weise abläuft, können sie sich nur in einem Genom vermehren indem sie während der Replikation des Genoms in der S-Phase der Zelle transponieren (Fedoroff 1989). DNA-Transposons sind in der Regel weniger als 2,5 kb lang und besitzen an ihren Enden zwei 10 bis 40 bp lange, entgegengesetzt orientierte, terminale Wiederholungseinheiten (ITR). DNA-Transposons erzeugen bei ihrer Integration 2 bis 14 bp lange Ziel-Sequenz-Verdopplungen und enthalten einen offenen Leserahmen (ORF), der für eine Transposase kodiert. Die 5'-ITR besitzt Promotor-Aktivität und ist für die Transkription des Transposase-Gens verantwortlich. Die erzeugten Zielsequenz-Verdopplungen bleiben auch nachdem das Transposon den genetischen Ort verlassen hat bestehen. Dadurch hinterlassen die Transposons einen „Fußabdruck“ im Genom.

Die Transposase bindet an die beiden ITRs und schneidet das Transposon dort aus der genomischen DNA heraus. Zusätzlich vermittelt die Transposase auch die Integration des DNA-Transposons an einem neuen genomischen Ort und erfüllt somit ähnliche Aufgaben wie die Integrase verschiedener Retrotransposons. Als gemeinsames Motiv beider Enzyme konnte ein sogenanntes DD(35)E-Motiv identifiziert werden, was eine evolutionäre Verknüpfung von DNA-Transposons und Retrotransposons aufzeigt. Sowohl die Transposase der DNA-Transposons, wie auch die Integrase der Retrotransposons, besitzen eine

Endonuklease-Aktivität, um einen Schnitt in der Zielsequenz zu erzeugen, an dem das Transposon in das Genom integriert werden kann (Capy 1996; Doak 1994).

Die Klasse der DNA-Transposons ist sehr heterogen, wobei sich die meisten DNA-Transposons in zwei Gruppen einteilen lassen.

Die Elemente der Tc1/Mariner-Subklasse haben in der Regel Target-Site-Duplikationen von nur 2 bp Länge. Diese haben typischerweise die Sequenz „TA“. In Abbildung 1.2.1 ist der Aufbau eines DNA-Transposons schematisch dargestellt. Elemente dieser Klasse kommen in fast allen eukaryotischen Genomen vor. Namensgebend für diese Klasse sind die Elemente Tc1 aus *Caenorhabditis elegans* und die Mariner-Elemente, welche bei verschiedenen Insekten und beim Menschen vorkommen (Miskey 2005). Im Gegensatz zu den meisten mobilen Elementen sind Transposons dieser Klasse auch in fremden Wirtszellen mobil, da sie für ihre Transposition neben ihren ITRs und ihrer Transposase keine weiteren speziellen Faktoren der Wirtszelle benötigen. Dadurch können auch beliebige Gene, welche von ITRs flankiert werden, in einer Zelle *trans* von einer Transposase mobilisiert werden (Izsvak 2000; Miskey 2005; Plasterk 1999).



**Abbildung 1.2.1: Struktur eines DNA-Transposons**

Struktur eines DNA-Transposons am Beispiel des Mariner-Elements aus *Drosophila mauritiana*. Modifiziert nach Kazazian (2004).

Die zweite Klasse der DNA-Transposons ist die hAT-Familie, namensgebend für diese Familie sind die Elemente hobo aus *Drosophila*, *activator* aus *Zea mays* und Tam3 aus *Antirrhinum majus*. Die gemeinsamen Merkmale dieser Familie sind zum einen charakteristisch konservierte Sequenzblöcke der Transposase, zum anderen besitzen die ITR-Sequenzen eine gemeinsame Consensussequenz (CAGRGA[...]*TCYCTG*). Alle Transposons dieser Familie erzeugen Zielsequenz-Verdopplungen von 8 bp (Rubin 2001).

### 1.2.3 Retroelemente

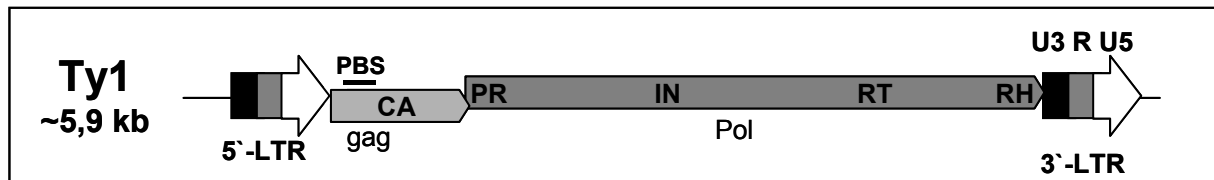
Ein charakteristisches und zugleich das namensgebende Merkmal der meisten Retroelemente ist die Reverse Transkriptase (RT). Zu den Retroelementen gehören die Retrotransposons, die echten und endogenen Retroviren, eine Gruppe von prokaryotischen Insertionssequenzen („multi-copy single-stranded DNA“, msDNA) und Gruppe-II-Introns. Ihre Reversen Transkriptasen zeigen über die gesamte Länge eine Sequenzähnlichkeit, sodass man von einem gemeinsamen Ursprung der RT aller Retroelemente ausgeht (Malik 1999). Alle Retroelemente transponieren nachdem „copy and paste“-Mechanismus. Das bedeutet, dass sie von dem Transkriptions-Mechanismus ihrer Wirtszelle in RNA transkribiert werden. Anschließend wird diese, meistens von ihrer eigenen Reversen Transkriptase, in cDNA umgeschrieben, um an einer neuen Stelle wieder in das Genom integriert zu werden. Durch diesen Mechanismus erhöht sich bei jeder Retrotransposition die Anzahl der Retroelemente einer Zelle. Nur die echten Retroviren sind in der Lage die Wirtszelle zu verlassen. Alle anderen Retroelemente vermehren sich nur innerhalb des Genoms ihrer Wirtszelle (Wilhelm 2001).

Die meisten Retrotransposons lassen sich nach ihrem Transpositionsmechanismus und ihrer Struktur in LTR-Retrotransposons und Non-LTR-Retrotransposons einteilen. Die Non-LTR-Retrotransposons werden in autonome und nicht autonome Retrotransposons eingeteilt (Capy 2005).

#### 1.2.3.1 LTR-Retrotransposons

Die 4-10 kb langen Long terminal repeat (LTR)-Retrotransposons sind eng mit den gut untersuchten Retroviren verwandt und werden in 4 Klassen eingeteilt (Capy 2005). Im Gegensatz zu den Retroviren besitzen sie kein Gen, das für ein Hüll-Protein kodiert und können deshalb ihre Wirtszelle nicht verlassen (Dewannieux 2005). LTR-Retrotransposons werden von zwei langen terminalen Wiederholungseinheiten (LTRs) flankiert, welche 100-500 bp lang sind. Die LTRs haben meistens dieselbe Orientierung (direct repeats, DR), selten weisen sie entgegengesetzte Orientierungen (inverted terminal repeats, ITR) auf. LTRs enden typischerweise mit der Sequenz: 5'-TG[...]CA-3', und werden in die drei Regionen U3, R und U5 unterteilt. Zwischen den beiden LTRs befinden sich ein, meistens aber zwei offene Leserahmen (ORF). Diese überlappen sich oftmals um 10 bp bis 50 bp und sind im Leserahmen zueinander versetzt. Der erste ORF wird mit *gag* bezeichnet und kodiert für strukturelle Capsid- (CA) und Nukleo-

kapsid-Proteine (NA), die analog zu den Retroviren für die Ausbildung der Virus-ähnlichen Partikeln (VLP) zuständig sind. Der zweite ORF wird mit *pol* (Polyprotein) bezeichnet und kodiert für eine Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), Ribonuklease H (RH) und eine Integrase (IN), die für den Replikations-Zyklus der LTR-Retrotransposons essentiell sind. In Abbildung 1.2.2 ist der schematische Aufbau eines LTR-Retrotransposons dargestellt.



**Abbildung 1.2.2: Struktur eines LTR-Transposons**

Struktur eines LTR-Retrotransposons am Beispiel des Ty1-Elementes aus *Saccharomyces cerevisiae*. Modifiziert nach Wilhelm (2005).

Der Pol II-Apparat der Wirtszelle erkennt die LTRs der LTR-Retrotransposons sowohl als Promotor, wie auch als Terminator. Die Transkription beginnt im 5'-LTR an der U3/R-Grenzregion und endet im 3'-LTR an der R/U5-Grenzregion. Die U3-Region ist somit nur einmal am 3'-Ende des Transkripts (unique to the 3'-end), die U5-Region nur einmal am 5'-Ende (unique to the 5'-end), die R-Region (repeated region) ist hingegen zweimal auf dem Transkript vertreten. Letztlich ist somit die Information für ein komplettes LTR-Retrotransposon auf dem Transkript vorhanden. Das Retrotransposon-Transkript ist bifunktional. Zum einen dient die Retrotransposon-RNA in den VLPs als Vorlage für die reverse Transkription, zum anderen dient sie an den Ribosomen für die Translation der *gag*- und *pol*-Proteine. Bei LTR-Retrotransposons, welche zwei oder mehrere ORFs besitzen, wird nur eine bi- bzw. polycistronische mRNA transkribiert.

Die Translation der partiell überlappenden und im Leserahmen meistens um +1 zueinander versetzten ORFs erfolgt zusammen durch einen ribosomalen Frameshift. Das dabei gebildete Polyprotein wird anschließend durch die Protease spezifisch in die einzelnen Proteine gespalten. Für die Ausbildung der VLPs wird im Vergleich zu den enzymatischen Proteinen des ORF2 eine größere Menge der strukturellen ORF1-Proteine benötigt. Der Überschuss an strukturellen Proteinen wird durch den „ribosomalen Frameshift“ gewährleistet, durch welchen nur ca. 5% bis 10% an ORF2-Proteinen translatiert werden (Wilhelm 2005).

Nach erfolgter Translation und Spaltung der Proteine lagern sich diese im Zytoplasma zu den Virus-ähnlichen Partikeln zusammen. In die VLPs werden neben einem oder mehreren Retrotransposon-Transkripten auch einige, für das Retrotransposon spezifische, tRNA-Moleküle, sowie Desoxynukleotide für die Initiation und Durchführung der reversen Transkription eingeschlossen (Haag 2000).

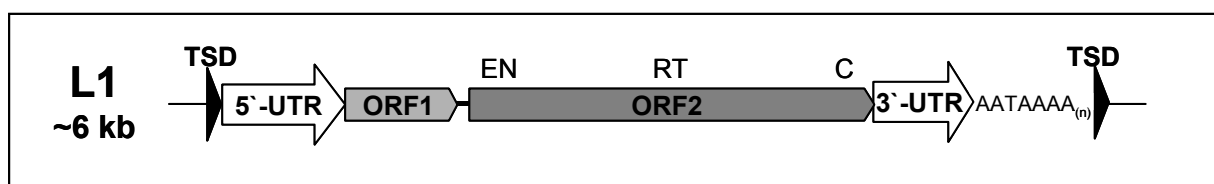
Unterhalb der 5'-LTR der Transposon-RNA befindet sich eine ca. 10 bp lange komplementäre Primer-tRNA-Bindestelle (PBS). An diese bindet ein mit eingeschlossenes tRNA-Molekül und initiiert so die reverse Transkription. Zunächst erfolgt die (-)-Strang-Synthese bis zum 5'-Ende der Retrotransposon-RNA. Daraufhin wird die komplementäre RNA des DNA-RNA-Hybrids durch die RNase H degradiert. Die frei gewordene cDNA der R-Region bindet nun an die 3'-terminale R-Region, sodass die reverse Transkription über die gesamte Länge bis zur PBS vervollständigt werden kann. Anschließend wird die restliche RNA durch die RNase H entfernt, jedoch wird eine bestimmte, meistens acht bp lange Region der Retrotransposon-RNA oberhalb des 3'-LTR, die sogenannte Poly-Purin-Region (PPT), von der RNase H nicht degradiert. Das gebundene RNA-Fragment dient zur Initiation der (+)-Strang-Synthese, welche zunächst bis an die cDNA gebundene tRNA heranreicht und die zur PBS komplementäre Region der tRNA noch als „Template“ nutzt ((+)-Strang-„Strong-Stopp“-DNA). Anschließend wird die tRNA durch die RNase H eliminiert, sodass die freigewordene 3'-terminale PBS-Region des (+)-Stranges an die komplementäre PBS-Region an dem 3'-Ende des (-)-Stranges binden kann. Somit kann die Synthese des (+)-Stranges und damit des Retrotransposon-Doppelstranges vervollständigt werden (Wilhelm 2001).

Anschließend lösen sich die VLPs auf und es bildet sich vermutlich ein Präintegrationskomplex (PIC), der zumindest aus der Retrotransposon-DNA und der Integrase besteht, aber klein genug ist, um in den Zellkern einzudringen (Kenna 1998). Einige LTR-Retrotransposons, wie die Ty-Elemente in *Saccharomyces cerevisiae*, besitzen eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und können so aktiv in den Zellkern gelangen. Elemente, die diese NLS nicht besitzen, können nur während der Öffnung der Zellkernmembran in der Mitose in den Nukleus gelangen (Kenna 1998). Die Integrase generiert einen meist versetzten Doppelstrangbruch in der Zielsequenz und integriert dort die Retrotransposon-DNA (Kenna 1998). DNA-Reparaturmechanismen füllen den versetzten Schnitt in der DNA komplementär auf und erzeugen so die TSDs.

Solo-LTRs sind häufig beobachtete, einzelne LTR-Sequenzen im Genom, die vermutlich aus vollständigen LTR-Retrotransposons durch homologe Rekombination zwischen den LTRs eines Elementes oder zwischen den LTRs verschiedener Elemente hervorgehen. Bei der Rekombination zwischen den LTRs verschiedener Elemente wird das komplette Erbmateriale, das zwischen den Elementen lag, deletiert. Auf diese Art können Genome durch Transposoneinwirkung schrumpfen und die Anzahl aktiver Transposons im Genom konstant gehalten werden (Vitte 2005).

### 1.2.3.2 Non-LTR-Retrotransposons

Die 4-7 kb langen Non-LTR-Retrotransposons sind die größte Gruppe der eukaryotischen Transposons und stammen evolutionär vermutlich von den prokaryotischen Group II-Introns ab (Malik 1999). Sie stellen bezüglich ihres strukturellen Aufbaus eine nicht so einheitliche Gruppe wie die LTR-Retrotransposons dar und werden aufgrund von phylogenetischen Berechnungen ihrer RT-Domänen in zwölf Klassen eingeteilt (Malik 2000). Die Non-LTR-Retrotransposons der Säuger werden als LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) bezeichnet. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das humane L1-Element, welches in ca. 516.000 Kopien im humanen Genom vorkommt und so ca. 17% des humanen Genoms ausmacht (Lander 2001). Von den ca. 500.000 L1-Elementen sind fast alle durch Verkürzungen oder Mutationen inaktiviert worden, sodass es nur etwa 80-100 aktive L1-Elemente im humanen Genom gibt (Boissinot 2005). Die Non-LTR-Retrotransposons sind bisher erheblich weniger erforscht, als die LTR-Retrotransposons (Goodier 2004). Sie besitzen ebenfalls einen oder meist zwei offene Leserahmen und haben entsprechend ihrem Namen keine langen terminalen Wiederholungseinheiten. Ähnlich wie bei den LTR-Retrotransposons, kodiert auch bei den Non-LTR-Retrotransposons der ORF2 für enzymatische Proteine, die zur Transposition notwendig sind. Die genaue Funktion der ORF1 Proteine ist noch nicht bekannt. Sie können Di- oder Multimere bilden und binden an RNA, wobei noch nicht geklärt ist, ob sie nur an spezifische RNAs oder unspezifisch an die RNA binden. Es wurde gezeigt, dass ORF1 Proteine als DNA-Chaperone dienen können und notwendig für die Retrotransposition der Non-LTR-Retrotransposons sind (Kulpa 2005).



**Abbildung 1.2.3: Struktur eines Non-LTR-Retrotransposons**

Struktur eines Non-LTR-Retrotransposons am Beispiel des humanen L1-Elementes. Modifiziert nach Kazazian (2004).

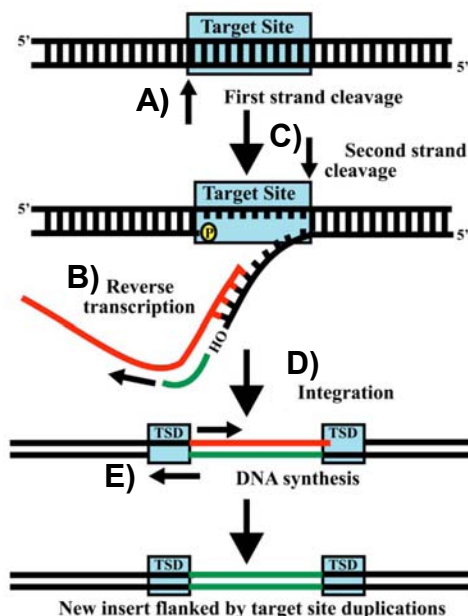
Die beiden ORFs werden von unterschiedlich langen Bereichen flankiert, welche als nicht translatierte Regionen (UTRs) bezeichnet werden. Die 5'-UTR besitzt in der Regel Promotoraktivität für die Pol II-Polymerase, während die 3'-UTR sowohl ein Terminations-signal, wie auch ein Polyadenylierungssignal und einen homopolymeren oder zumindest adenosinreichen poly(A)-Anhang am 3'-Ende besitzt. (Deininger 2002; Ostertag 2001a).

Die Promotoren dieser Elemente sind in der Regel relativ schwach, können aber gewebe-spezifisch oder durch flankierende Sequenzen angeregt werden (Deininger 2002). Diese

Promotoren sind im Gegensatz zu normalen Pol II-Promotoren, ähnlich wie Pol III Promotoren, interne Promotoren (Geiduschek 2001). Das bedeutet, dass ihre Transkripte oberhalb ihrer eigenen Lage beginnen und sie so selbst zusammen mit dem Retrotransposon transkribiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Non-LTR-Retrotransposons von einer Art Hybrid-Transkriptionssystem transkribiert werden, welches sich aus den Transkriptionsmechanismen der Pol II und der Pol III zusammensetzt (Deininger 2002).

Bei den meisten Non-LTR-Retrotransposons erfolgt die Translation der beiden ORFs auf der bicistronischen RNA wahrscheinlich unabhängig voneinander durch eine interne Initiation und nicht wie bei den LTR-Retrotransposons durch einen ribosomalen Frameshift (Ostertag 2001a). Durch die nicht sehr effektive interne Initiation wird, ähnlich wie bei den LTR-Retrotransposons, viel mehr ORF1 Protein als ORF2 Protein gebildet.

Nach erfolgter Translation und posttranslationaler Modifikation kommt es durch Zusammenlagerung der Retrotransposon-RNA mit den ORF1- und ORF2-Proteinen zur Ausbildung von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) (Kulpa 2005). Die EN-Domäne vieler Non-LTR-Retrotransposons besitzt eine Kernlokalisierungsdomäne (NLS), welche die RNPs in den Zellkern wandern lässt. Dort binden zuerst die RNPs an die Ziel-DNA, wo die Endonuklease einen Schnitt in den (-)-Strang einfügt. An dieser Stelle lagert sich die Retrotransposon-RNA mit ihrem 3'-Poly-A-Ende komplementär zu einigen wenigen Basen an. Die Reverse Transkriptase nutzt die frei gewordene 3'-Hydroxylgruppe der Ziel-DNA zur Initiation der reversen Transkription der Retrotransposon-RNA.



**Abbildung 1.2.4: TPRT Modell**

Target primed reverse transcription Modell **A)** Die EN trennt den (-)-Strang der Ziel-DNA auf und erzeugt ein freies 3-hydroxyl (OH) Ende, **B)** das 3'-Ende der Retrotransposon RNA lagert sich an die freie DNA an und die RT nutzt das freie 3'-OH Ende der DNA als Primer für die Retrotransposition, **C)** die EN schneidet den (+)-Strang der Ziel-DNA versetzt zu dem ersten Schnitt auf, **D)** die cDNA integriert durch einem unbekannten Mechanismus, **E)** die Retrotransposon-RNA wird entfernt und durch DNA komplementär ersetzt. Durch komplementäres Auffüllen des versetzten Schnittes der EN entsteht eine TSD. Die RNA ist rot dargestellt, die DNA grün (Ostertag 2001a).

Da die Initiation der reversen Transkription durch die Ziel-DNA selbst erfolgt, wird dieser Mechanismus „TPRT-Mechanismus“ (target primed reverse transcription) genannt (Ostertag 2001a). Dieser Mechanismus ist in Abbildung 1.2.4 schematisch dargestellt.

Der Schnitt des (+)-Strangs der Ziel-DNA erfolgt meistens unterhalb des (-)-Strang-Schnitts, wodurch die für die meisten Non-LTR-Retrotransposons charakteristischen Zielsequenz-Verdopplungen von zwei bis zu mehreren hundert Basen erzeugen (Gilbert 2002; 2005). Der genaue Mechanismus der Verknüpfung des 5'-Endes des revers transkribierten DNA-Einzelstranges mit der Ziel-DNA ist noch nicht verstanden (Gilbert 2005; Zingler 2005). Im Gegensatz zu den LTR-Retrotransposons erfolgt die reverse Transkription der Non-LTR-Retrotransposons also erst direkt an der Ziel-DNA im Zellkern. Oftmals findet keine vollständige reverse Transkription bis zum 5'-Ende des Elementes statt, in dem Fall wird dann ein für Non-LTR-Retrotransposons typisches 5'-verkürztes Transposon integriert (Dewannieux 2005). Diese verkürzten Transposons sind „dead by arrival“, da sie ihren Promotor verloren haben.

### ***trans* und *cis* Mobilisierung**

In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Non-LTR-Retrotransposons auch *in trans* (von Proteinen anderer Elemente des gleichen Typs) mobilisiert werden können, wobei diese Mobilisierung viel schwächer ist als eine Mobilisierung *in cis* (durch ihre eigenen Proteine). Die starke Präferenz für eine Mobilisierung *in cis* kann über zwei Mechanismen erklärt werden. Zum einen können die neu gebildeten Retrotransposon-Proteine noch während ihrer Translation an ihre eigene RNA binden und fremde Proteine so nicht die Möglichkeit haben an diese RNA zu binden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass diese Proteine, ohne an eine RNA gebunden zu sein, sehr instabil sind und zerfallen, bevor sie an eine fremde RNA binden können (Kajikawa 2002; Wei 2001).

### **1.2.3.3 Nicht autonome Retrotransposons**

Non-LTR-Retrotransposons lassen sich in autonome und nicht autonome Retrotransposons einteilen. Die nicht-autonomen Retrotransposons besitzen im Gegensatz zu den autonomen Retrotransposons keine oder nicht alle notwendigen Protein-kodierenden DNA-Sequenzen. Die meisten dieser nicht autonomen Retrotransposons gehören zu der SINE-Familie (Short Interspersed Nuclear Elements).

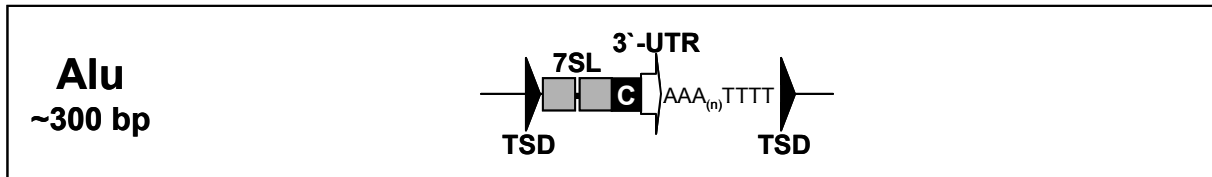
SINEs kommen in nahezu allen lebenden Organismen vor. Der bekannteste Vertreter ist das Alu-Element, das in ca. 1 Millionen Kopien im humanen Genom vertreten ist und so ca. 10,6% des humanen Genoms ausmacht (Lander 2001). Aktuell ist aber nur noch eine humane Alu-Familie, zu der nur ca. 0,5% der humanen Alu-Elemente gehören, aktiv (Deininger 2002).

SINEs sind in der Regel 80 bp bis 400 bp lang. Sie bestehen auf der 5'-Seite aus Derivaten von Pol III-Genen (in der Regel tRNA-Gene oder 7SL-RNA-Gene) während ihre



3'-Enden aus den 3'-Enden von Non-LTR-Retrotransposons bestehen. Der Ursprung der Kernsequenzen der SINEs ist noch nicht bekannt (Ohshima 2005).

Die SINE-Elemente behalten die Sekundär- und Tertiärstruktur ihrer ursprünglichen Pol III-Gene am 5'-Ende bei und werden von deren Pol III-Promotoren mit Hilfe des zellulären Polymerase III-Apparates transkribiert (Dewannieux 2003; Kajikawa 2002).



**Abbildung 1.2.5: Struktur eines SINE Elementes**

Struktur eines SINE-Elementes am Beispiel des humanen Alu-Elementes. Modifiziert nach Dewannieux (2003)

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die SINEs, welche ähnliche Retrotranspositions-Merkmale wie die LINE-Elemente aufweisen, von diesen Elementen über ihre 3'-Enden erkannt und mobilisiert werden (Dewannieux 2003; Kajikawa 2002). Beachtenswert ist dabei jedoch, dass zumindest die Alu-Elemente, welche am 5'-Ende aus einem Derivat eines 7SL-RNA-Gens bestehen, nicht auf die ORF1-Proteine der LINE-Elemente angewiesen sind. Während diese Proteine bei den LINE-Elementen essentiell sind um die RNPs zu bilden und so zu den Ribosomen zu gelangen, bindet der 7SL-RNA-Gen-ähnliche Teil der Alu-Elemente zelluläre SRP9/14-Proteine, welche die Funktion der LINE-ORF1-Proteine übernehmen. Da auf diese Art die Alu-Elemente auch von den vielen 5'-verkürzten oder mutierten L1-Elementen mobilisiert werden können, lässt sich so erklären, warum sich die Alu-Elemente noch stärker als die L1-Elemente vermehren konnten, obwohl sie von denen *in trans* mobilisiert werden müssen (Dewannieux 2003). Bei SINE-Elementen, die am 5'-Ende aus einem tRNA-Gen bestehen, wird vermutet, dass diese entweder über ihre tRNA-Gen-ähnliche Tertiärstruktur direkt an die Ribosomen binden können, oder dass die Reverse Transkriptase der LINE-Elemente eine besonders hohe Affinität für die tRNA-Gen-ähnliche Tertiärstruktur dieser SINEs hat. Dadurch könnte die schwache Mobilisierung *in trans* erhöht werden (Kajikawa 2002).

### 1.2.3.4 Prozessierte Pseudogene

Neben den nicht autonomen Retrotransposons können manche Retransposon-kodierte Proteine auch zelluläre mRNAs über ihre 3'-Poly-A-Enden erkennen und mobilisieren. Die so erzeugten prozessierten Pseudogene werden wie die Non-LTR-Retrotransposons von Target-Site-Duplikationen flankiert und besitzen keine Introns. Da auf den zellulären mRNAs die Promotoren nicht mit kodiert sind, werden die prozessierten Pseudogene nur funktionell transkribiert wenn sie zufällig unterhalb eines Promotors in das Genom integriert wurden. Da die allermeisten prozessierten Pseudogenen keinem Selektionsdruck unterliegen, haben sie einige Mutationen akkumuliert und kodieren so nicht mehr für intakte Proteine (Dewannieux 2005). In dem humanen Genom gibt es ca. 10.000-20.000 prozessierte Pseudogene (Deininger 2002).

### 1.2.4 Spezifische Integrationen mobiler Elemente

Während bei Retroviren eine Präferenz zu erkennen ist, in stark transkribierte Pol II-Gene oder deren Promotorregionen zu integrieren (Wu 2003), weisen einige Retrotransposons Präferenzen für Bereiche des Genoms ihrer Wirtszellen auf, in denen sie durch ihre Integration keinen Schaden anrichten. Viele mobile Elemente integrieren bevorzugt an Stellen, an denen sich schon andere Elemente befinden und bilden so Transposoncluster (Eichinger 2005; Kazazian 2004). Von den LTR-Retrotransposons integrieren die Tf-Elemente aus *Schizosaccharomyces pombe* bevorzugt in Cluster ca. 100-400 bp oberhalb von Pol II-Genen. Die verschiedenen Ty-Elemente der *Saccharomyces cerevisiae* haben unterschiedliche Integrationspräferenzen entwickelt. Die meisten Ty3-Elemente integrieren wenige bp entfernt von Pol III-Transkriptionsstarts, während ca. 90% der Ty1-Elemente ca. 75-700 bp oberhalb von Pol III-Genen integrieren. 95% aller Ty5-Elemente sind im Heterochromatin der Telomere und in „silent Chromatin“ Bereichen gefunden worden (Bachman 2004; Kazazian 2004). Da die Ty1-Elemente enger mit den Ty5s verwandt sind als mit den Ty3s, muß sich die Integrationspezifität für tRNA-Gene zweimal in der Hefe entwickelt haben (Xie 2001). Für Ty3-Elemente konnte gezeigt werden, dass die Positionsspezifität durch Interaktionen der Präintegrationskomplexe (PIC) mit den Proteinuntereinheiten TBP und Brf des Pol III-Transkriptionsfaktors TFIIIB zustande kommt (Yieh 2002). Für Ty5 konnte gezeigt werden, dass die gerichtete Integration über eine Protein-Interaktion zwischen der Integrase des Elementes und dem SIR4-Protein vermittelt wird (Zhu 2003).

Die Non-LTR-Retrotransposons des Typs R1 und R2 von *Drosophila melanogaster* und *Bombyx mori* integrieren sequenzspezifisch in 28S-rRNA-Gene, während heT-A und TART, bzw. TRAS1 und SART1 in die Telomerbereiche von *D. melanogaster* und *B. mori* integrieren und so helfen diese aufrecht zu erhalten (Pardue 2005).

Die humanen L1-Elemente integrieren relativ spezifisch in die kurze Sequenzfolge 5'-TTTT/A-3' (Kazazian 2004). Da solche Zielsequenzen im humanen Genom sehr zahlreich sind, schützt diese "Pseudo-Spezifität" die Wirtszelle aber nicht vor Integrationen in wichtige Gene (Kazazian 1998; Wheelan 2005).

In dem extrem dicht gepackten Genom von *Dictyostelium discoideum* besitzen die Transposons zwei unterschiedliche Integrationsstrategien, um keine kodierenden Regionen zu treffen. Während die Elemente der TRE- und DGLT-A-Familien ausschließlich in der Umgebung von tRNA-Genen integrieren, integrieren die restlichen Transposons in der Regel in vorhandene Transposoncluster. DGLT-A-Elemente integrieren 10-30 bp oberhalb von tRNA-Genen. TRE5-Elemente integrieren immer 44-54 bp oberhalb und in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung der tRNA-Gene, während TRE3-Elemente immer 40-150 bp unterhalb der tRNA-Gene in der gleichen Transkriptionsorientierung integrieren. Die Integrationsspezifität der TRE-Elemente wird wahrscheinlich ähnlich wie bei den Ty1-Elementen in *S. cerevisiae* über eine Proteininteraktion der Pol III-Transkriptionsfaktoren und den Transposonproteinen hergestellt (Bachman 2004; Winckler 2005a).

tRNA-Gene bzw. Pol III-Gene sind ideale Integrationsorte für mobile Elemente, da sie ubiquitär in vielen Kopien im Genom verteilt sind und von der Pol III mit ihrem unigen Transkriptionsapparat abgelesen werden (Winckler 2005a). Da die Pol III und die Pol II sich gegenseitig zu behindern scheinen, gibt es in der Umgebung von Pol III-Genen keine proteinkodierenden Gene (Bolton 2003). Diese Regionen können also als „sichere Bereiche“ für Integrationen angesehen werden.

Allgemein kann festgestellt werden, dass mit zunehmender Dichte des Genoms der genomische Anteil an Transposons abnimmt und die Integrationsspezifität der Transposons ausgeprägter ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier die Wahrscheinlichkeit kodierende oder regulierende DNA-Abschnitte zu treffen besonders hoch ist (Boeke 1998). So besitzen Organismen mit einer hohen genetischen Dichte häufig Transposons mit einer starken Integrationspräferenz (Boeke 1998; Eichinger 2005).

## 1.2.5 Auffinden von *de novo*-Integrationen

### 1.2.5.1 Retrotranspositions-Testsystem ("TRE-Falle")

In einer vorausgegangenen Arbeit wurde ein *in vivo* Retrotranspositions-Testsystem für *de novo*-Integrationen in *Dictyostelium discoideum* entwickelt (Beck 2002). Diese TRE-Falle beruht auf einer Selektion von *Dictyostelium*-Zellen, in denen eine Integration in der Umgebung eines Köder-tRNA-Gens stattfand. Die Selektion erfolgt aufgrund der Resistenz von *Dictyostelium*-Zellen mit einem defektem UMP-Synthase-Gen (*pyr5-6*) gegen das Zytostatikum 5-F-Orotat (5-FO). Die UMP-Synthase wandelt Orotsäure in Uridin-Monophosphat (UMP), welches eine Vorstufe zu dTTP ist, um. UMP-Synthase exprimierende Zellen (*ura*<sup>+</sup>-Zellen) wandeln entsprechend dem Orotat auch das Analogon 5-F-Orotat zu giftigem 5-F-UMP um. 5-F-UMP ist ein irreversibler Inhibitor der Thymidylat-Synthase, welche dUMP durch Methylierung in dTMP umwandelt. Durch die Hemmung der Thymidylat-Synthase ist die DNA-Biosynthese und damit auch das Wachstum der Zellen gehemmt. *Ura*<sup>+</sup>-Zellen sterben somit nach 2 bis 3 Wochen in 5-FO-haltigem Medium ab. *Ura*<sup>-</sup>-Zellen sind dagegen nicht in der Lage Orotat in UMP umzuwandeln und damit auch nicht in der Lage aus 5-FO giftiges 5-F-UMP herzustellen. Sie können aber über den „salvage-pathway“ Uracil zu UMP metabolisieren, um die Bildung des DNA-Bausteins dTTP aufrecht zu erhalten. *Ura*<sup>-</sup>-Zellen können daher in 5-FO-haltigem Medium durch den Zusatz von Uracil wachsen (Beck 2002; Kalpaxis 1991, vgl. 3.1).

DH1-Zellen sind *Dictyostelium discoideum* AX3-Zellen, denen das komplette UMP-Synthase-Gen entfernt wurde (Caterina 1994). Für die TRE-Falle wird diesen Zellen ein Konstrukt stabil ins Genom integriert, in dem in das UMPS-Gen das Intron des *cbfA*-Gens eingesetzt wurde. In diesem Intron befindet sich wiederum ein Köder-tRNA-Gen. Als Köder-Sequenz wurde nur die kodierende Region des Val<sup>UAC</sup>-Gens gewählt. Diese ist mit 74 bp klein genug, dass das Intron mit dem tRNA-Gen funktionell aus dem UMPS-Gen heraus gespleißt werden kann. DH1-Zellen mit einer integrierten TRE-Falle besitzen daher einen *Ura*<sup>+</sup>-Phänotyp.

Sobald es in einer solchen Zelle zu einer Integration eines Transposons in der Umgebung des Köder-tRNA-Gens kommt, ist die Zelle nicht mehr zur Expression funktioneller UMP-Synthase in der Lage (*ura*<sup>-</sup>-Zelle). Dies kann entweder dadurch geschehen, dass das UMPS-Gen durch integrierte Polyadenylierungs-Sequenzen nicht mehr vollständig transkribiert wird oder dass das Intron aufgrund seiner abnormen Größe und der Bildung alternativer Spleißstellen nicht mehr oder nur fehlerhaft aus der Vorläufer-mRNA gespleißt wird.

Die Zelle kann somit während einer 5-FO-Selektion in 5-FO- und uracilhaltigem Medium wachsen und nach mehreren Zellteilungen einen sichtbaren Klon bilden.

Durch PCRs, Southernblots und Sequenzierung kann die Art, Größe und die TSDs des integrierten Transposons bestimmt werden. Es wurden bisher 51 5-FO-resistente Klone untersucht. Bei 49 konnte eine Integration eines TRE5-A-Retrotransposons positions- und orientierungsspezifisch vor dem Val<sup>UAC</sup>-Gen gefunden werden. Die 5-FO-Resistenz der beiden restlichen Klone beruhte auf einer natürlichen Mutation im UMPS-Gen (Beck 2002).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Retrotransposon TRE5-A in *Dictyostelium discoideum* noch aktiv ist, und dass die kodierende Region des Val<sup>UAC</sup>-Gens von den TRE5-A-Elementen als Integrationsziel erkannt wird.

### 1.2.5.2 Markierte, klonierte Retrotransposons

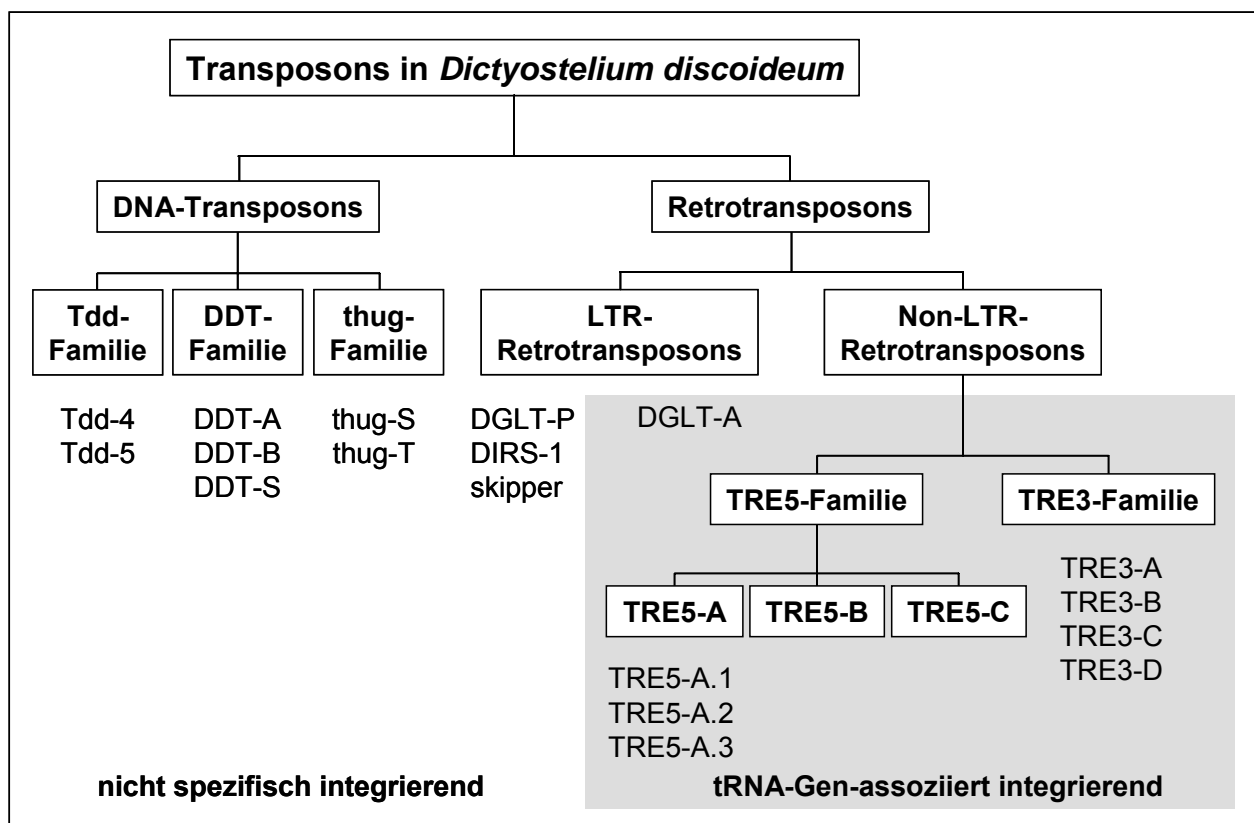
Ein weiteres System zur Untersuchung von *de novo*-Integrationen von Retrotransposons in verschiedenen Zelltypen ist für ein humanes L1-Retrotransposon in HeLa-Zellen entwickelt worden (Moran 1996).

Bei diesem System wird die reverse Transkription genutzt, um resistente Zellen, in denen ein Retrotranspositionereignis stattgefunden hat, zu erzeugen. Dazu wurde in die 3'-UTR eines L1-Elementes eine Neomycin-Expressionskassette in umgekehrter Orientierung eingesetzt. In dieser Neo-Kassette befindet sich wiederum in umgekehrter Orientierung ein Intron, sodass das Neo-Gen nicht funktionell exprimiert werden kann und keine Resistenz erzeugen kann. Das Intron befindet sich in Orientierung des L1-Elementes und wird, nachdem das artifizielle L1-Element transkribiert wird, wieder herausgespleißt. Sobald dieses Element in das Genom der HeLa-Zellen integriert wird, kann das Neo-Gen funktionell exprimiert werden und G418-Resistenz erzeugen (vgl. 3.2).

Dieses artifizielle L1-Element wurde in einen Expressionsvektor, der nach der Transfektion eine Hygromycin-Resistenz vermittelt und in moderater Kopienzahl extrachromosomal als Episom im Zellkern vorliegt, kloniert. Zuerst wurde mit Hygromycin auf transformierte HeLa-Zellen selektioniert, die das Episom besitzen. Anschließend wurde mit G418 auf die Zellen selektioniert, bei denen das artifizielle L1-Element in das Genom integriert wurde. Um vier Integrationsereignisse dokumentieren zu können, wurden ca. 200.000-800.000 genomische Fragmente dieser Zellen kloniert und mehrmals radioaktiv gescreent (Moran 1996). Später wurde diese Methode weiterentwickelt und die Integrationsorte mit Hilfe der inversen PCR (iPCR) bestimmt (Wei 2001).

## 1.3 Transposons in *Dictyostelium discoideum*

Das Genom von *Dictyostelium discoideum* besteht trotz seiner extremen Dichte zu 9,6% aus transposablen Elementen. Von den 9,6% Transposons im *Dictyostelium*-Genom entfallen ca. 1,5% auf DNA-Transposons und ca. 8,1% auf Retrotransposons. Insgesamt enthält das *Dictyostelium*-Genom 18 verschiedene Transposon-Arten, welche in sieben Familien gegliedert werden können. Ein Überblick der Transposablen Elemente in *D. discoideum* ist in Abbildung 1.3.1 dargestellt. Die Transposons sind äußerst inhomogen im Genom verteilt. Die meisten Transposons befindet sich in Clustern, welche bevorzugt in der Nähe von tRNA-Genen oder den Centromeren zu finden sind (Winckler 2005a). Da das fertige *Dictyostelium*-Genomprojekt Lücken in einigen Transposonclustern aufweist, ist es möglich, dass nicht alle Kopien der Transposons gefunden werden konnten (Eichinger 2005).



**Abbildung 1.3.1: Transposons in *Dictyostelium discoideum***  
Schematischer Überblick der transposablen Elemente in *Dictyostelium discoideum*

### 1.3.1 DNA-Transposons

Im Genom von *Dictyostelium discoideum* sind keine DNA-Transposons gefunden worden, welche eine Verwandtschaft zu anderen DNA-Transposons aufweisen. Es wurden aber drei Familien entdeckt, welche vermutlich zu den DNA-Transposons gehören. Diese Transposons besitzen außer der Eigenschaft, bevorzugt in Transposoncluster zu integrieren, keine besondere eigene Integrationsspezifität (Winckler 2005a).

#### 1.3.1.1 Tdd-Familie

Das *Dictyostelium*-Genom beherbergt ca. 40 Kopien des aktiven mutmaßlichen DNA-Transposons Tdd-4. Diese Elemente sind 3,8 kb lang, werden von zwei ca. 145 bp langen fast identischen ITRs flankiert und erzeugen TSDs mit einer Länge von 5 bp. Die kodierende Sequenz der Tdd-4-Transposons ist durch sechs Introns unterbrochen.

Im Laufe der Sequenzierung des *Dictyostelium*-Genoms wurden die Elemente der Tdd-5-Familie entdeckt. Im Vergleich zu den Tdd-4-Elementen fehlen ihnen die letzten beiden Introns. Die Übereinstimmung der Proteinsequenz beträgt 39%. Im Genom von AX4 sind nur fünf Kopien von Tdd-5-Elementen gefunden worden, die aufgrund von Mutationen und ihrer geringen Kopienzahl nicht komplett assembliert werden konnten (Glöckner 2001; Winckler 2005a).

Verwandtschaftsuntersuchungen der kodierenden Regionen zeigen nähere Verwandtschaft der Tdd-Elemente zu Retrotransposons als zu bekannten DNA-Transposons oder anderen Proteinen. Das Fehlen der hinteren beiden Introns der Tdd-5-Elemente im Vergleich zu den Tdd-4-Elementen lässt vermuten, dass eine reverse Transkription eine Rolle bei der Amplifikation dieser Elemente spielt. Mehrere Eigenschaften, wie das Vorhandensein von Introns, die ITRs und Länge der TSDs weisen darauf hin, dass es sich bei den Elementen der Tdd-4-Familie um DNA-Transposons handelt, welche im Laufe der Evolution eine Integrasedomäne eines LTR-Transposons durch horizontalen Gentransfer zugewonnen haben. Diese Elemente stellen evtl. einen „missing link“ zwischen DNA- und Retrotransposons dar (Winckler 2002; 2005a).

#### 1.3.1.2 DDT-Elemente

Die 5,2, bzw. 5,5 kb langen DDT-Elemente repräsentieren eine neue Klasse von vermutlichen DNA-Transposons, dessen Proteine keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen aufweisen und welche von 2 bp langen TSDs flankiert werden. Die je 20 Kopien der

DDT-A und DDT-B-Elemente bestehen aus 39 bp langen identischen ITRs und besitzen je zwei ORFs. Die Translation von ORF1 wird durch ein Polyadenylierungssignal kurz vor dem ATG von ORF2, welcher durch zwei Introns unterbrochen ist, terminiert. Dies deutet darauf hin, dass die DDT-Proteine von einer bicistronischen RNA translatiert werden.

Das 758 bp lange DDT-S Element ist ein nicht autonomes Derivat, welches in 130 Kopien im *Dictyostelium*-Genom vorkommt und wahrscheinlich durch Rekombination aus einem DDT-A oder DDT-B-Element entstanden ist und vermutlich durch DDT-A und DDT-B-Elemente *in trans* mobilisiert wird (Glöckner 2001; Winckler 2005a).

### 1.3.1.3 Thug-Elemente

Die Transposons thug-S und thug-T, welche in jeweils ca. 10 Kopien im *Dictyostelium*-Genom vorkommen, besitzen keine kodierende DNA-Sequenzen. Sie haben eine Länge von ca. 2,2 bzw. 1,1 kb, enthalten 18 bzw. 8 bp lange ITRs und sind von 4 bp langen TSDs flankiert. Obwohl die thug-Transposons keine Ähnlichkeit zu anderen Transposons in *D. discoideum* aufweisen, könnten sie durch Proteine anderer Transposons *in trans* mobilisiert werden (Winckler 2005a).

## 1.3.2 LTR-Retrotransposons

Auch die meisten Integrationen von LTR-Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum* befinden sich in Transposonclustern.

### 1.3.2.1 DIRS1

DIRS1-Elemente sind mit 235 Kopien, von welchen die meisten aufgrund von Retrotransposon-internen Rekombinationen defekt und somit nicht autonom sind, die erfolgreichsten Transposons in *D. discoideum* (Glöckner 2001). Komplette DIRS1-Elemente sind 4,8 kb lang und besitzen zwei sich partiell überlappende ORFs sowie einen in ORF2 eingebetteten ORF3, welcher für eine RT/RNaseH-Domäne kodiert. Sie haben nicht-identische LTRs, welche nicht mit der typischen Sequenz 5'-TG[...]CA-3' enden und entgegengesetzt orientiert sind. Es wird vermutet, dass sich DIRS1-Elemente nicht durch den typischen LTR-Retrotranspositions-Mechanismus vermehren, sondern geschlossene Doppelstrang-DNA Intermediate bilden (Winckler 2005a). Dieser Mechanismus wurde für das Kangaroo-Retrotransposon in *Volvox carteri* nachgewiesen, welches



eng mit den DIRS-Elementen verwandt ist (Poulter 2005). Zusammen mit einigen anderen Retroelementen bilden sie die DIRS-Gruppe innerhalb der LTR-Retrotransposons (Poulter 2005).

DIRS1-Elemente haben eine starke Präferenz in andere DIRS-Elemente zu integrieren und bilden so große Cluster, die hauptsächlich in der Nähe der Centromere zu finden sind. Wahrscheinlich werden die *Dictyostelium*-Centromere aus Clustern von DIRS-Elemente gebildet (Eichinger 2005).

### 1.3.2.2 Skipper

Die ca. 7 kb langen Skipper-Elemente gehören zu der Ty3/gypsy-Familie. Trotz ihrer starken Expression in wachsenden *D. discoideum* Zellen, gibt es nur ca. 60 Kopien im Genom. Skipper-Elemente besitzen zwei 390 bp lange LTRs und zwei im Leserahmen versetzte ORFs, die für die typischen Proteine der Ty3/gypsy-Familie kodieren. Die Domänen auf den ORFs sind im Vergleich zu den anderen Elementen der Ty3/gypsy-Familie untypisch angeordnet (Glöckner 2001; Winckler 2005a).

### 1.3.2.3 DGLT

Die DGLT-Retrotransposons in *D. discoideum* gehören zu der Ty3/gypsy-Familie der LTR-Transposons (Glöckner 2001).

#### DGLT-A

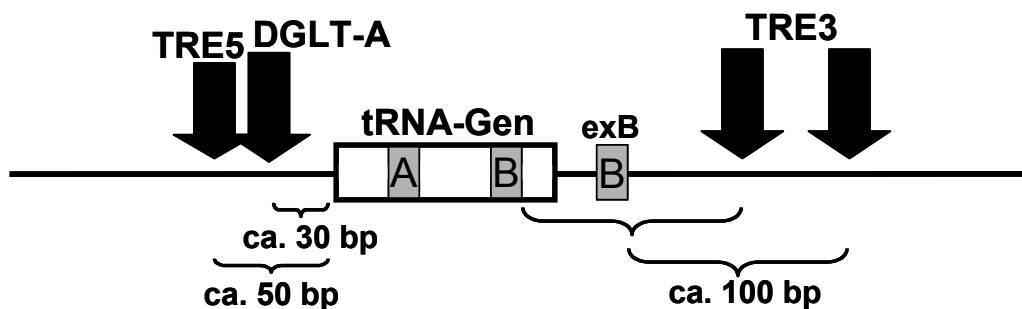
DGLT-A Elemente wurden erst durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt entdeckt. Sie sind ca. 5 kb lang, besitzen einen ORF, werden von zwei entgegengesetzten 260 bp langen LTRs flankiert und erzeugen TSDs von 4 oder 5 bp Länge. DGLT-A Elemente integrieren immer 10-30 bp oberhalb von tRNA-Genen. Im *Dictyostelium*-Genom befinden sich nur fünf komplette DGLT-A-Kopien, welche alle durch Mutationen inaktiv sind. Zusätzlich befinden sich 15 Solo-LTR-Kopien dieses Elements im Genom. Diese wurden vor den DGLT-A-Elementen entdeckt und als H3R bezeichnet (Glöckner 2001; Winckler 2005a).

#### DGLT-B

DGLT-B-Elemente sind 6,2 kb lang, werden von zwei 208 bp langen identischen LTRs flankiert und erzeugen TSDs von 4 bp Länge. Im Gegensatz zu DGLT-A-Elementen besitzen sie keine Integrationsspezifität für tRNA-Gene. Diese Elemente besitzen wahrscheinlich 4 ORFs, was aber nicht genau zu erkennen ist, da es nur ca. zehn Kopien im Genom gibt, die alle mehr oder weniger stark degradiert sind (Winckler 2005a).

### 1.3.3 Non-LTR-Retrotransposons

Alle Non-LTR-Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum* befinden sich in der Nähe von tRNA-Genen. Deshalb wurde für diese Retrotransposons die systematische Nomenklatur der TRE-Retrotransposons (tRNA-gene-targeted retrotransposable elements) eingeführt (Szafranski 1999). Die TRE Elemente werden nach ihrer Integrationspezifität in TRE3- und TRE5-Elemente eingeteilt. TRE3-Elemente integrieren auf der 3'-Seite der tRNA-Gene in einem Abstand von ca. 100 bp hinter der internen B-Box des tRNA-Gens oder bei tRNA-Genen, die eine externe B-Box besitzen auch in einem Abstand von ca. 100 bp hinter der externen B-Box. Die TRE5-Elemente integrieren auf der 5'-Seite ca. 50 bp vor den tRNA-Genen. Alle TREs integrieren orientierungsspezifisch mit ihrem 5'-Ende in Richtung der tRNA-Gene. Es konnte weder eine Spezifität der TREs für bestimmte tRNA-Gene noch für „leere“ tRNA-Gene (tRNA-Gene, die noch nicht mit einem TRE assoziiert sind) beobachtet werden (Winckler 2005a).



**Abbildung 1.3.2: Integrationsorte der tRNA-assoziierten Transposons**

Schematische Darstellung der Integrationsorte der tRNA-assoziierten Transposons in *D. discoideum*. Modifiziert nach Winckler (2005a).

Für die spezifisch in der Nähe von tRNA-Genen integrierenden Ty1- und Ty3-Elemente in *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Integrationspezifität über Interaktionen von Transposon-Proteinen und Pol III-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Für die TRE-Elemente in *Dictyostelium discoideum* wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet (Bachman 2004; Winckler 2005a).

#### 1.3.3.1 TRE5-Gruppe

Die TRE5-Elemente gehören zu der L1-Klade der Non-LTR-Retrotransposons (Ohshima 2005). Alle bisher gefundenen TRE5-Elemente sind ca. 50 bp oberhalb von tRNA-Genen, orientierungsspezifisch mit ihrem 5'-Ende in Richtung der tRNA-Gene gefunden worden (Winckler 2005a).

## TRE5-A

Die TRE5-A-Elemente sind die am besten untersuchten Elemente der TREs. Sie wurden in den 1980er Jahren entdeckt und anfangs als DRE (*Dictyostelium* repetitive element) bezeichnet (Marschalek 1989). Die ca. 70 Kopien der TRE5-A-Elemente werden in TRE5-A.1, TRE5-A.2 und TRE5-A.3 unterteilt. Sie werden von 12-16 bp langen Zielsequenz-Verdopplungen flankiert (Winckler 2002). TRE5-A-Elemente können bei ihrer Integration zusätzliche Nukleotide ins Genom integrieren (Beck 2002).

Komplette TRE5-A.1-Elemente sind 5.617 bp lang und besitzen zwei ORFs in unterschiedlichen Leserahmen. Die UTRs dieser Elemente sind modular aufgebaut. Die 5'-UTR besteht aus bis zu sieben A-Modulen und einem B-Modul. Das A-Modul ist 200 bp lang und stellt einen internen Promotor dar. Das Transkript dieser Elemente beginnt an der ersten Base des A-Moduls. Dadurch wird gewährleistet, dass ein mobilisiertes TRE5-A einen kompletten Promotor besitzt. Das 290 bp lange B-Modul hat sich während der Evolution dupliziert und liegt als Kopie auch am 5'-Ende der 3'-UTR vor. Die genaue Funktion des B-Moduls ist noch unbekannt. Das ATG für den ORF1 liegt innerhalb des B-Moduls. Es ist möglich, dass das B-Modul der ursprüngliche Promotor der TRE5-Elemente war (Winckler 2002). Zwischen dem A-Modul und dem B-Modul befindet sich zum einen eine Kopie der ersten 70 bp des A-Moduls, welche auch Promotoraktivität besitzen könnte, und zum anderen ein 39 bp langer, homopolymerer A-Stretch (Marschalek 1992b).

Die 3'-UTR besteht aus der Kopie des B-Moduls und aus einem C-Modul, welche durch einen ca. 30 bp langen, homopolymeren A-Stretch von einander getrennt sind (Marschalek 1992b). Das 139 bp lange C-Modul endet in einem Poly-A-Stretch und besitzt schwache Promotoraktivität für den (-)-Strang des TRE5-As. Diese (-)-Strang-RNA reguliert möglicherweise die Menge an (+)-Strang-RNA, welche für die Retrotransposition notwendig ist (Winckler 2002).

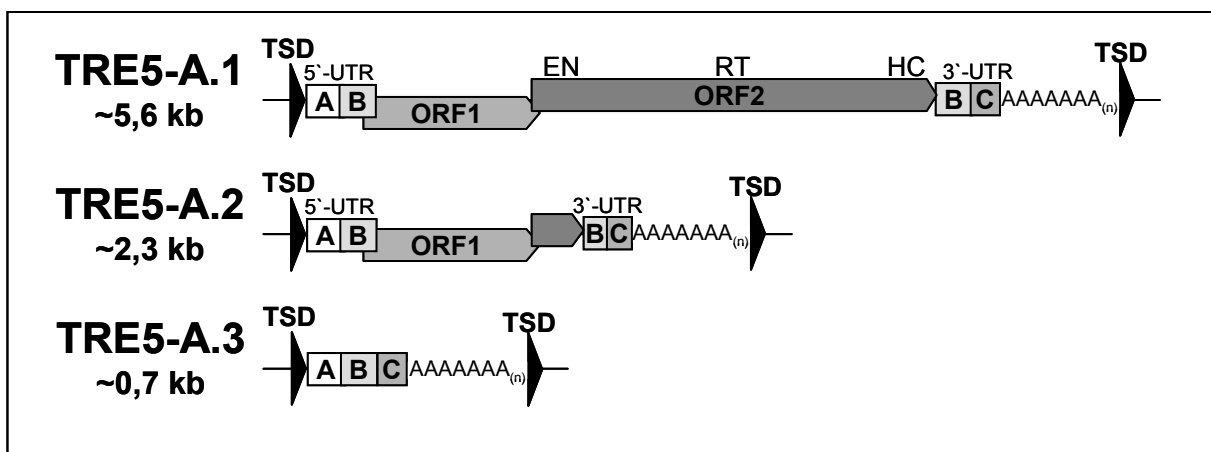
Der ORF1 kodiert für ein 51 kDa großes Protein, welches keine Homologie zu bekannten Proteinen aufweist. In *D. discoideum* rekombinant exprimiertes ORF1-Protein bildet im Zytoplasma der *Dictyostelium*-Zellen große, multimere Komplexe (Hentschel 2001b). In Analogie zu den ORF1-Proteinen anderer gut untersuchter Non-LTR-Retrotransposons kann vermutet werden, dass mehrere ORF1-Proteine an das TRE5-A-Transkript binden und so einen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) bilden. Desgleichen kann vermutet werden, dass die RNPs in den Zellkern transportiert werden und dort anschließend die TRE5-A-RNA über den TPRT-Mechanismus in das Genom integriert wird. Der Überschuss an ORF1-Protein gegenüber ORF2-Protein wird wahrscheinlich, ähnlich wie bei den LTR-Retrotransposons, durch einen ineffizienten „ribosomalen Frame-Shift“ von dem

bicistronischen TRE5-A-Transkript, erzeugt. Das ORF2-Protein enthält Domänen für eine Endonuklease, eine Reverse Transkriptase und eine Histidin-Cystein-reiche Domäne (HC). Diese Domänen weisen Homologien zu anderen Non-LTR-Retrotransposons auf (Winckler 2005a). Weder in ORF1 noch in ORF2 konnte ein eindeutiges Kernlokalisierungs-Signal identifiziert werden. Da *D. discoideum* ein sich oft teilender Organismus ist, können die RNPs während der Mitose durch die partiell aufgelöste nukleäre Membran in den Zellkern gelangen (Winckler 2002).

Die meisten *de novo*-Integrationen von TRE5-A.1-Elementen sind 5'-verkürzt und somit „dead on arrival“, da sie durch die 5'-Verkürzung ihren Promotor verloren haben (Beck 2002). Diese 5'-Verkürzungen sind typisch für Non-LTR-Retrotransposons und gehen vermutlich auf eine unvollständige reverse Transkription während der Integration zurück (Dewannieux 2005).

TRE5-A.2 unterscheidet sich von TRE5-A.1 durch eine 3.135 bp große Deletion in ORF2, drei Deletionen (7 bp, 29 bp, 72 bp) in der 3'-UTR und durch drei Punktmutationen in den A-Modulen der beiden Elemente (Marschalek 1992a). Durch diese Deletionen sind die TRE5-A.2 Elemente nicht mehr autonom und müssen von TRE5-A.1-Elementen *in trans* mobilisiert werden. Da die TRE5-A.2-Elemente viel kürzer sind als die kompletten TRE5-A.1-Elemente integrieren relativ viele TRE5-A.2s komplett und sind so nach ihrer Mobilisierung aktiv (Beck 2002).

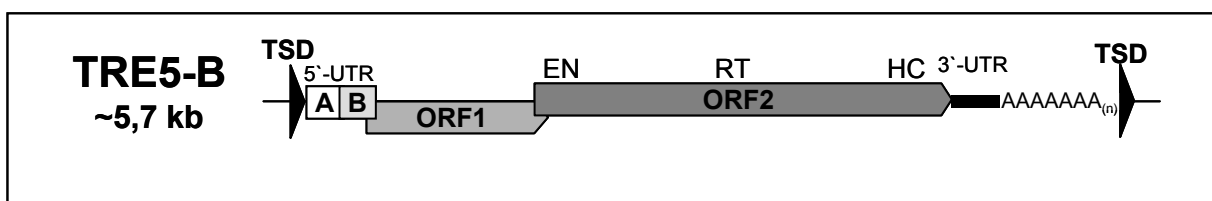
TRE5-A.3 Elemente bestehen nur aus einem A-, B- und C-Modul, sie sind vermutlich durch interne Rekombination zwischen den beiden B-Modulen unter Eliminierung von ORF1 und ORF2 aus TRE5-A.1 entstanden (Winckler 2002). Ob diese Elemente noch aktiv sind, oder alle nach ihrer Mobilisierung entstanden sind, ist nicht bekannt (T. Winckler, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 1.3.3: TRE5-A-Elemente**  
Schematische Darstellung des Aufbaus der TRE5-A-Elemente. Modifiziert nach Winckler (2005a).

### TRE5-B

Die 5,7 kb langen TRE5-B-Elemente sind erst durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt entdeckt worden. Sie ähneln in ihrem strukturellen Aufbau den TRE5-A-Elementen. Im Vergleich zu diesen Elementen fehlt den TRE5-Bs das B- und C-Modul in der 3'UTR. Auch die A-Module von TRE5-B-Elementen können in mehreren Kopien vorliegen (Szafranski 2002). Die TRE5-B-Elemente werden von ähnlichen TSDs flankiert wie die TRE5-A-Elemente und zeigen auch die gleiche Integrationspezifität. Von den 15 im Genom vorhandenen TRE5-Bs wurden vier untersucht. Drei dieser Elemente liegen im Abstand von 45-50 bp oberhalb eines tRNA-Gens, während ein TRE5-B-Element einen unüblichen Abstand von 96 bp zu einem tRNA-Gen hat (Winckler 2002).

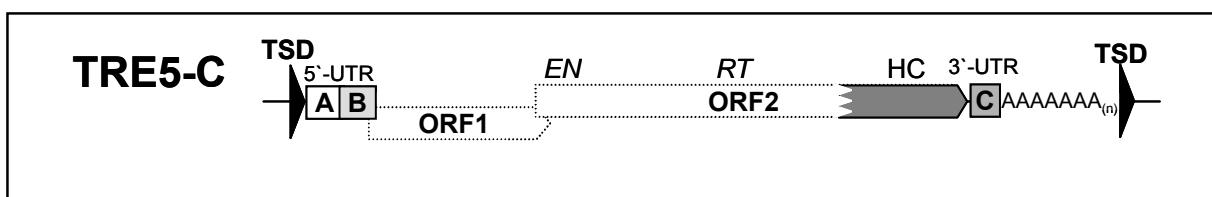


**Abbildung 1.3.4: TRE5-B-Element**

Schematische Darstellung des Aufbaus eines TRE5-B-Elementes. Modifiziert nach Winckler (2005a).

### TRE5-C

Auch die fünf Kopien des TRE5-C-Elementes wurden erst durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt entdeckt. Alle Kopien sind stark 5'-verkürzt, sodass kein komplettes TRE5-C assembliert werden konnte. Es wurde im Genom jedoch ein Fragment mit einem AB-Modul gefunden, welches den TRE5-C-Elementen zugeordnet wurde (Winckler 2002). TRE5-C-Retrotransposons enthalten demnach wie TRE5-A und TRE5-B in der 5'-UTR ein A- und B-Modul, vermutlich ebenfalls zwei sich partiell überlappende ORFs und in der 3'UTR nur ein C-Modul. TRE5-C-Retrotransposons werden von den TRE5-A-typischen TSDs flankiert. Vier von den fünf TRE5-C-Kopien befinden sich in einem Abstand von 44-46 bp oberhalb eines tRNA-Gens, eine TRE5-C-Kopie befindet sich aufgrund einer nachträglichen Integration eines H3R-LTR in einem größeren Abstand zum assoziierten tRNA-Gen (Winckler 2002).

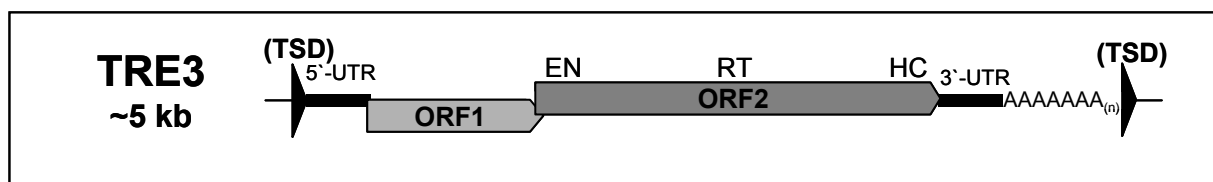


**Abbildung 1.3.5: TRE5-C-Element**

Schematische Darstellung des Aufbaus eines TRE5-B-Elementes. Modifiziert nach Winckler (2005a).

### 1.3.3.2 TRE3-Gruppe

Die TRE3-Elemente weisen eine ähnliche Struktur wie die TRE5-Elemente auf, ihre Gruppe ist allerdings wesentlich einheitlicher. TRE3-Retrotransposons haben eine Länge von 4,7-5,3 kb und enthalten zwei entweder sequentiell angeordnete (TRE3-A und TRE3-C) oder sich partiell überlappende ORFs (TRE3-B), die von UTRs flankiert werden. Die 3'-UTRs besitzen am Ende einen homopolymeren poly(dA)-Anhang mit einer Länge von bis zu 70 bp. Das Genom von *Dictyostelium discoideum* enthält ca. 60 Kopien von TRE3-A, ca. 50 Kopien von TRE3-B, ca. 30 Kopien von TRE3-C und ca. 5 Kopien von TRE3-D. Wie es für Non-LTR-Retrotransposos typisch ist, sind die meisten Kopien der TRE3-Elemente 5'-verkürzt und somit inaktiv. Im Gegensatz zu den codierenden Regionen unterscheiden sich die 5'- und 3'-UTRs der verschiedenen TRE3-Retrotransposons deutlich von einander. In TRE3-A konnte innerhalb der ersten 350 bp der 5'-UTR schwache Pol II-Promotor-Aktivität festgestellt werden (Winckler 1998).



**Abbildung 1.3.6: TRE3-Element**

Schematische Darstellung des Aufbaus eines TRE3-B-Elemente. Modifiziert nach Winckler (2005a).

Untersuchungen der TSDs von 35 TRE3-Retrotransposons zeigten, dass nur etwa die Hälfte der TRE3-A- und TRE3-B-Retrotransposons von TSDs mit einer Länge von 8-12 bp flankiert sind. Im Gegensatz dazu konnten bei allen Kopien von TRE3-C- und TRE3-D-Elementen TSDs der Länge 15-19 bp bzw. 14-40 bp festgestellt werden (Winckler 2002).

Von 27 untersuchten TRE3-A-Retrotransposons wurden 21 in einem Abstand von 63-133 bp ( $\bar{\text{O}}=105$  bp) unterhalb der B-Box von tRNA-Genen gefunden. Die restlichen sechs TRE3s wurden in ähnlichem Abstand unterhalb einer ex-B-Box von tRNA-Genen gefunden. Alle zwölf untersuchten TRE3-C Elemente wurden im Abstand von 75-125 bp unterhalb der B-Box von tRNA-Genen gefunden, während alle elf untersuchten TRE3-B-Elemente nur in einem Abstand von 40-98 bp ( $\bar{\text{O}}=67$  bp) unterhalb der B-Boxen von tRNA-Genen gefunden wurden (Szafranski 1999).

TRE3-Elemente zeigen anscheinend eine Integrationsspezifität sowohl für die interne, als auch für die externe B-Box von tRNA-Genen. Für beide B-Boxen wurde nachgewiesen, dass der Pol III-Transkriptionsfaktor TFIIC an sie bindet (Bukenberg 1994). Daher wird davon ausgegangen, dass die Integrationsspezifität der TRE3-Elemente über eine Interaktion zwischen TRE3-Proteinen und TFIIC gegeben wird (Winckler 2005a).

## 1.4 Pol III-Gene

### 1.4.1 tRNA-Gene

tRNA-Gene sind kleine Gene von ca. 76-97 bp Länge, die von der RNA-Polymerase III (Pol III) transkribiert werden und ubiquitär in dem Genom verteilt sind. Die Transkripte werden zunächst als größere Moleküle (Vorläufer-tRNA) synthetisiert. Aus diesen werden die funktionsfähigen tRNAs durch die sogenannte "Prozessierung" herausgeschnitten. Die fertigen tRNAs falten sich durch Paarung einiger Basen kleeblattartig so zusammen, dass sowohl das 3′-, als auch das 5′-Ende der tRNAs im Akzeptorarm liegen.

Da die Arme verschiedener tRNA-Gene unterschiedlich lang sein können, wichtige Funktionen der tRNA-Gene räumlich aber immer an denselben Stellen liegen, wurde ein einheitliches Nummerierungssystem eingeführt: Die Nummerierung beginnt beim 5′-Guanin-Nukleotid (im Akzeptorarm). Von dort an wird in 3′-Richtung gezählt, wobei auf das Nukleotid 17 im unterschiedlich langen D-Arm einiger tRNAs die Nukleotide 17a und 17b folgen können, sowie auf das Nukleotid 20 die Nukleotide 20a und 20b. In der variablen Schleife können auf das Nukleotid 47 die Nukleotide 47a bis 47p folgen. Das Anticodon liegt immer an der Position 34 bis 36 (Knippers 2001; Singhal 1983).

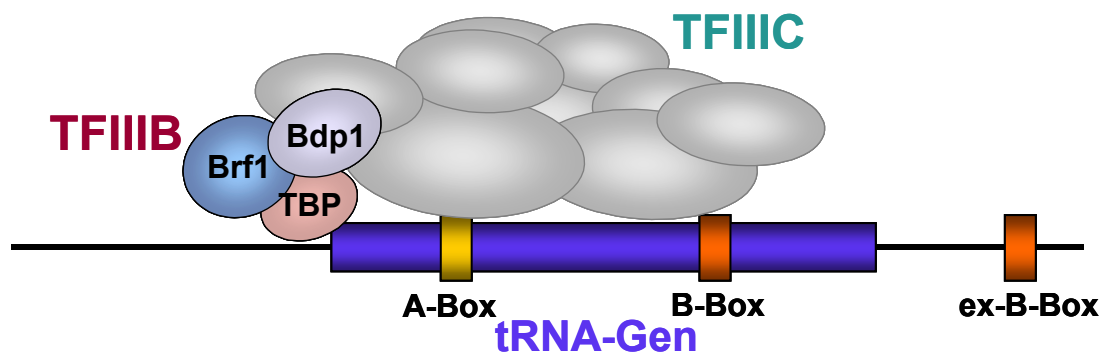
Die Aminosäurebeladung an die 3′-OH-Gruppe der tRNAs funktioniert mit Hilfe spezifischer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Die Erkennung der tRNA-Gene durch diese Synthetasen erfolgt an einigen wenigen Stellen im tRNA-Molekül. Die wichtigste Stelle für die Erkennung ist die Position 73 im tRNA-Gen. Die meisten Synthetasen erkennen zusätzlich den Akzeptor-Arm der tRNA-Gene, während andere (z. B. die Valyl-tRNA-Synthetase) auch das Anticon überprüfen (Fukai 2003; Horowitz 1999; Ramesh 2001).

Für tRNA-Gene in *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivität die Aktivität benachbarter Pol II-Gene reprimiert. Dies ist wahrscheinlich der Grund, warum in einem Abstand von mehreren hundert Basen von tRNA-Genen selbst in dichten Genomen keine proteinkodierenden Gene liegen (Bolton 2003).

In *Dictyostelium discoideum* kommen die einzelnen tRNA-Gene in ein bis 21 Kopien im Genom vor, wobei durch den hohen A/T-Gehalt hauptsächlich A/T-reiche Codons und damit die entsprechenden tRNA-Gene verwendet werden (Eichinger 2005). Insgesamt gibt es im *Dictyostelium*-Genom 390 Kopien von tRNA-Genen, die homogen im gesamten Genom verteilt sind. Die 3 Stopp-Codons *ochre* (UAA), *amber* (UAG) und *opal* (UGA) werden unterschiedlich oft verwendet. Während ca. 90% aller *Dictyostelium* Gene mit

einem *ochre*-Stopp-Codon beendet werden, werden die beiden anderen Stopp-Codons nur zu 5,5% bzw. 4,9% verwendet (Winckler 2005b).

tRNA-Gene besitzen zwei interne Promotorregionen, zum einen die A-Box von Position acht bis 21 und zum anderen die B-Box von Position 50 bis 61. In allen *Dictyostelium* tRNA-Genen ist die B-Box mit der Basenfolge G<sup>53</sup>TTCRANYC<sup>61</sup> konserviert. Ähnlich wie in *Saccharomyces cerevisiae* bindet in *Dictyostelium* wahrscheinlich der Transkriptionsfaktor TFIIC an die B-Box und rekrutiert den Transkriptionsfaktor TFIIB, welcher oberhalb des tRNA-Gens an die DNA bindet und dort die Transkription einleitet (Bukenberg 1991; Geiduschek 2001). *Dictyostelium*-TFIIB besteht aus den drei Proteineinheiten Bdp1, Brf1 und TBP, während die genaue Struktur von TFIIC in *Dictyostelium* noch nicht bekannt ist. dTFIIC besteht aus wenigstens acht Untereinheiten, von denen erst zwei identifiziert werden konnten (Bukenberg 1994, <http://www.dictybase.org>).



**Abbildung 1.4.1: Schematische Darstellung eines tRNA-Gens**

Schematische Darstellung eines Modells für ein *Dictyostelium discoideum*-tRNA-Gen mit den angedeuteten Transkriptionsfaktoren TFIIC und TFIIB. Das tRNA-Gen ist durch die A- und die B-Box gekennzeichnet, unterhalb des tRNA-Gens befindet sich eine externe B-Box. TFIIB besteht in *D. discoideum* aus den drei Untereinheiten TBP, Bdp1 und Brf1. Die Art und Anzahl der Untereinheiten von TFIIC ist nicht bekannt. TFIIC ist schematisch in grau dargestellt. Modifiziert nach Geiduschek (2001).

In *Dictyostelium discoideum* besitzen nach älteren Schätzungen ca. 80% aller tRNA-Gene ein externes B-Box-Motiv welches 19-35 bp unterhalb des tRNA-Gens lokalisiert ist (Hofmann 1991). Die Funktion dieser externen B-Box ist noch weitgehend unbekannt. Hofmann et al. (1991) diskutieren, dass die externe B-Box von *Dictyostelium*-tRNA-Genen als Parkposition für TFIIC während der Transkription des tRNA-Gens genutzt werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor TFIIC sowohl an die interne, als auch an die externe B-Box bindet (Bukenberg 1994).

In der Umgebung von ca. 54% aller *D. discoideum*-tRNA-Gene sind Integrationen von mindestens einem TRE-Retroelement gefunden worden (Winckler 2005a).



## 1.4.2 Das ribosomale 5S-Gen

Das ca. 120 bp lange ribosomale 5S-Gen wird ebenso wie die tRNA-Gene von der Pol III transkribiert und kodiert für einen Teil der kleinen Untereinheit der Ribosomen. Das r5S-Gen besitzt als interne Promotorregionen eine A- und eine C-Box. Bei der Transkription bindet erst der Transkriptionsfaktor TFIIIA an die A-Box, rekrutiert den Transkriptionsfaktor TFIIIC, welcher wiederum, wie bei den tRNA-Genen, TFIIIB rekrutiert und somit die Transkription des r5S-Gens einleitet (Geiduschek 2001).

In *Dictyostelium discoideum* liegt das r5S-Gen zusammen mit anderen ribosomalen Genen auf dem extrachromosomalen Palindrom. Ob sich das r5S-Gen auch auf der Kopie des Palindroms auf Chromosom 4 befindet, ist nicht bekannt (Sugang 2003).

In der Umgebung des r5S-Gens sind keine Integrationen von Retroelementen gefunden worden. Es ist aber möglich, dass einzelne Integrationen auf wenigen Kopien des Palindroms im Genomprojekt nicht erkannt werden konnten (G. Glöckner, FLI Jena, persönliche Mitteilung).

## 1.5 Gentherapie

Die Gentherapie ist die gezielte Einführung genetischen Materials mit Hilfe geeigneter Übertragungsmethoden in Zellen von Patienten. Im Unterschied zur herkömmlichen, medikamentösen Therapie, erfolgt bei der Gentherapie keine Verabreichung eines direkt wirkenden Arzneimittels, sondern die Körperzellen selbst werden durch den Zusatz von Genen dazu veranlasst, die benötigten Proteine selbst zu produzieren.

Bei genterapeutischen Eingriffen ist zwischen Veränderungen in Körperzellen (somatische Gentherapie) und denen der menschlichen Keimbahn (Keimbahntherapie) zu unterscheiden. Die genterapeutische Veränderung der menschlichen Keimbahn wird aus ethischen und praktischen Gründen (Nebenwirkungen unvorhersehbar; veränderte Erbinformation wird an die Nachkommen weiter gegeben) für nicht vertretbar gehalten und ist in fast allen Ländern verboten (in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz).

Bis Januar 2005 gab es über 1.000 anerkannte somatische Gentherapie-Studien, die zum Teil sehr erfolgreich verliefen. Ca.  $\frac{2}{3}$  dieser Studien beschäftigten sich mit der Bekämpfung von verschiedenen Krebsarten (Peng 2005).

Gentherapie in ihrer engsten Definition (Genkorrektur) bedeutet die Reparatur eines defekten Genabschnittes in einer Zelle, also ein gezielter Austausch der fehlerhaften Sequenz. Dies ist bisher jedoch in klinischen Studien noch nicht zur Anwendung gekommen. Es gibt auf diesem Gebiet einen interessanten Ansatz, bei dem ein Teil des defekten Gens *in vitro* mittels homologer Rekombination gegen ein neues Stück ausgetauscht wird. Da die homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen ein sehr seltenes Ereignis ist, wird ein DNA-Doppelstrangbruch an der zu ersetzenden Gensequenz mit Hilfe von Endonukleasen, die mit Zinkfingerproteinen fusioniert wurden, erzeugt. Jeder Zinkfinger erkennt dabei drei Basen der Ziel-DNA. Durch mehrere Zinkfinger hintereinander kann die Endonuklease sequenzspezifisch die DNA an fast jeder gewünschten Stelle schneiden (Alwin 2005; Urnov 2005). Durch den Doppelstrangbruch wird die Frequenz der homologen Rekombination deutlich erhöht. Mit Hilfe dieser homologen Rekombination konnten in Zellkulturversuchen ca. 20% defekter Immunzellen geheilt werden, bei 7% gelang eine Heilung beider Allele.

Im weiteren Sinne umfasst die Gentherapie den Ersatz defekter Gene durch zusätzliche funktionell intakte Kopien (Genaddition), die Inaktivierung pathogener Genprodukte (Anti-Gen-Therapie, Antisense-Therapie) oder auch die indirekte Heilung von Krankheiten durch therapeutische Gene.

Es gibt zwei Ansätze Patienten zu behandeln. Zum einen können die therapeutischen Gene direkt *in vivo* verabreicht werden. Dem Patienten können zum anderen in einem *ex-vivo*-Ansatz Zellen entnommen werden, diesen wird dann das neue Erbgut *in vitro* zugeführt und anschließend werden die behandelten Zellen dem Patienten wieder eingepflanzt.

Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten das neue Erbgut in die Zellen einzubringen. Dies kann am Einfachsten mit „nackter“ DNA oder mit DNA in Form von Liposomen geschehen. Da so eingeschleuste Gene aufgrund der geringen Stabilität der DNA nur kurz im Zellkern exprimiert werden, ist dies eine sehr ineffiziente Methode, die ständig wiederholt werden muss.

Viren besitzen neben der Eigenschaft ihre DNA entweder stabil in das Genom zu integrieren oder als Episom über eine längere Zeit stabil im Zellkern vorliegen zu lassen und einer hohen Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz, für eine gentherapeutische Anwendung den Vorteil, dass ihre Proteine stark in den Wirtszellen exprimiert werden. Daher werden in den meisten Gentherapie-Ansätzen Retroviren, Adenoviren oder Adenoassoziierte-Viren verwendet. Bei diesen Viren werden in der Regel diejenigen Gene, die sie benötigen, um sich selbst zu verpacken und so die Zelle verlassen zu können, durch die therapeutischen Gene ausgetauscht. Diese replikationsinkompetenten Viren sind in der Lage Zellen zu infizieren, jedoch nicht mehr in der Lage sich selbst zu vermehren und nach einer Therapie weitere Zellen zu infizieren.

- Retroviren sind RNA-Viren, die im Körper des Patienten nur eine schwache Immunreaktion auslösen. Sie können ca. 8 kb Fremd-DNA aufnehmen und integrieren stabil in das Genom der infizierten Zellen. Dies hat den Vorteil, dass das therapeutische Gen bei jeder Zellteilung auch an die Tochterzellen weiter gegeben wird. Da die Retroviren bevorzugt in die Nähe des Transkriptionsstartes von stark transkribierten Genen integrieren (Wu 2003), besteht ein hohes Risiko einer Insertionsmutagenese. Bei einer Studie in Paris, bei der elf Kleinkinder, die unter der Krankheit X-SCID litten und mit retroviralen Gentherapievektoren behandelt wurden, sind zehn der elf Kinder geheilt worden (Hacein-Bey-Abina 2002). Allerdings entwickelten drei dieser Kinder 2-3 Jahre nach der Behandlung eine Leukämie. Bei zwei dieser Kinder wurde eine Integration des Therapievektors in die Promotorregion bzw. das erste Intron des Proto-Onkogens *LMO2* als Ursache für die Leukämie festgestellt (Check 2005; Hacein-Bey-Abina 2003).
- Adenoviren sind Doppelstrang-DNA-Viren und können mit ca. 20 kb noch mehr Fremd-DNA aufnehmen als Retroviren. Sie sind im Gegensatz zu Retroviren auch in der Lage ruhende Zellen zu infizieren. Adenoviren integrieren nicht in das Genom der Zellen, sondern bleiben über einen langen Zeitraum im Zellkern als Episom vorliegen. Eine Gentherapie mit adenoviralen Vektoren muss daher im Abstand von einigen Monaten oder Jah-

ren regelmäßig wiederholt werden. Im Gegensatz zu Retroviren lösen Adenoviren im Menschen eine starke Immunreaktion aus. An einer solchen Überreaktion des Immunsystems ist 1999 ein 18-jähriger Proband in den USA während einer Pilot- (Sicherheits-) Gentherapie-Studie mit adenoviralen Vektoren gestorben (Raper 2003).

- Adenoassoziierte-Viren (AAV) sind ssDNA-Viren, die meistens parallel mit Adenoviren auftreten. Diese Viren können nur ca. 4,5 kb Fremd-DNA aufnehmen. Sie sind ähnlich wie Adenoviren in der Lage, ruhende Zellen zu infizieren, lösen im Menschen keine Immunantwort aus und integrieren wie die Retroviren stabil in das Genom der infizierten Zellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Gentherapie eine sehr erfolgversprechende Therapie werden kann. Eine optimale und sichere Genföhre ist aber zur Zeit noch nicht gefunden worden (Verma 2005).

Bisher ist nur in China ein Gentherapie-Produkt (Gendicine), zur Behandlung von Plattenepithelzellkarzinomen im Kopf und Nackenbereich, zugelassen. Dieses Medikament ist ein rekombinanter, replikationsinkompetenter Adenovirus Serotyp 5, der zusätzlich *p53* kodiert und *in vivo* verabreicht wird (Peng 2005). Adenoviren des Serotyps 5 erzeugen in Menschen die geringste Immunreaktion aller Adenoviren.

## 1.6 Transposons in der Gentherapie

Wie beschrieben, ist ein Problem in der Gentherapie, dass die meisten Transfersysteme die therapeutischen Gene nicht stabil in das Genom des Empfängers integrieren und diese Gene somit nicht auf Dauer exprimiert werden können. Da Transposons ihre DNA stabil und effektiv in das Genom integrieren, gibt es mehrere Überlegungen, Transposons für die Gentherapie zu nutzen (Carlson 2005; Soifer 2004). Neben der Arbeit von Carlson et al. gibt es mehrere Ansätze das Transposon „Sleeping Beauty“ für die Gentherapie zu nutzen. Sleeping Beauty ist ein DNA-Transposon aus dem Lachs, welches während der Evolution durch mehrere Mutationen inaktiv wurde. Dieses Transposon wurde synthetisch wieder hergestellt und ist in nahezu allen eukaryotischen Wirtszellen mobil (Ivics 1997). Die Transposase dieses Transposons mobilisiert jede DNA-Sequenz *in trans*, die von den Sleeping Beauty-ITRs umgeben ist. Bei Gentherapie-Versuchen wurde ein Expressionsvektor für die Transposase und ein Plasmid, welches das therapeutische Gen inklusive der

ITRs enthält, in Mäuse injiziert (Carlson 2005). Die Transposase kann das therapeutische Gen mobilisieren, welches so in das Genom der Wirtszelle stabil integriert wird.

Ein anderer Ansatz besteht aus einem Hybrid von einem Adenovirus und einem L1-Element (Soifer 2004). Der Adenovirus kodiert unter anderem für das L1-Element in welches das therapeutische Gen eingebracht werden kann. Der Adenovirus infiziert sowohl ruhende, als auch sich teilende Zellen sehr effektiv. Die DNA des Virus liegt im Genom als Episom vor. Von diesem Episom kann das therapeutische L1-Element in das Genom der Wirtszelle integrieren.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Geeignete Transfersysteme in der Gentherapie zu finden ist mit mehreren Problemen verbunden. So müssen diese Transfersysteme die gewünschte Erbinformation effektiv in den Zellen eines Patienten exprimieren und dabei vor allem sicherstellen, dass durch den Gentransfer keine neuen Krankheiten oder andere Risiken entstehen.

Ein möglicher Ansatz dazu wäre ein retrovirales Transfersystem, welches sehr effektiv die therapeutische Erbinformation in das Genom integriert, aber den prinzipiellen Nachteil hat, dass die Integration ungerichtet stattfindet. Ein anderer möglicher Ansatz zur Lösung dieses Problems wäre ein transposonbasiertes System, welches das therapeutische Gen an eine bestimmte Stelle ins Genom integriert. Ein solches System steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung. Da die TRE5-A-Elemente aus *Dictyostelium discoideum* aktive Retrotransposons sind, die ca. 50 bp oberhalb von tRNA-Genen und damit in „sicheren“ Regionen integrieren, sollte in dieser Arbeit dieser spezifische Transposition-Mechanismus näher untersucht werden.

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Zielspezifität der TRE5-A-Elemente näher untersucht werden. Dazu wird mit der "TRE-Falle" auf ein bestehendes Testsystem zurückgegriffen, mit dem die Aktivität endogener TRE-Elemente analysiert werden kann und mit dem potentielle Integrationsziele für mobile Elemente in *Dictyostelium discoideum* untersucht werden können. Da bisher nur Integrationen in der Umgebung des tRNA<sup>Val</sup>(UAC)-Gens in der TRE-Falle untersucht wurden, sollte zunächst gezeigt werden, dass auch andere tRNA-Gene in dieser Falle orthodox als Integrationsziel erkannt werden können. Mit Integrations-Untersuchungen in der Umgebung einer isolierten B-Box, tRNA-Genen mit einer inaktivierten B-Box und dem ribosomalen 5S-Gen sollte anschließend geklärt werden, ob die Integration der TRE-5-A-Elemente über die spezifischen Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III vermittelt wird.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein Testsystem für ein „minimales“ TRE entwickelt werden, mit dem es möglich ist, zu überprüfen welche Bereiche der TRE-5-A-Retrotransposons zur gerichteten Transposition notwendig sind.

Das langfristige Ziel ist es, ein Retrotransposon herzustellen, das in humanen Zellen gerichtet in die 5'-flankierende Region von tRNA-Genen und somit in unkritische Bereiche des Genoms integriert. In ein solches Transposon könnte ein therapeutisches Gen integriert werden und damit ein möglicher Schritt zu einer sichereren Gentherapie gemacht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller / Lieferant
24-Well-Platten 24x1cm	Fa. Greiner
96-Well-Platten	Fa. Greiner
Cryoröhrchen 2 ml (12,5/48 mm)	Fa. Greiner
Elektroporationsküvetten 2 und 4 mm	Fa. Molecular Bioproducts
Gradientenröhrchen 16x60 mm	Fa. Beckmann
Mikrotiterplatten	Fa. Greiner
Nitrozellulosemembran Protran® BA85	Fa. Schleicher & Schüll
Nylonmembran Hybond™-N	Fa. Amersham
Penta-His Antibody Mouse IgG 1	Fa. Qiagen
Petrischalen (5 cm, 10 cm)	Fa. Greiner
Petrischalen beschichtet (10 cm)	Fa. Nunc
Röntgenfilm X-Omat AR™	Fa. Kodak
Sterilfilter 0,2 µm	Fa. Schleicher & Schüll

#### 2.1.2 Chemikalien

Substanzen	Hersteller / Lieferant
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mMol)	Fa. Amersham Buchler
Ampicillin	Fa. Roth
ATP	Fa. Roche Molecular Biochemicals
Blasticidin S	Fa. ICN Biochemicals
CPRG	Fa. Roche
DMSO	Fa. Merck
dNTPs	Fa. AbiPrism
Ethidiumbromid	Fa. Merck
Ficoll 400.000	Fa. Sigma
FM-Granulat	Fa. Formedium
G418 (Sulfat)	Fa. Alexis
Leupeptin	Fa. Merck
Lysozym	Fa. Sigma
MES	Fa. Roth
N-Lauroyl-Sarcosine (Sarcosyl)	Fa. Sigma
Röntgen-Fixierlösung	Fa. Tetenal
Röntgen-Rapidentwickler	Fa. Tetenal
Uracil	Fa. Sigma

### 2.1.3 Kits

Kits	Hersteller / Lieferant
Protein Assay Kit	Fa. Perbio Science
BigDye™ Cycle Sequencing Kit	Fa. PE Applied Biosystems
DNeasy® Tissue Kit	Fa. Qiagen
ECL™ -Kit	Fa. Qiagen
Long Range DNA Polymerase Kit	Fa. Eppendorf
pGEM® -T Vector System	Fa. Promega
Plasmid Midi Kit	Fa. Qiagen
Qiaquick® Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen
Omniscript RT-Kit	Fa. Qiagen
Qiaquick® PCR Purification Kit	Fa. Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Fa. Stratagene
RNeasy® mini Kit	Fa. Qiagen
Taq DNA Polymerase Kit	Fa. Eppendorf

### 2.1.4 Enzyme

Enzyme	Hersteller / Lieferant
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	Fa. New England BioLabs (NEB)
DNase (RNasefrei)	Fa. Qiagen
<i>E. coli</i> -DNA-Ligase	Fa. New England BioLabs (NEB)
Proteinase K	Fa. Merck
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England BioLabs (NEB)
RNase	Fa. New England BioLabs (NEB)
T4-DNA-Ligase	Fa. New England BioLabs (NEB)
T4-Polynukleotidkinase	Fa. New England BioLabs (NEB)

### 2.1.5 Allgemeine Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	
Aktin-Lyse-Puffer	Glycerin	15 % (v/v)
	HEPES/KOH (pH 7,8)	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	DTT	0,5 mM
	ATP	0,5 mM
CPRG-Lösung	Hepes-NaOH (pH 7,5)	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	β-Mercaptoethanol	1 mM
	NaCl	150 mM
	Chlorophenolrot-β-D-galaktopyranosid (CPRG)	0,2 mg/ml
CPRG-Lysepuffer	Triton in 1x Phosphatpuffer	0,2 % (v/v)
gDNA Lysepuffer	MgAc	10 mM
	NaCl	10 mM
	HEPES / NaOH (pH 7,5)	30 mM



	Saccharose	10 % (w/v)
	Triton	2 % (v/v)
gDNA Puffer	EDTA (pH 8,4)	200 mM
	Sarcosyl	2 % (w/v)
GRP 20x (pH 7,5)	Tris / HCl	134 mM
	EDTA	20 mM
	NaOAc	66 mM
Grundpuffer ohne KCl	Glycerin	15 % (v/v)
	HEPES/KOH (pH 8,0)	20 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	DTT	1 mM
HBS 2x	HEPES (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	140 mM
	KCl	10 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mM
	Glukose	0,2 % (w/v)
Lysepuffer für Kernextrakte	Saccharose	10 % (w/v)
	HEPES / KOH (pH 7,8)	30 mM
	MgOAc	10 mM
	KCl	10 mM
	DTT	1 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	Triton X1000	2 % (v/v)
Phosphatpuffer 50x (pH 7,0)	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	735 mM
Schocklösung	HBS 2x	1 ml
	H <sub>2</sub> O	0,4 ml
	Glycerin 60% (v/v)	0,6 ml

## 2.1.6 Nährmedien

### 2.1.6.1 Flüssige Nährmedien

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
FM-Medium	FM-Granulat	19,5 g/l autoklavieren
HL5-Medium	Bacto Pepton	14,3 g/l
	Yeast Extract	7,15 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,64 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,49 g/l
		autoklavieren
	Glucose	1 % (w/v)
MES-Medium	Bacto-Pepton	12 g/l
	Yeast Extract	6 g/l

	MES	1,3 g/l autoklavieren
	Glucose	1 %(w/v)
SM-Medium	Bacto-Pepton	10 g/l
	Yeast Extract	1 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2 g/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	1,3 g/l
	MgSO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l autoklavieren
	Glucose	1 %(w/v)
SOC-Medium	Bacto Tryton	20 g/l
	Yeast Extract	5 g/l
	Glucose	0,1 %(w/v)
YT-Medium	Bacto-Pepton	10 g/l
	Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	5 g/l autoklavieren

### 2.1.6.2 Agar Nährmedien

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Phosphat-Agar	Agar	20 g/l
	Phosphatpuffer 50x	2 %(v/v) autoklavieren
SM-Agar 1/5	Agar	12 g / l
	flüssiges SM-Medium	20 % (v/v) autoklavieren
	Glucose	1 %(w/v)
YT-Agar	Agar	20 g/l
	in flüssigem YT-Medium	autoklavieren

### 2.1.6.3 Nährmedien zur Selektion

<b>Antibiotikum / Additivum</b>	<b>Konzentration</b>
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 µg/ml
G418 (Sulfat)	5-20 µg/ml
Blasticidin S	5 µg/ml
Uracil	20 µg/ml
5-Fluoroorotat	100 µg/ml, 150 µg/ml,

## 2.1.7 Mikroorganismen

### 2.1.7.1 *E.coli*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp
DH5 $\alpha$	end A1 gyr A96, thi-1, hsdR17 SupE44, thi-1, lambda-, recA1, gyrA96, relA1, ( $\Delta$ larg-lac ZYA) U196 F80d lacZ $\Delta$ M15 (Sambrook 1989)
RZ 1032	F', cat, (pCJ105; m13s, CMR) dut, ung1, thi-1, relA1, spoT1, mcrA (Sambrook 1989)

### 2.1.7.2 *Dictyostelium discoideum* Stämme

Bezeichnung	Genotyp
AX2	Axenisch wachsende Mutante (Loomis 1982; Sussman 1967) vom Wildtyp <i>NC4</i> (Raper 1935). Plasmide werden ins Genom integriert.
DH1	AX3-Mutante, bei der das UMPS-Gen ( <i>pyr5-6</i> ) durch homologe Rekombination mit dem Plasmid pRG24 deletiert ist. Der daraus entstandene DH1-Stamm weist daher einen <i>ura</i> <sup>-</sup> -Phänotyp auf (Caterina 1994). Auch AX3 (Loomis 1971) ist eine Mutante von Wildtyp <i>NC4</i> (Raper 1935). DH1-Zellen wachsen nur in Petrischalen, nicht in Schüttelkulturen. DH1-Mutanten mit einem integrierten UMPS-Gen wachsen in Schüttelkultur. Die Plasmide werden bei transformierten DH1-Zellen ins Genom integriert.

## 2.1.8 Antikörper

Name	Verdünnung	Beschreibung
<b>Primärer Antikörper</b> Anti-ORF1 10F11	Überstand	muriner, monoklonaler Antikörper gegen ORF1 von TRE5-A (Hentschel 2001a)
<b>Sekundärer Antikörper</b> Anti-Maus	1:10.000	Penta-His Antibody Mouse IgG (Fa. Qiagen)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Standardmethoden

Die gentechnischen Standardmethoden wurden nach Sambrook (1989) ausgeführt. Molekularbiologische Kits wurden entsprechend den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen verwendet.

### 2.2.2 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Fragmenten wird nachdem Cycle-Sequencing-Verfahren mit dem DNA-Sequencer Abi Prism 310 und dem Cycle-Sequencing Kit BigDye™ durchgeführt, die Sequenzierung der DNA erfolgt dabei nach Sanger (Sanger 1977). Zuerst wird eine Sequenzierungs-PCR mit einem Primer durchgeführt.

Primer	10 pmol
DNA	200-500 ng
Ready Reaction Mix	2 µl
Milli Q H <sub>2</sub> O	ad 5 µl

Das Temperatur-Zeit-Schema:

Denaturierungsphase initial	96°C	2 min	
Denaturierungsphase	96°C	20 s	
Hybridisierungsphase	56°C	10 s	} 25 x
Synthesephase	60°C	4 min	

Nachdem Cycle-Sequencing wird dem Reaktionsansatz 45 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und die DNA mittels EtOH-Fällung gereinigt und aufkonzentriert. Die DNA wird in 15 µl Template Suppression Mix (TSR) 15 min gelöst, kurz gemischt und in Sequenzer-Reaktionsgefäße überführt. In dem DNA-Sequencer werden die DNA Fragmente in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt, die Sequenz automatisch mit einem Laser ausgelesen und mit dem Programm AbiPrism bearbeitet.

### 2.2.3 Gel Shift (EMSA)

Mit dem Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay (EMSA) weist man spezifische DNA / Proteinbindung nach, indem radioaktiv markierte DNA-Fragmente zusammen mit Proteinextrakt inkubiert und anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Da DNA, welche an ein Protein gebunden ist, bei einer elektrophoretischen Auftrennung viel langsamer durch die Gelmatrix wandert als ungebundene DNA, kann man den DNA / Proteinkomplex durch Autoradiographie detektieren.

Die DNA-Sonden für die Gelshiftexperimente werden mit radioaktivem [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-ATP nach der Fill-in-Methode hergestellt. Für jede Inkubation werden 5  $\mu\text{l}$  Kernextrakt (ca. 1  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) in Gegenwart von 1  $\mu\text{g}$  Poly[dA-dT]•Poly[dA-dT] und 1  $\mu\text{g}$  Kompetitor-DNA bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden ca. 10 fmol (ca. 10.000 cpm) radioaktiv markierte Sonden-DNA zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird auf ein Gesamtvolumen von 30  $\mu\text{l}$  in Grundpuffer mit 100 mM KCl eingestellt und ohne weiteren Auftragspuffer auf einem 4 %igem PAA-Gel (4°C, 25 mA, ca. 3-4 h) in 1x GRP-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das PAA-Gel wird nach der Elektrophorese für 5 min in 10%iger Essigsäure und anschließend 5 min in 10% Methanol fixiert, getrocknet und anschließend für ca. 16 h bei -80°C autoradiographiert.

### 2.2.4 CPRG-Test

Mit Hilfe des CPRG-Tests lässt sich die Aktivität von  $\beta$ -Galaktosidase nachweisen. Die  $\beta$ -Galaktosidase spaltet dabei enzymatisch das Substrat Chlorophenolrot- $\beta$ -D-galaktopyranosid (CPRG) und löst dadurch ein Farbumschlag der Lösung von gelb nach rot aus. Für den CPRG-Test wird je ein tiefgefrorenes Pellet von *D. discoideum*-Zellen (ca.  $2 \times 10^7$  Zellen) in 100  $\mu\text{l}$  CPRG-Lysepuffer aufgenommen und gevortext. 50  $\mu\text{l}$  der Zelllysate werden in je ein Well einer 96-Wellplatte vorgelegt und je 100  $\mu\text{l}$  CPRG-Lösung zugegeben. Der Farbumschlag bei Raumtemperatur wird im ELISA-Reader bei 550 nm zu mehreren Zeitpunkten gemessen. Die Enzymaktivität wird mit folgender Formel berechnet:

$$Akt = \frac{\Delta E}{\varepsilon * d} * \frac{10^{-6}}{t * 3600} * V * \frac{10^8}{Z} [kat / 10^8 \text{ Zellen}]$$

$$Akt = \frac{\Delta E * V}{\varepsilon * d * Z * t * 36} [kat / 10^8 \text{ Zellen}]$$

$\Delta E$  :  $OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{CPRG-Lösung}}$   
 $V$  : Gesamtvolumen [ $\mu\text{l}$ ] (150  $\mu\text{l}$ )  
 $Z$  : absolute Zahl an eingesetzten Zellen ( $1 \cdot 10^7$ )  
 $d$  : Dicke der Probe [mm]  
 $t$  : Zeit [h]  
 $\varepsilon$  :  $75 \cdot 10^3 \left[ \frac{l}{\text{mol} * \text{cm}} \right]$

## 2.3 Molekularbiologische Methoden für *Dictyostelium discoideum*

### 2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

#### 2.3.1.1 *D. discoideum* Stamm AX2

Der axenisch wachsende, untransformierte *Dictyostelium discoideum*-Stamm AX2 wird in HL5-Medium, transformierte Stämme in HL5-Medium unter Zusatz von G418 (7 µg/ml) oder Blastocidin (5 µg/ml) in Petrischalen oder in Schüttelkultur (150 rpm) bei einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium bei 22°C kultiviert. Die Zelldichte wird mittels Zählkammer oder einem CASY-Zellzähler bestimmt. Die Generationszeit der Zellen beträgt ca. 10 Stunden.

#### 2.3.1.2 *D. discoideum* Stamm DH1

Der untransformierte *Dictyostelium discoideum*-Stamm DH1 wird in HL5-Medium oder FM-Medium unter Zusatz von 20 µg/ml Uracil in Petrischalen bei 22°C kultiviert. Transformierte DH1-Zellen, denen das UMPS-Gen wieder ins Genom integriert wurde, sind im Gegensatz zu nicht transformierten DH1-Zellen sowohl in der Lage in uracilfreiem FM-Medium, als auch als Schüttelkultur bei 150 rpm, bis zu einer Dichte von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml logarithmisch zu wachsen. Die Generationszeit der DH1-Zellen beträgt ca. 12-14 Stunden.

### 2.3.2 Transformation

*Dictyostelium discoideum* Zellen können mittels  $\text{CaCl}_2$ -Transformation oder Elektroporation transformiert werden, dabei wird die transformierte DNA stabil ins Genom integriert. Die Transformation der AX2-Zellen erfolgt in der Regel durch die  $\text{CaCl}_2$ -Transformation, während DH1-Zellen in der Regel mit der effizienteren Elektroporation transformiert werden.

Es gibt zwei Möglichkeiten auf transformierte *Dictyostelium* Zellen zu selektionieren. Zum einen kann mit der transformierten DNA zusätzlich eine Antibiotikumresistenz eingebracht werden (z. B. G418 oder Blastocidin), zum anderen kann in einen Ura<sup>-</sup>-Stamm (z. B. DH1) das UMPS-Gen mit der transformierten DNA eingebracht werden. Die transformierten

Zellen bekommen dadurch einen Ura<sup>+</sup>-Phänotyp und sind in Lage in Minimalmedium (FM) ohne Uracil zu wachsen.

Bei Selektionen mit G418 ist davon auszugehen, dass bei resistenten Zellen ca. 500 Kopien des Plasmides tandemartig ins Genom integriert wurden, während bei Blasticidin-Selektionen 1-10 Kopien ins Genom integriert wurden und diese ausreichen um eine Resistenz zu entwickeln (Pang 1999). Durch Erhöhung der Antibiotikum-Konzentration im Selektionsmedium kann auf Zellen selektioniert werden, die eine höhere Kopienzahl des Plasmids im Genom aufweisen.

Da bei der Selektion auf einen Ura<sup>+</sup>-Phänotyp ein single-copy-Gen ersetzt wird, ist davon auszugehen, dass resistente Zellen in der Regel nur eine Kopie der DNA ins Genom integriert haben.

In der Regel werden 3-5 unabhängige Klone von jeder Transformation gepickt, kultiviert, gestockt und überprüft.

### 2.3.2.1 CaCl<sub>2</sub>-Transformation

Das Medium einer zugewachsenen 10 cm Petrischale mit den zu transformierenden Zellen (ca.  $5 \times 10^7$  Zellen) wird durch 10 ml MES-Medium ersetzt und die Zellen mindestens 45 min bei 22°C inkubiert. Für die Transformation werden 5-8 µg Plasmid-DNA eingesetzt, zu dieser werden 300 µl 2x HBS und 300 µl H<sub>2</sub>O gegeben und unter moderatem Vortexen 38 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> zugetropft. Die so vorbereitete DNA wird weitere 10 Sekunden gevortext und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das MES-Medium wird abgezogen, die DNA-Suspension vorsichtig auf die Zellen getropft und für weitere 30 min bei 22°C inkubiert. Anschließend werden wieder 10 ml MES-Medium zu den Zellen gegeben und diese wird für weitere 3 h bei 22°C inkubiert. Das Medium wird abgezogen und 2 ml Schocklösung zunächst an den Rand der schräggehaltenen Petrischale gegeben, um dann durch rasches Absenken der Schale alle Zellen gleichzeitig für exakt 8 min mit der osmotischen Schocklösung zu bedecken. Abschließend wird die Schocklösung gründlich abgesaugt und 10 ml Medium ohne Selektion zu den Zellen gegeben. Diesen wird über Nacht Zeit gegeben sich zu regenerieren, am nächsten Tag wird das Medium durch Selektionsmedium ersetzt. Das Selektionsmedium wird ca. alle 3 Tage gewechselt, sobald viele tote Zellen im Medium zu erkennen sind. Nach etwa 10-14 Tagen sind resistente Klone mit einem Durchmesser von ca. 2 mm zu erwarten.

### 2.3.2.2 Elektro-Transformation von *Dictyostelium discoideum*

Pro Transformation werden  $3\text{-}5 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Die entsprechende Menge Zellsuspension wird für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $250\text{ g}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in  $20\text{ ml}$  kaltem, sterilen Phosphatpuffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation unter selben Bedingungen wird das Pellet in  $20\text{ ml}$  kaltem Elektroporationspuffer resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wird in  $300\text{ }\mu\text{l}$  kaltem Elektroporationspuffer resuspendiert, in Elektroporations-Küvetten gefüllt und sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend werden  $6\text{-}9\text{ }\mu\text{g}$  DNA zu den Zellen gegeben. Die Elektroporation erfolgt in einem Elektroporationsgerät bei einer Spannung von  $1\text{ kV}$  und einer Kondensatorkapazität von  $1\text{ }\mu\text{F}$ . Der Ansatz wird anschließend  $10\text{ min}$  bei  $22^\circ\text{C}$  inkubiert, in Reaktionsgefäße mit  $3\text{ }\mu\text{l}$   $0,1\text{ M}$   $\text{CaCl}_2$  und  $3\text{ }\mu\text{l}$   $0,1\text{ M}$   $\text{MgCl}_2$  (Endkonzentration je  $1\text{ mM}$ ) gegeben und bei  $22^\circ\text{C}$  für  $15\text{ min}$  mit  $150\text{ rpm}$  geschüttelt. Anschließend werden die Zellen auf Petrischalen mit  $10\text{ ml}$  Medium ohne Selektion gegeben. Das Medium wird nach einem Tag gegen Selektionsmedium ausgetauscht und ca. alle  $3\text{ Tage}$  gewechselt, sobald viele tote Zellen im Medium zu erkennen sind. Nach ca.  $10\text{-}14\text{ Tagen}$  sind resistente Klone zu erwarten.

### 2.3.3 5-FO-Selektion

Für die Selektion von  $\text{ura}^-$ -Zellen mit 5-Fluoroorotat (5-FO) werden  $5 \times 10^5\text{-}5 \times 10^6$  Zellen auf einer  $10\text{ cm}$  Petrischale in  $10\text{ ml}$  FM-Medium mit  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  Uracil und  $150\text{ }\mu\text{g/ml}$  5-FO ausplattiert. Nach drei Tagen Inkubation bei  $22^\circ\text{C}$  wird das Medium an einer vorher markierten Stelle vorsichtig abgesaugt und durch FM-Medium mit  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  Uracil und  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  5-FO ersetzt. Nach weiteren  $3\text{-}4\text{ Tagen}$  Inkubation bei  $22^\circ\text{C}$  wird das Medium gewechselt. Später wird es alle  $5\text{-}6\text{ Tage}$  gewechselt, wobei hierbei besonders darauf zu achten ist, dass sich keine Zellen vom Boden der Petrischale ablösen und so Sekundärklone von resistenten Zellen erzeugen. Nach  $2\text{-}3\text{ Wochen}$  sind in der Regel 5-FO-resistente Klone zu erkennen. Zur Dokumentation der Retrotranspositionsfrequenz und zur Erstellung einer Statistik werden die Klone pro Petrischale ausgezählt und auf Klone pro  $10^6$  Zellen umgerechnet. Teilweise werden diese Klone auch gepickt, kultiviert und für weitere Untersuchungen pelletiert.



## 2.3.4 Picken von Klonen

Mit einer 200 µl Pipette werden die Zellen eines ca. 2 mm großen Klons unter einem Mikroskop vorsichtig vom Boden gelöst, mit ca. 100 µl Medium aufgesaugt und in eine 24-Wellplatte gegeben, worauf sich die Zellen in ca. 30 min absetzen. Anschließend werden ca. 200 µl Medium vorsichtig am Rand jedes Wells zugetropft und die Zellen über Nacht bei 22°C kultiviert. Am nächsten Tag werden 500 µl Medium zugegeben und die Zellen bei 22°C kultiviert bis sie konfluent gewachsen sind, danach werden sie auf einer 10 cm Petrischale weiter kultiviert.

## 2.3.5 Herstellung von Gefrier-Stocks

### 2.3.5.1 DMSO-Gefrier-Stocks

In der Regel werden von jeder Kultur 5 DMSO-Stocks mit je  $1-4 \times 10^7$  Zellen hergestellt. Die benötigte Menge Zellsuspension wird für 5 min bei 4°C mit 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet pro Stock in 1,5 ml Medium (7,5 ml) ohne Selektion aufgenommen und je 1,5 ml der Suspension in je ein gekühltes Cryoröhrchen gegeben. Die Zellen werden 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wird 150 µl DMSO (Endkonzentration 10%(v/v)) pro Röhrchen zugegeben, diese werden sofort gevortext und für 2 h auf -20°C gekühlt, bevor die Stocks bei -80°C endgültig gelagert werden. Die Zellen werden so lange weiter in Kultur gehalten, bis einer von den fünf DMSO-Stocks aufgenommen und getestet wurde, in der Regel geschieht dies nach einem Tag Lagerung.

### Aufnahmen der DMSO-Gefrier-Stocks

Hierzu wird in eine kleine Petrischale 5 ml Medium ohne Selektion gegeben. In einem 37°C Wasserbad werden die Cryoröhrchen von -80°C schnell aufgetaut und zügig in einer Tischzentrifuge für ca. 5 s bei 16.000 g zentrifugiert, das Medium verworfen, das Pellet in ca. 0,5 ml Medium resuspendiert, auf die Petrischale gegeben und bei 22°C kultiviert. Nach 2-3 Tagen sind die Zellen in der Regel angewachsen, dann wird das selektionsfreie Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht.

### 2.3.5.2 Glycerin-Sporen-Stocks

Für jeden Stock werden  $1 \times 10^8$  Zellen verwendet, in der Regel wird pro Kultur ein Glycerinstock hergestellt. Die entsprechende Menge Zellsuspension wird in ein Falcon-Tube überführt und für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit 250 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen, das Pellet mit 20 ml kaltem, sterilen Phosphatpuffer resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml kaltem, sterilen Phosphatpuffer resuspendiert und auf eine Agarphosphatplatte gegeben. Die Zellen setzen sich in ca. 30 min ab, anschließend wird der Rest der Flüssigkeit abgesaugt und die Petrischale für ca. 5 min unter der sterilen Werkbank offen angetrocknet. Innerhalb von 2-3 Tagen differenzieren die Zellen zu ausgewachsenen Fruchtkörpern, diese werden mit 2 sterilen Zahnstochern von der Phosphatagarplatte abgeschabt und in Reaktionsgefäße mit 500  $\mu\text{l}$  86%(v/v) Glycerin gegeben. Anschließend wird die Suspension gevortext und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Zellen werden so lange in Kultur gehalten, bis der Glycerin-Stock getestet wurde, in der Regel geschieht dies nach einem Tag Lagerung.

### Aufnahmen von Glycerin-Sporen-Stocks

Um die Glycerin-Sporen-Stocks aufzunehmen wird je eine 5 cm Petrischale mit 5 ml HL5-Medium ohne Selektion gefüllt. Mit einem sterilen Zahnstocher werden einige Sporen des Glycerin-Gefrier-Stocks in das HL5-Medium gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass der Glycerinstock nicht auftaut und sofort wieder bei  $-80^\circ\text{C}$  weiter gelagert wird. Nachdem Beimpfen werden die Sporen bei  $22^\circ\text{C}$  inkubiert. Sobald sich nach ca. 2 Tagen die Amöben aus den Sporen entwickelt haben, wird das HL5-Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht.

Auch für Zellen, die in FM-Medium kultiviert werden gilt, dass alle Sporen in HL5-Medium aufgenommen werden, da die Sporen in Minimalmedium (FM) nicht anwachsen.

### 2.3.6 Herstellung von Zelllysaten (Pellets)

Um gDNA, RNA oder Proteine der *Dictyostelium discoideum*-Zellen sofort oder zu späteren Zeitpunkten isolieren zu können, werden Zell-Pellets hergestellt. Pro Pellet werden  $2 \times 10^7$  Zellen eingesetzt, die entsprechende Menge Zellsuspension wird in Falcon-Tube gegeben und für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit 250 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in ca. 20 ml kaltem Phosphatpuffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentri-

fugation unter gleichen Bedingungen wird das Pellet in 1 ml kaltem Phosphatpuffer pro zu erstellendem Pellet resuspendiert, je 1 ml in Reaktionsgefäße gegeben und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgezogen und verworfen. Die Pellets werden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.7 Präparation von genomischer DNA

Genomische DNA aus *D. discoideum* Zellen wird in der Regel mit dem DNeasy-Tissue-Kit von Qiagen präpariert. Pro Aufreinigungssäule erhält man aus  $2 \times 10^7$  Zellen ca. 5-10  $\mu\text{g}$  gDNA. Für Versuche, bei denen größere Mengen verdaubare gDNA benötigt wird, wie z. B. für die inverse PCR oder für einen Southernblot, wird diese durch CsCl-Aufreinigung gewonnen.

#### 2.3.7.1 CsCl gDNA-Aufreinigung

Für die Präparation der gDNA wird eine 250 ml Schüttelkultur *Dictyostelium discoideum* bis zu einer Dichte von ca.  $7 \times 10^6$  Zellen pro ml herangezogen. Die Zellen werden bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 1.000 g für 4 min abzentrifugiert, in 45 ml kaltem Phosphatpuffer aufgenommen und unter gleichen Bedingungen in einem 50 ml Falcon Tube ein zweites Mal zentrifugiert. Das Pellet wird in 25 ml kaltem gDNA-Lysepuffer resuspendiert, mit Pestle B des Gewebehomogenisators 5 mal homogenisiert und ein weiteres mal bei gleichen Zentrifugationsbedingungen pelletiert, wobei die Zellkerne nun ein weißes Pellet bilden sollten. Der Überstand wird vorsichtig verworfen, das Pellet in einem Endvolumen von genau 2 ml kaltem gDNA-Lysepuffer aufgenommen und genau 10 ml  $65^{\circ}\text{C}$  warmer gDNA-Puffer zugegeben. Exakt 11 g CsCl werden in ein Falcon Tube gewogen, die Kernsuspension zugegeben, für 2 h bei  $65^{\circ}\text{C}$  unter leichtem Schwenken inkubiert und dann auf RT abkühlen gelassen. Die Suspension wird zu 1 g Ethidiumbromid in ein Gradientenröhrchen gegeben und bei 130.000 g bei RT für 48 h in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die gDNA ist durch das angelagerte Ethidiumbromid gut sichtbar und sammelt sich als rote Bande etwa in der Mitte des Cäsiumchlorid-Gradienten. Das Röhrchen wird vorsichtig in ein Stativ eingespannt, und die gDNA-Bande durch seitliches Einstechen mit einer Kanüle (1,2 x 40 mm) vorsichtig abgesaugt (ca. 800  $\mu\text{l}$ ). Beim Herausziehen der Kanüle ist darauf zu achten, dass keine Cäsiumchlorid-Lösung aus dem Gradientenröhrchen ausläuft. Anschließend erfolgt eine EtOH-Fällung der gDNA, wobei diese nur vorsichtig getrocknet und anschließend mindestens 72 h in 600  $\mu\text{l}$  Low TE gelöst wird. Durch eine 20-stündige Dialyse in

Low TE wird die gDNA von dem verbliebenden CsCl gereinigt. Abschließend wird die DNA-Konzentration durch Messung der OD<sub>260</sub> bestimmt. Aus 250 ml einer dicht gewachsenen Schüttelkultur sollte man etwa 100-150 µg gDNA erhalten.

### 2.3.8 Präparation von Kernextrakten

*Dictyostelium discoideum* Zellen werden in Schüttelkultur bis zu einer Dichte von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml angezogen und für 5 min bei 4°C mit 1.000 g abzentrifugiert. Alle weiteren Schritte werden ebenfalls bei 0-4°C durchgeführt. Die Zellen werden zweimal in eiskaltem Wasser 5 min bei 1.000 g gewaschen und anschließend das Gewicht des Zellsediments bestimmt. Pro Gramm werden die Zellen in 7,5 ml Lysepuffer für Kernextrakte aufgenommen, 10 min inkubiert, mit Pestle A des Gewebehomogenisators homogenisiert und weitere 10 min inkubiert, anschließend werden die Zellen 5 mal mit Pestle B homogenisiert. Die Suspension enthält sowohl zytoplasmische, wie auch nukleäre Proteine. Die Zellkerne der aufgeschlossenen Zellen werden bei 12.500 g für 20 min sedimentiert. Der Überstand enthält nur die zytoplasmischen Proteine und wird verworfen, während das Gewicht des kernhaltigen Sediments bestimmt wird. Der Kernaufschluss erfolgt durch schrittweises Erhöhen der KCl-Konzentration, wobei die kernständigen Proteine eluiert werden. Dazu wird das Sediment pro Gramm in 1 ml Grundpuffer mit 15 mM KCl und 30 µg Leupeptin als Proteaseinhibitor aufgenommen, mit Pestle A homogenisiert, für 8 min inkubiert. Die Zellkerne werden für 7 min bei 12.500 g abzentrifugiert. Im nächsten Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 1 ml Grundpuffer mit 50 mM KCl und 30 µg/ml Leupeptin aufgenommen und unter gleichen Bedingungen erneut resuspendiert und pelletiert. Anschließend werden die Zellkerne mit 600 mM KCl und 30 µg/ml Leupeptin vollständig lysiert. Die drei Fraktionen werden vereinigt und mit 10 µg/ml Leupeptin versetzt. Die Entsalzung der Proteinüberstände erfolgt bei zweimaliger Dialyse gegen Grundpuffer mit 15 mM KCl und die erhaltenen Proteinlösungen nach erneuter Zugabe von 10 µg/ml Leupeptin in Aliquots bei -80°C gelagert.

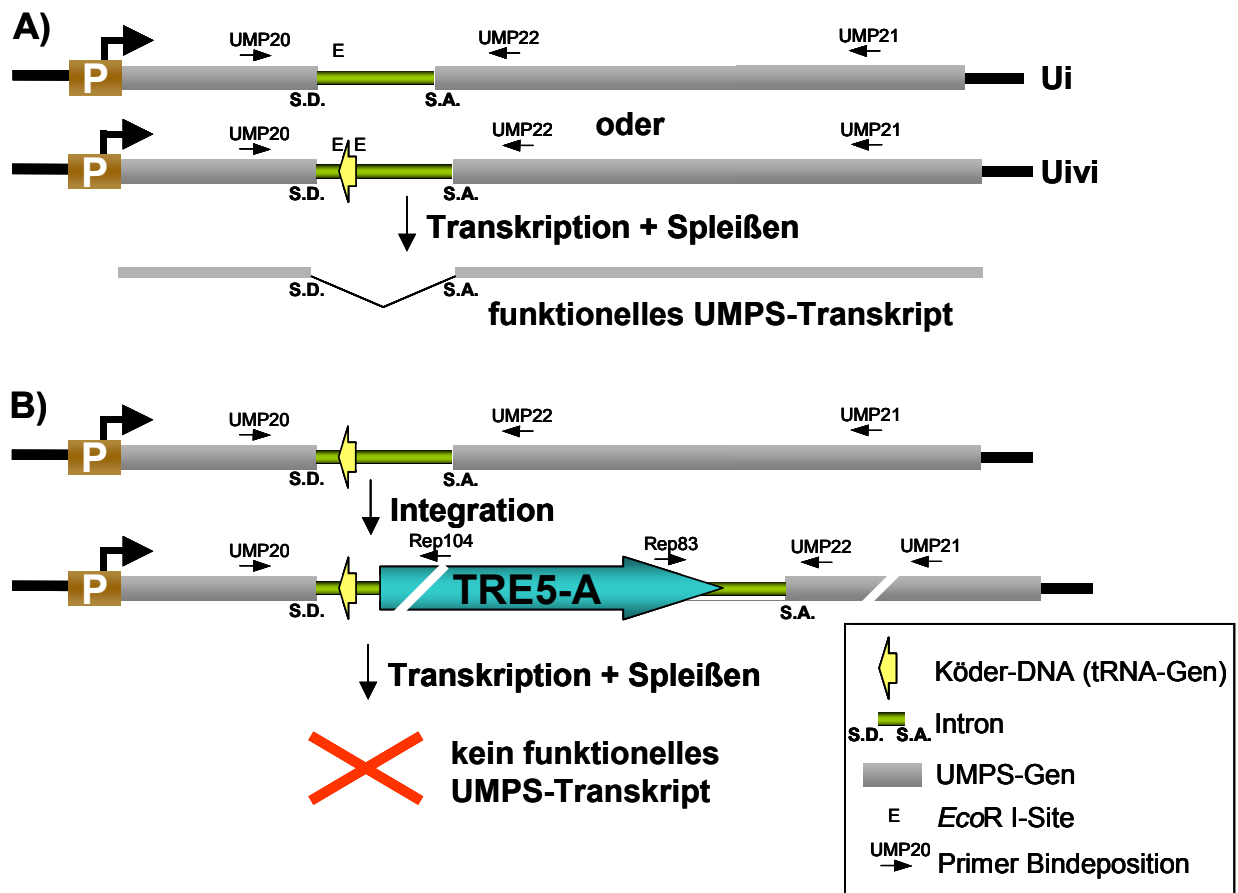
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung des Integrationszieles der TRE-Elemente

Die Non-LTR-Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum* (TRE-Elemente) erkennen tRNA-Gene als Integrationsziele. In einer früheren Arbeit wurde mit Hilfe der TRE-Falle an dem Beispiel des Val<sup>UAC</sup>-tRNA-Gens gezeigt, dass die kodierende Region dieses Gens ein Ziel für TRE-5-A-Elemente darstellt (Beck 2002). In der vorliegenden Dissertation sollte mit Hilfe der TRE-Falle für ein zweites tRNA-Gen gezeigt werden, dass dieses ein Integrationsziel für TRE-Elemente darstellt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die TRE-Elemente auch ein humanes tRNA-Gen als Integrationsziel erkennen und ob sie die Pol III-Transkriptionsfaktoren, die nur an ein aktives Pol III-Gen binden, zur Integration benötigen. Es sollte somit untersucht werden, ob die Präintegrationskomplexe der TRE-5-A-Elemente die tRNA-Gene sequenzspezifisch erkennen oder durch Interaktionen mit tRNA-Gen-spezifischen Transkriptionsfaktoren ihre Integrationsziele finden.

Die TRE-Falle ist ein *in vivo* Retrotranspositons-Testsystem, bei dem in DH1-Zellen, welche eine komplette Deletion des UMPS-Gens aufweisen (Caterina 1994), durch Transformation ein artifizielles UMPS-Gen in das Genom integriert wird. In diesem UMPS-Gen befindet sich das *cbfA*-Intron, worin eine Ködersequenz eingebracht werden kann. Das Intron mit der Ködersequenz wird funktionell aus dem UMPS-Gen gespleißt, sodass die transformierten Zellen einen *ura*<sup>+</sup>-Phänotyp besitzen und dadurch in uracilfreiem Medium wachsen können. Durch Integration eines Transposons in der Umgebung der Ködersequenz kann das Intron nicht mehr funktionell herausgespleißt werden und das UMPS-Gen wird somit zerstört. Zellen mit einer solchen Integration sind nicht mehr in der Lage in uracilfreiem Medium zu wachsen, sind aber resistent gegen das Zytostatikum 5-FO (Beck 2002, vgl. 1.2.5.1). Eine schematische Darstellung der TRE-Falle ist in Abbildung 3.1.1 gezeigt.

In der vorausgegangenen Arbeit wurden Integrationen in der Umgebung des Val<sup>UAC</sup>-Gens untersucht. Dabei konnten die Integrationssequenzen nur ermittelt werden, wenn das Val<sup>UAC</sup>-Gen die entgegengesetzte Orientierung des UMPS-Gens besaß.



**Abbildung 3.1.1: TRE-Falle**

Schematische Darstellung der TRE-Falle, bei der das *cbfA*-Intron in ein UMP5-Gen eingefügt wurde. In diesem Intron befindet sich die Sequenz, die als Integrationsziel überprüft werden soll. Dieses modifizierte UMP5-Gen wird stabil in DH1-Zellen transformiert. **A)** So lange wie keine Ködersequenz vorhanden ist (Ui) oder keine Integration in der Umgebung der Ködersequenz (in dem Fall ein tRNA-Gen) stattgefunden hat (Uivi), wird das Intron mit der Ködersequenz herausgespleißt. Die Zellen besitzen einen *ura*<sup>+</sup>-Phänotyp. **B)** Sobald eine Integration eines mobilen Elementes in der Umgebung der Ködersequenz stattgefunden hat, kann das Intron nicht mehr funktionell herausgespleißt werden und das UMP5-Gen nicht mehr funktionell exprimiert werden. Diese Zellen besitzen dadurch einem *ura*<sup>-</sup>-Phänotyp und sind resistent gegen das Zytostatikum 5-FO.

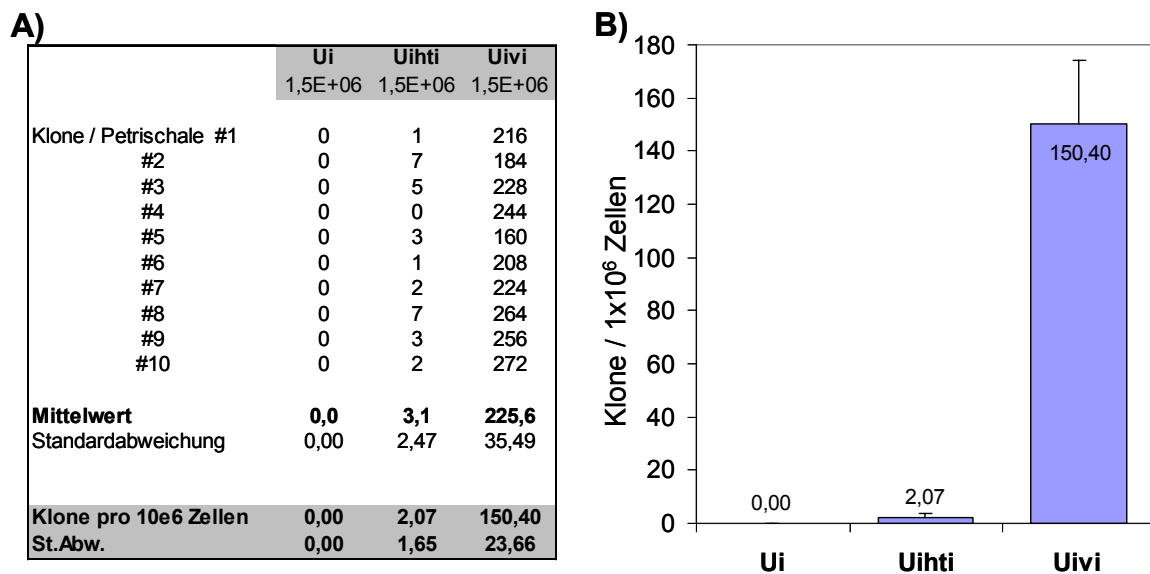
### 3.1.1 TRE-Integrationen an einem humanen Met<sup>CAU</sup>-Gen

#### Integrationsfrequenz

Um testen zu können, ob ein humanes tRNA-Gen in *D. discoideum*-Zellen ein Integrationsziel für TRE5-Elemente darstellt, wurde in den Vektor pUi, der die leere TRE-Falle besitzt, in umgekehrter Orientierung des UMP5-Gens die kodierende Region des hMet<sup>CAU</sup>-tRNA-Gens eingebracht (pUihti). Das humane Met<sup>CAU</sup>-tRNA-Gen zeigt ausser den internen Promotorregionen (A- und B-Box) keine Homologie zu *D. discoideum*-tRNA-Genen. Der Vektor pUihti wurde stabil in DH1-Zellen transformiert. Ein erhaltener *ura*<sup>+</sup>-Klon wurde kultiviert und so der Stamm Uihiti hergestellt. Von diesem Stamm wurde

genomische DNA hergestellt, die Sequenz des integrierten Konstruktes überprüft und Gefrierstocks von den Zellen hergestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen eine ähnliche Teilungsrates hatten wie die Zellen der Stämme Uivi und Ui und diese von dem Zeitpunkt der Transformation bis zu dem Anfertigen der Stocks gleich lange in Kultur waren.

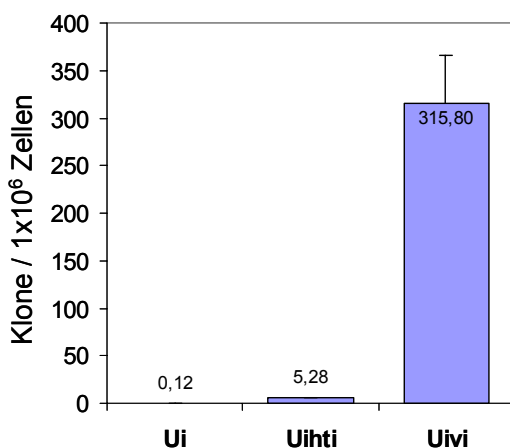
Um die Retrotranspositionsfrequenz an dem humanen tRNA-Gen zu bestimmen, wurde jeweils ein Klon der Stämme Ui, Uivi und Uihti in Kultur genommen und 5-FO-Selektionen mit je zehn Petrischalen mit jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen jedes Stammes durchgeführt.



**Abbildung 3.1.2: 5-FO-Selektion mit humanem Met<sup>CAU</sup>-Gen**

Dargestellt sind die Ergebnisse der 5-FO-Selektionen von den Stämmen Ui, Uihti und Uivi. Es wurden von jedem Stamm 10 Petrischalen mit je  $1,5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. **A)** Anzahl der Klone pro Petrischale **B)** grafische Darstellung der Anzahl der Klone auf  $1 \times 10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

Nach 18 Tagen Selektion wurden die sichtbaren Klone auf jeder Platte gezählt und auf die Anzahl der Klone pro  $1 \times 10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.2 dargestellt.



**Abbildung 3.1.3: Zweite 5-FO-Selektion mit humanem Met<sup>CAU</sup>-Gen**

Grafische Darstellung der Anzahl der 5-FO-resistenten Klone der Stämmen Ui, Uihti und Uivi mit je 10 Petrischalen mit jeweils  $5 \times 10^6$  eingesetzten Zellen pro Petrischale. Die Klonzahlen wurden auf  $1 \times 10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

Der Versuch wurde mit jeweils  $5 \times 10^6$  eingesetzten Zellen pro Petrischale und einem ähnlichem Ergebnis wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1.3 grafisch dargestellt. Die unterschiedlichen Absolut-Werte der Klonzahlen sind durch die Methode bedingt. Je länger die 5-FO-Selektion andauert, desto mehr resistente Klone werden sichtbar. Es ist aber in beiden Versuchen zu erkennen, dass die Retrotranspositionsfrequenz bei dem Stamm Uhti ca. 1,5% der Frequenz des Stammes Uivi beträgt und damit deutlich über dem Wert der natürlichen Mutationsrate ( $U_i$ ) liegt.

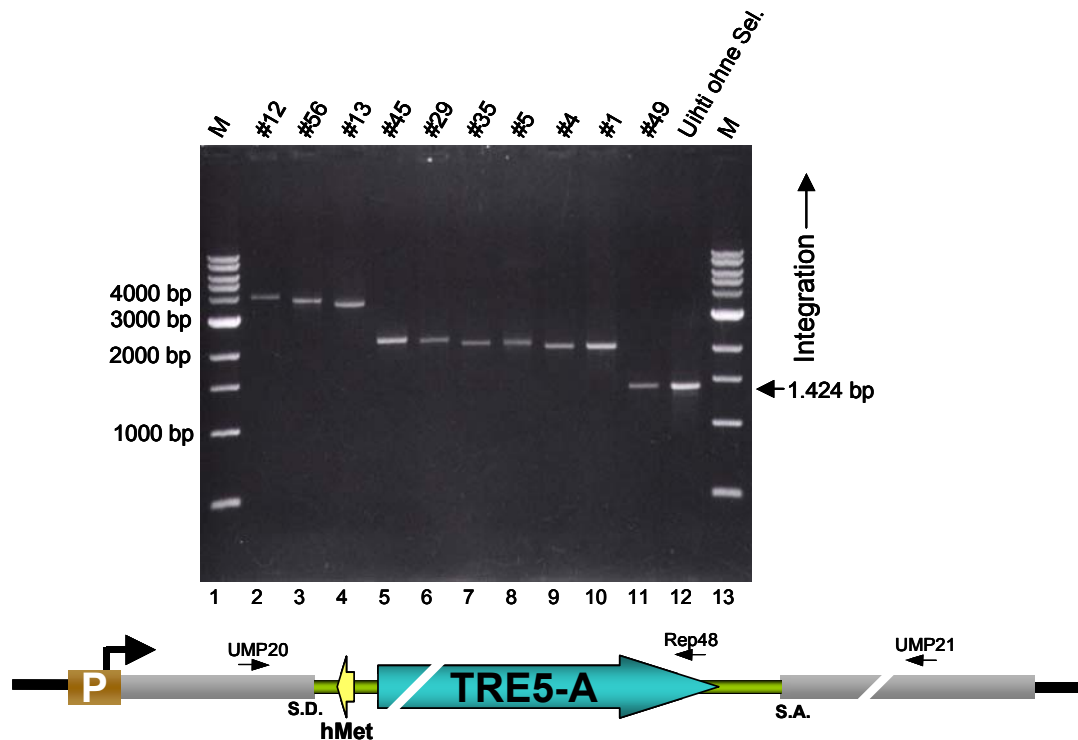
### Untersuchung der Integrationen

Um zu zeigen, dass es sich bei den 5-FO-resistenten Klonen um Zellen handelt, die ihre Resistenz durch Retrotranspositionen von TRE5-A-Elementen in die TRE-Falle erhielten, wurden 57 dieser Klone isoliert, kultiviert und genomische DNA von diesen Klonen präpariert. An diesen gDNAs wurde jeweils die Umgebung des Introns in dem UMPS-Gen mittels Long-Range-PCR mit den Primern UMP20 und UMP21 amplifiziert. Wenn keine Integration in dem UMPS-Konstrukt vorliegt, hat das PCR-Produkt eine Größe von 1.424 bp. Von den 57 untersuchten PCR-Produkten zeigten 40 eine größere Bande, sechs zeigten eine kleinere Bande und bei elf PCR-Produkten lag die Bandengröße bei ca. 1.400 bp. Zehn der 57 PCR-Produkte sind in Abbildung 3.1.4 repräsentativ für alle dargestellt.

Als Größenvergleich wurde ein PCR-Produkt, das an genomischer DNA des unselektierten Stamm Uhti hergestellt wurde, aufgetragen. PCR-Banden, die größer sind als 1.424 bp deuten auf eine Integration eines Transposons zwischen den beiden Primerbindstellen UMP20 und UMP21 hin. Bei den elf Klonen (z. B. #49), die ein PCR-Produkt in der Größe von ca. 1.400 bp ergaben, ist das UMPS-Gen wahrscheinlich durch die natürliche Mutationsrate und nicht durch eine Transposonintegration inaktiviert worden. Bei den sechs Klonen, die ein kleineres PCR-Produkt ergaben ist das UMPS-Gen wahrscheinlich durch eine Deletion zerstört worden. Dies ist auch in der vorausgegangenen Arbeit beobachtet worden (Beck 2002).

Die unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte an den 40 Klonen mit Integrationen lassen sich zum einen dadurch erklären, dass Non-LTR-Retrotransposons während ihrer Integration häufig 5'-verkürzen und zum andern dadurch, dass komplette TRE5-A-Elemente unterschiedlich viele A-Module besitzen können.



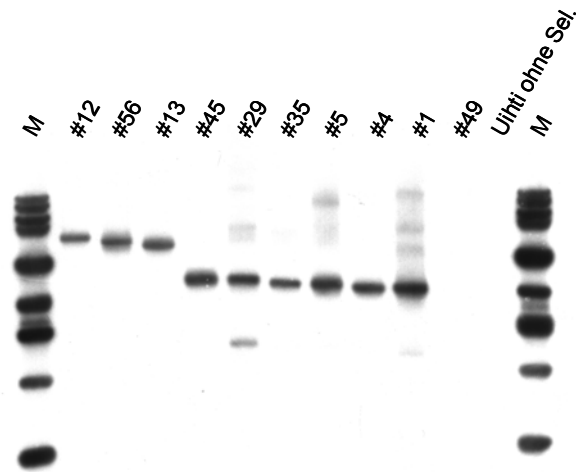


**Abbildung 3.1.4: UMP20/21 PCR an 5-FO-resistenten Uihti Klonen**

Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung. Auf ein 1%iges Agarosegel wurden in den Spuren 2-11 zehn von 57 repräsentativ ausgewählte PCR-Produkte aufgetragen. Die PCRs wurden mit den Primern UMP20 und UMP21 an genomischen DNAs von 5-FO-resistenten Klonen des Stammes Uihti durchgeführt. Als Größenvergleich wurde in Spur 12 ein PCR-Produkt, das mit denselben Primern an genomischer DNA des unselektionierten Stamm Uihti hergestellt wurde aufgetragen. Als Größenmarker wurde in den Spuren 1 und 13 eine 1 kb-Leiter der Fa. NEB aufgetragen.

### Nachweis der Art der Integration

Der Nachweis, dass tatsächlich TRE5-A-Integrationen die Ursache für die größeren PCR-Produkte sind, erfolgte mittels Southernblot-Analyse des Agarosegels aus Abbildung 3.1.4. Hierbei wurde mit einer radioaktiven Sonde des 3'-Endes eines TRE5-A-Elementes hybridisiert. Die Sonde wurde mit einer radioaktiven PCR mit dem Primer Rep48 an dem Plasmid pGEMasORF hergestellt. Der Primer Rep48 bindet an den 3'-Enden von TRE5-Elementen komplementär an den (+)-Strang. Das Plasmid pGEMasORF besteht aus einem pGEM<sup>®</sup>T-Vektor, in den die hinteren 2.200 bp eines TRE5-A-Elementes ligiert wurden. Das Autoradiogramm dieses Southernblots ist in Abbildung 3.1.5 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle PCR-Banden, die größer als etwa 1.400 bp waren, mit der Sonde hybridisieren. Wie zu erwarten war, hybridisierten die ca. 1.400 bp große PCR-Bande des Klons #49 und die Bande der Größenkontrolle nicht mit der Sonde.



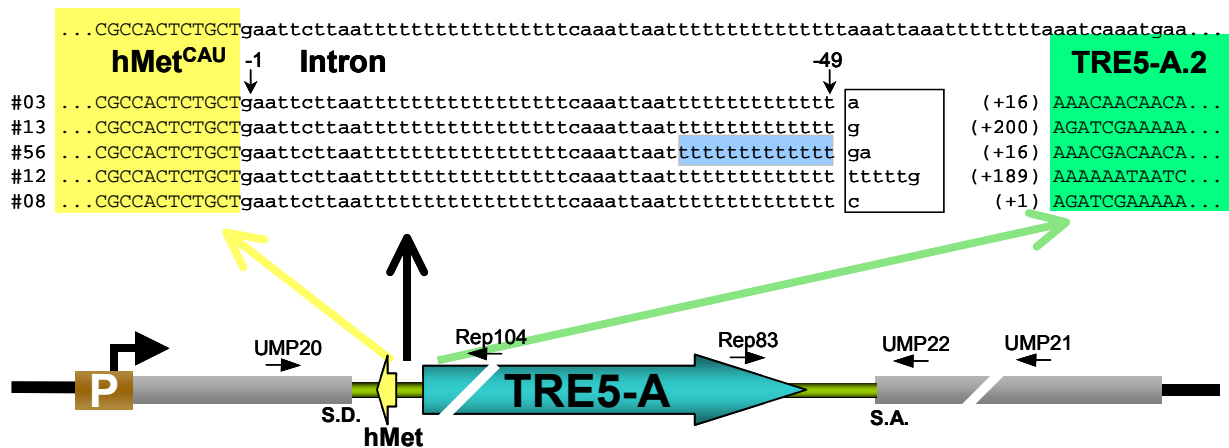
**Abbildung 3.1.5: Southernblot Uinti UMP20/21 PCRs gegen TRE5-A**

Das Agarosegel aus Abbildung 3.1.4 wurde auf eine Membran geblottet und anschließend mit der radioaktiven Sonde des 3'-Endes eines TRE5-A-Elementes hybridisiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm dieses Southernblots.

Bei markierten Sonden, die mit einer radioaktiven PCR an einem ungeschnittenen Vektor hergestellt werden, wird auch Vektorsequenz radioaktiv markiert. Da die Größen-Marker der Fa. NEB aus PCR-Produkten von Standard-Vektoren hergestellt werden (Information von NEB), hybridisiert auch der Größenmarker mit der Sonde. Sowohl die Größenkontrolle in Spur 11, als auch die PCR-Bande des Klons #49 hybridisierten nicht mit der Sonde. Daran ist zu erkennen, dass die Sonde nicht unspezifisch an DNA bindet, sondern dass es sich bei diesen Klonen um TRE5-A-Integrationen handelt.

### Bestimmung der Integrationsorte

Zur Bestimmung des genauen Integrationsortes und der Orientierung der TRE5-A-Elemente in der Umgebung des hMet-Gens wurden UMP20/21-PCR-Produkte von den Klonen #3, #8, #12, #13 und #56 aufgereinigt. Die Klone wurden so ausgesucht, dass man anhand der Größe des UMP20/21-PCR-Produktes darauf schließen konnte, dass es sich um Integrationen von nahezu kompletten TRE5-A.2 Elementen handelte. Die PCR-Produkte wurden direkt mit dem Primer hMetCAU-rev sequenziert. Wenn dies keine auswertbaren Sequenzen ergab, wurde ein kleineres Stück der isolierten Bande über eine Nested-PCR mit den Primern UMP20 und Rep104 amplifiziert. Der Primer Rep104 bindet sowohl in TRE5-A.1, wie auch in TRE5-A.2 Elementen komplementär an den (+)-Strang ca. bei Position 500 in Richtung des 5'-Endes des Elementes. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und in *E. coli*-Zellen transformiert. Anschließend wurden Minilysate hergestellt und diese mit dem Primer hMetCAU-rev sequenziert. In Abbildung 3.1.6 sind die Sequenzen dieser fünf Klone dargestellt. Bei allen Klonen ist entweder ein komplettes oder ein 5'-verkürztes TRE5-A.2-Element im Abstand von 49 bp vor dem humanen tRNA-Gen in die TRE-Falle integriert. Es sind zwischen ein und sechs zusätzliche Nukleotide integriert worden.



**Abbildung 3.1.6: TRE-Integrationsorte vor dem humanen Met<sup>CAU</sup>-tRNA-Gen**

Dargestellt sind die Sequenzen und der Abstand vom 5'-Ende des tRNA-Gens bis zum 5'-Ende der TRE5-A-Elemente von fünf 5-FO-resistenten Klonen des Stammes Uiht. In allen Klonen sind die z.T. 5'-verkürzte Integrationen von TRE5-A.2-Elementen im Abstand von 49 bp vor dem tRNA-Gen gefunden worden. Die Position der ersten Base des Transposons ist in Klammern angegeben, die durch die Retrotransposition zusätzlich eingefügten Nukleotide stehen in der Box vor den Klammern. Das 5'-Ende des hMet-Gens ist gelb unterlegt, die TRE5-Elemente grün und die untersuchte TSD bei Klon #56 ist blau unterlegt.

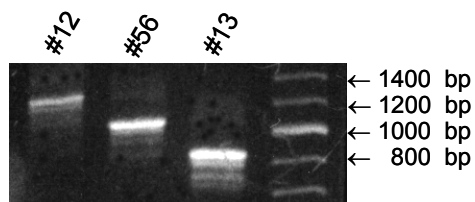
Da alle untersuchten Transposons in einen T-Stretch integrierten und in Klon #12 mehrere Thymidin-Moleküle zusätzlich integriert wurden, war der Integrationsort für diesen Klon nicht auf die Base genau zu ermitteln. Er liegt aber in dem erwarteten Bereich ca. 50 bp unterhalb des tRNA-Gens.

Für einen Klon sollte exemplarisch gezeigt werden, dass es sich bei der Integration um eine orthodoxe Integration eines TRE-Retrotransposons handelt. Um die 3'-Seite des integrierten TRE-Elementes in Klon #56 sequenzieren zu können, wurde eine Nested-PCR mit den Primern Rep83 und UMP22 an dem UMP20/21-PCR-Produkt von Klon #56 durchgeführt. Der Primer Rep83 bindet komplementär an den (-)-Strang, ca. 50 bp vor dem 3'-Ende von TRE5-A Elementen. Der Primer UMP22 bindet im UMPS-Gen ca. 100 bp hinter der Splice-Akzeptor-Site des Introns. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und mit dem Primer Rep83 sequenziert.

Das TRE5-A.2-Element in Klon #56 besitzt einen Poly-A-Anhang von 13 bp und hat an der Integrationsstelle eine TSD von 13 bp (TTTTTTTTTTTTT) erzeugt. Somit konnte für das integrierte Transposon in Klon #56 gezeigt werden, dass es orthodox in das Genom integriert wurde.

### Untersuchung der Anzahl der A-Module der integrierten Transposons

Um die Anzahl der A-Module der komplett integrierten TRE5-A.2-Elemente zu bestimmen wurde exemplarisch an den aufgereinigten UMP20/21-PCR-Produkten der Klone #12, #13 und #56 eine PCR mit den Primern UMP20 und neo9 durchgeführt. Der Primer neo9 bindet im B-Modul komplementär an den (+)-Strang, in Richtung des 5'-Endes der Elemente. Bei einer Integration eines TRE5-A-Elementes mit einem kompletten A-Modul würde das PCR-Produkt eine Größe von ca. 980 bp besitzen. Jedes zusätzliche A-Modul würde das PCR-Produkt um 200 bp vergrößern. In Abbildung 3.1.7 konnte zusammen mit den Sequenzdaten aus Abbildung 3.1.16 gezeigt werden, dass das komplette A-Modul des Transposon in Klon #12 fehlt, während das TRE5-A-Element in Klon #56 ein um 16 bp verkürztes A-Modul besitzt. Das Element in Klon #13 besitzt zwei komplette A-Module und die hinteren 11 bp eines verkürzten, dritten A-Moduls. Diese Daten korrelieren mit den unterschiedlichen Bandengrößen in Abbildung 3.1.4.



**Abbildung 3.1.7: Anzahl der A-Module**

Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung. Auf ein 1,2%iges Agarosegel wurden die PCR-Produkte der Klone #12, #56 und #13 mit den Primern UMP20 und neo9 aufgetragen. Als Template wurde jeweils das aufgereinigte UMP20/21-PCR-Produkt der Klone verwendet.

### 3.1.2 Integrationen in der Umgebung des Glu<sup>Sup</sup>-Gens

Nachdem Val<sup>UAC</sup>-Gen sollte für ein zweites *D. discoideum*-tRNA-Gen gezeigt werden, dass dieses als Integrationsziel für TRE-Elemente erkannt wird. Dazu wurde das *amber*-Suppressor-tRNA-Gen des Glu<sup>UUC</sup>-Gens (Glu<sup>Sup</sup>) gewählt. Mit diesem Gen konnten später Aktivitäts-Untersuchungen durchgeführt werden (vgl. 3.1.4 und 3.1.5.2).

Das Glu<sup>Sup</sup>-Gen wurde mit den Primern Glu1 und Glu2T mittels PCR von dem Plasmid pGTET BSR+1(amber) amplifiziert und in beiden Orientierungen in die leere TRE-Falle des Vektors pUi kloniert. Der Vektor pUig enthält das Glu<sup>Sup</sup>-Gen in Orientierung des UMPS-Gens, während es in dem Vektor pUigi die umgekehrte Orientierung besitzt. Im Gegensatz zu dem Val<sup>UAC</sup>-Gen in pUivi enthält das klonierte Glu<sup>Sup</sup>-Gen neben der kodierenden Sequenz zusätzlich seine Terminatorsequenz.

Durch Transformation der Plasmide pUig und pUigi in den Stamm DH1 wurden die Stämme Uig und Uigi hergestellt. Es wurden von jedem Stamm fünf unabhängige Klone kultiviert und Gefrierstocks von den Zellen hergestellt.

Um Integrationen in der Umgebung des Glu<sup>Sup</sup>-Gens untersuchen zu können, wurden die Zellen in Kultur genommen und 5-FO-Selektionen durchgeführt. Von den beiden Stämmen wurden 18 (Uig) bzw. 26 (Uigi) 5-FO-resistente Klone kultiviert und gDNA von den Zellen isoliert. An diesen gDNAs wurden PCRs mit den Primern UMP20 und UMP21 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). PCR-Banden die größer als die Kontrolle an der leeren TRE-Falle waren und damit auf eine Integration eines Transposons hindeuteten, wurden isoliert. Die Art und der Abstand der Integrationen in der Umgebung des Glu<sup>Sup</sup>-Gens wurden durch Sequenzanalyse mit dem Primer Glu2T überprüft. Wenn dies nicht direkt an den isolierten PCR-Produkten möglich war, wurden die Integrationsbereiche als Nested-PCRs in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und anschließend sequenziert. Die flankierenden Sequenzen der integrierten TREs in beiden Stämmen sind in Abbildung 3.1.8 und Abbildung 3.1.9 dargestellt.

Die Unterscheidung zwischen integrierten TRE5-A.1- und TRE5-A.2-Elementen wurde mittels PCR an den aufgereinigten UMP20/UMP21-PCR-Produkten durchgeführt. Dazu wurden Nested-PCRs mit dem Forward-Primer Rep114, der komplementär an den (-)-Strang von TRE5-A-Elementen bindet durchgeführt. Als Reverse-Primer wurde der Primer Rep113 gewählt. Dieser Primer ergibt zusammen mit dem Primer Rep114 in TRE5-A.2-Elementen ein PCR-Produkt von 226 bp, während sie in TRE5-A.1-Elementen ein PCR-Produkt von 3.360 bp ergeben. Zusätzlich wurde eine PCR mit den Primern Rep114 und Rep94 durchgeführt. Diese PCR ergibt in TRE5-A.1-Elementen ein PCR-Produkt von 516 bp, während diese PCR in TRE5-A.2-Elementen nicht funktioniert.

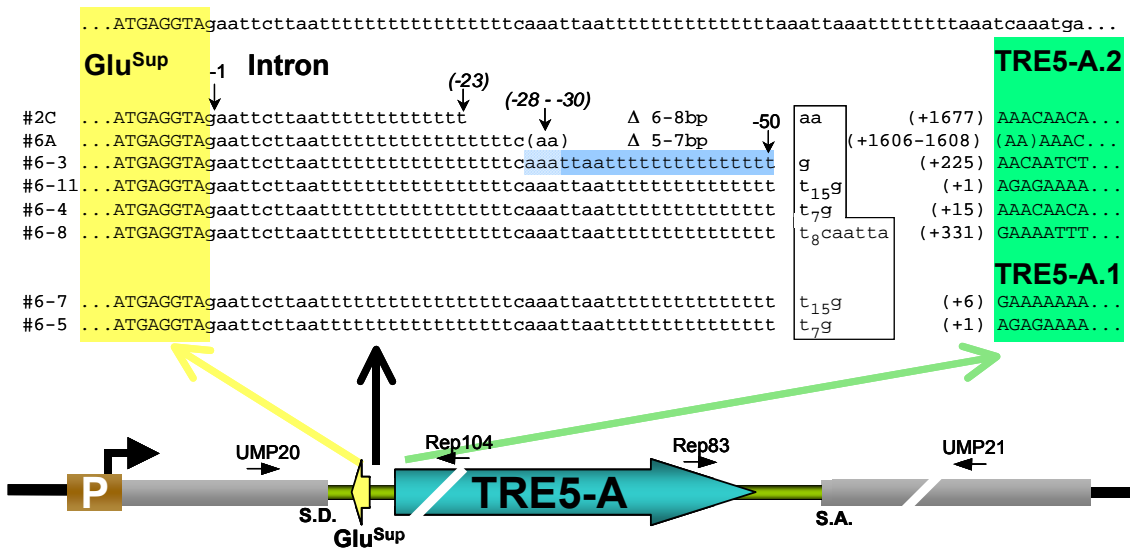
### Uigi

Bei den untersuchten Integrationen in dem Stamm Uigi handelte es sich in zwei Klonen um TRE5-A.1- und in sechs Klonen um TRE5-A.2-Elemente (Daten nicht gezeigt).

Alle acht untersuchten Integrationen lagen in längeren T-Stretchen. Bei mehreren dieser Klone wurden zusätzlich bis zu 15 Thymidine eingefügt, sodass eine exakte Festlegung der Integrationsorte auf die Base genau für diese Klone nicht zu ermitteln war, sie liegen aber in dem erwarteten Bereich ca. 50 bp unterhalb des tRNA-Gens. Bei Klon #6-3 wurden keine zusätzlichen Thymidine eingefügt. Das integrierte Transposon in diesem Klon besaß einen Abstand von 50 bp zu dem Glu<sup>Sup</sup>-Gen.

Für einen Klon sollte analog zu 3.1.1 repräsentativ gezeigt werden, dass es sich um eine orthodoxe Integration eines TRE5-Transposons handelt. Dazu wurde das gereinigte UMP20/21 PCR-Produkt des Klons #6-3 mit dem Primer Rep83 sequenziert. Auf der 5'-Seite der TSD befinden sich drei Adenine, daher konnte nicht genau bestimmt werden,

ob diese auf der 3'-Seite des Elementes durch die TSD oder durch den Poly-A-Anhang des Retrotransposons entstanden sind. Die Länge der TSD beträgt 19-21 bp ((AAA)TTAATTTTTTTTTTTTTTTT) und die Länge des Poly-A-Anhangs beträgt 14-17 bp. Dies zeigt, dass dieses Element orthodox vor dem Glu<sup>Sup</sup>-Gen integriert wurde.



**Abbildung 3.1.8: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Uigi**

Dargestellt sind die Sequenzen und der Abstand von dem 5'-Ende des tRNA-Gens bis zu den 5'-Enden der TRE5-A-Elemente von acht 5-FO-resistenten Klonen des Stammes Uigi. Es handelt sich um Integrationen von zwei TRE5-A.1-Elementen und sechs TRE5-A.2-Elementen vor dem tRNA-Gen. Die Position der ersten Base des Transposons ist in Klammern angegeben. Die durch die Retrotransposition zusätzlich eingefügten Nukleotide stehen in der Box vor den Klammern. Das 5'-Ende des Glu-Genes ist gelb unterlegt, die TRE5-A-Elemente grün und die TSD bei Klon #6-3 ist blau unterlegt. Bei den drei Adeninen auf der 5'-Seite der TSD in Klon #6-3 kann nicht festgelegt werden, ob diese auf der 3'-Seite des Elementes durch die TSD oder durch den Poly-A-Anhang des Transposons entstanden sind. In den Klonen #2C und #6A sind Zielsequenz-Deletionen von 6-8 bzw. 5-7 bp aufgetreten, durch diese Deletionen sind keine TSDs vorhanden und der ursprüngliche Abstand zu dem tRNA-Gen konnte nicht bestimmt werden. Durch eine Mikrohomologie (AA) konnte in Klon #6A der exakte Abstand und das erste Nukleotid des integrierten Transposons nicht bestimmt werden. Die Mikrohomologie ist in Klammern angegeben.

An dem Integrationsort in Klon #6A ist eine Mikrohomologie von 2 bp beobachtet worden. Daher konnte nicht festgelegt werden, ob diese Basen zu dem integrierten Retrotransposon oder zu der Zielsequenz gezählt werden müssen.

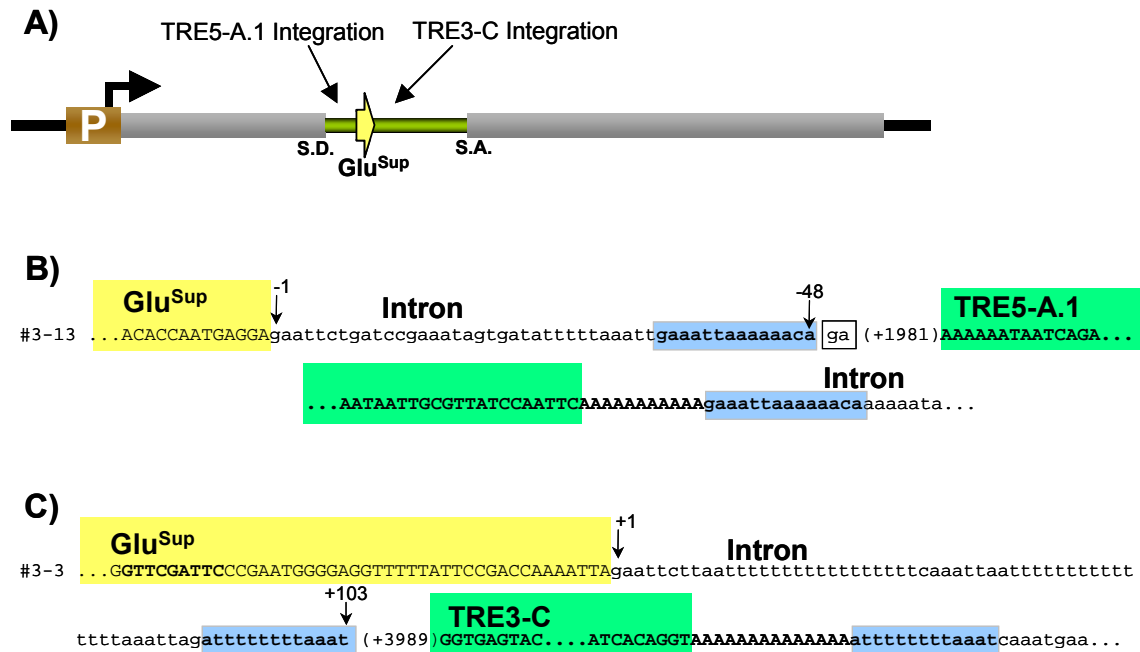
Die Integrationen der Klone #2C und #6A wiesen mit 23 bp (#2C) und 28-30 bp (#6A) einen sehr kurzen Abstand zu dem tRNA-Gen auf. Aus diesem Grund wurden diese beiden Integrationen näher untersucht. Dazu wurden die 3'-Seiten der integrierten Elemente als Nested-PCRs mit den Primern Rep83 und UMP22 an dem gereinigten UMP20/UMP21 PCR-Produkten in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und anschließend sequenziert.

An der Integrationsstelle in Klon #2C ist eine Deletion der Zielsequenz von 6-8 bp (TTTTCA(AA)) und in Klon #6A ist eine Deletion von 5-7 bp (AAATT(AA)) beobachtet worden. Die deletierten Bereiche in beiden Klonen enden jeweils mit zwei Adeninen, sodass ihre Länge und die Länge des Poly-A-Anhangs der integrierten Transposons nicht

exakt bestimmt werden konnte. Beide Integrationen weisen keine TSDs auf. Daher ist davon auszugehen, dass die Deletionen während der Integration der 5'-Enden dieser beiden Elemente entstanden sind. Aufgrund der Deletionen ist der ursprüngliche Abstand zu dem tRNA-Gen und das ursprünglich erste Nukleotid des integrierten TRE5-Retrotransposons nicht genau zu ermitteln. Da die 3'-Enden der Elemente mit den flankierenden Sequenzen bekannt sind, kann man die Größe der Deletionen und damit den ursprünglichen Abstand zu dem tRNA in etwa abschätzen. Die Zielsequenz-Deletion setzt sich aus der TSD und den fehlenden Basen im Vergleich zur Originalsequenz zusammen. Wenn man für die beiden Integrationen eine ähnliche Länge der TSDs annimmt, wie bei den anderen Integrationen in dieser Arbeit ermittelt wurde (11-21 bp), so ergibt sich ein ursprünglicher Abstand der Integrationen zum tRNA-Gen von ca. 50 bp. Dies entspricht dem erwarteten Abstand. Zielsequenz-Deletionen wurden auch bei Integrationen von LINE-Elemente in anderen Organismen beobachtet (Gilbert 2005).

### Uig

Bei den zwei untersuchten Integrationen in dem Stamm Uig handelt es sich bei Klon #3-13 um die Integration eines verkürzten TRE5-A.1-Elementes 48 bp oberhalb des Glu<sup>Sup</sup>-Gens, während in Klon #3-3 ein 5'-verkürztes TRE3-C Element integriert wurde. Das TRE3-C Element wurde in einem Abstand von 103 bp unterhalb des Glu<sup>Sup</sup>-Gens integriert und besitzt damit den natürlichen Abstand von TRE3-C-Elementen zu tRNA-Genen. Beide Integrationen weisen mit 14 bp (GAAATTA AAAACA, TRE5-A.1), bzw. 13 bp (ATTTTTTTTAAAT, TRE3-C) typische TSDs auf. Durch weitere PCR-Analysen analog zu 3.1.1 konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem TRE5-A.1-Element in Klon #3-13 um ein komplettes TRE5-A.1 Element handelt, welches zwei A-Module besitzt, von denen das erste um 189 bp verkürzt ist.



**Abbildung 3.1.9: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Uig**

Dargestellt sind die flankierenden Sequenzen und der Abstand zu dem  $\text{Glu}^{\text{Sup}}$ -Gen der beiden TRE-Elemente in den beiden 5-FO-resistenten Klonen des Stammes Uig. **A)** Übersicht der TRE-Falle mit dem  $\text{Glu}^{\text{Sup}}$ -Gen. **B)** Integration eines 5'-verkürzten TRE5-A.1 Elementes auf der 5'-Seite des  $\text{Glu}^{\text{Sup}}$ -Gens in Klon #3-13. **C)** Integration eines 5'-verkürzten TRE3-C Elementes auf der 3'-Seite des  $\text{Glu}^{\text{Sup}}$ -Gens in Klon #3-3.

Die Position der ersten Base des Transposons ist in Klammern angegeben. Die durch die Retrotransposition zusätzlich eingefügten Nukleotide stehen in der Box vor den Klammern. Das  $\text{Glu}^{\text{Sup}}$ -Gen ist gelb unterlegt, die TRE-Elemente grün und die erzeugten TSDs sind blau unterlegt.

### 3.1.3 Untersuchungen der Promotorregionen von tRNA-Genen

#### 3.1.3.1 *in silico* Untersuchungen

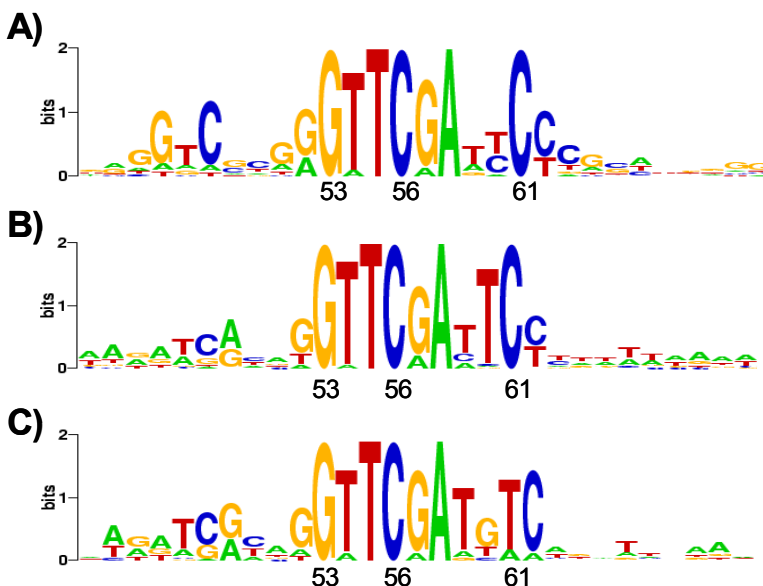
Für drei unabhängige tRNA-Gene ( $\text{dVal}^{\text{UAC}}$ ,  $\text{dGlu}^{\text{Sup}}$  und  $\text{hMet}^{\text{CAU}}$ ) konnte gezeigt werden, dass die kodierenden Regionen dieser Gene Integrationsziele für TRE-Elemente darstellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die flankierenden Sequenzen der tRNA-Gene für die Integrationen nicht benötigt werden. Die Erkennungssequenz der TRE-Elemente muss daher innerhalb dieser Gene liegen.

Da die Promotorregionen aller tRNA-Gene stark konserviert sind, sollten die A- und B-Boxen von *D. discoideum*-tRNA-Genen näher untersucht werden.



## B-Box Untersuchungen

Das 2005 fertiggestellte *Dictyostelium*-Genomprojekt hat gezeigt, dass es 390 tRNA-Gene im *Dictyostelium*-Genom gibt. Die B-Box liegt in tRNA-Genen an Position 53 bis 61. Um die exakte Konsensus-Sequenz der B-Boxen von *D. discoideum*-tRNA-Genen zu erhalten, wurde für die B-Boxen aller 390 tRNA-Gene inklusive 10 bp flankierender Sequenz ein Alignment erstellt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die konservierte Domäne der B-Boxen in *D. discoideum* der Konsensus-Sequenz anderer eukaryotischer B-Boxen (GTTCRANYC) folgt. Zusätzlich konnte 4 bp oberhalb dieser Konsensussequenz in *D. discoideum*-tRNA-Genen die konservierte Basenfolge GTC gefunden werden. Das Alignment der *D. discoideum*-B-Boxen wurde mit dem Programm Weblogo (Crooks 2004) durchgeführt und ist in Abbildung 3.1.10.A dargestellt.



**Abbildung 3.1.10:**  
**Alignment der B-Boxen**

Dargestellt ist ein Alignment des GTTCRANYC Konsensus-Motivs der B-Boxen von *D. discoideum*-tRNA-Genen inklusive der 10 flankierenden Basenpaaren für **A)** die internen B-Boxen aller tRNA-Gene (n=390), **B)** die externen B-Boxen (n=231) und **C)** für die modifizierten B-Boxen. Die Sequenzlogos wurden mit dem Programm WebLogo erzeugt (<http://weblogo.berkeley.edu>)

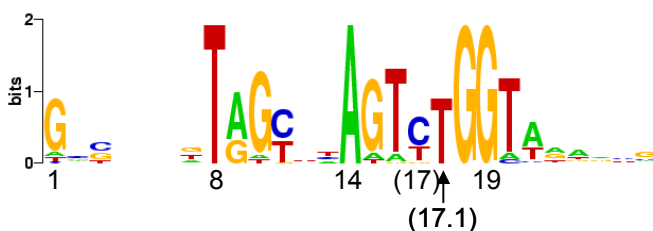
Aus der Literatur ist bekannt, dass ca. 19-35 bp unterhalb vieler *D. discoideum*-tRNA-Gene ein externes B-Box-Motiv konserviert ist (Hofmann 1991), und dass der Transkriptionsfaktor TFIIIC an die externe B-Box von tRNA-Genen bindet (Bukenberg 1994).

In bisherige Arbeiten wurden nur ca. 60 tRNA-Gene auf die Anwesenheit einer externen B-Box untersucht. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit auf die flankierenden Regionen aller 390 tRNA-Gene ausgeweitet. Dabei stellte sich heraus, dass sich unterhalb von 261 tRNA-Genen (= 67%) eine externe B-Box in einem durchschnittlichen Abstand von 41 bp (33-60 bp) zu der internen B-Box befindet. 87% dieser externen B-Boxen besaßen einen Abstand von 37-43 bp zu der internen B-Box. Im Gegensatz zu den internen B-Boxen ist oberhalb der externen B-Boxen das Motiv GTC nicht konserviert. Durch einen Sequenzvergleich konnten die externen B-Boxen in zwei Gruppen unterteilt werden. 231 externe B-Boxen zeigten eine sehr starke Homologie zu der Konsensus-Sequenz der

internen B-Box. Das Alignment dieser externen B-Boxen ist in Abbildung 3.1.10.B dargestellt. Die restlichen 30 gefundenen externen B-Boxen scheinen ein zusätzliches Nukleotid (oftmals ein Guanin) an Position 60 zu besitzen und so eine Base länger zu sein als die restlichen B-Boxen. Das Alignment dieser modifizierten externen B-Boxen ist in Abbildung 3.1.10.C dargestellt. Über die Funktion der externen B-Box ist nicht viel bekannt. Die starke Konservierung deutet aber darauf hin, dass die externen B-Boxen eine Funktion besitzen.

### A-Box Untersuchungen

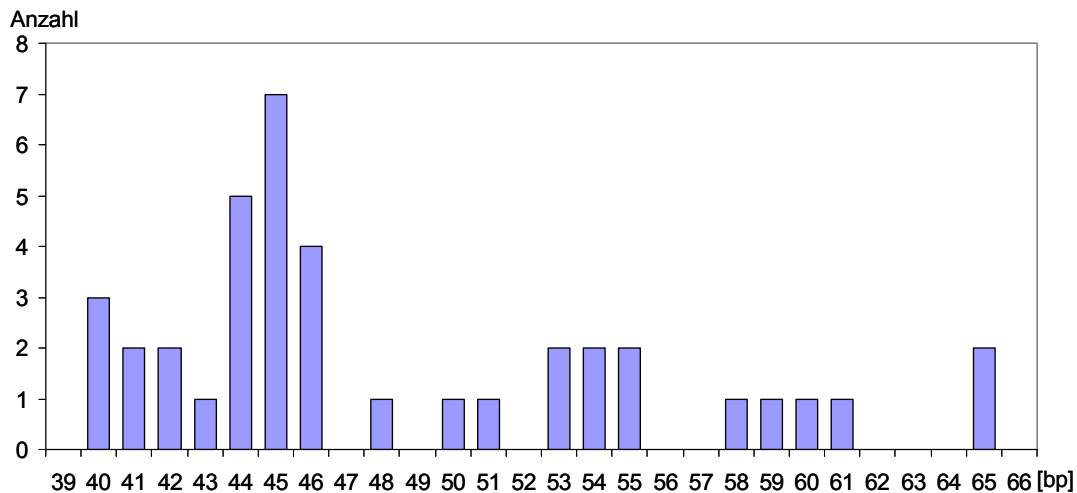
Es wurde ebenfalls ein Alignment der 5'-Enden aller 39 in *Dictyostelium discoideum* gefundenen tRNA-Gen-Familien inklusive der A-Box erstellt. Das Alignment ist in Abbildung 3.1.11 dargestellt. Die A-Box befindet sich in tRNA-Genen an Position 8 bis 19, wobei nicht alle tRNA-Gene die Nukleotide 17 und 17.1 besitzen. Die A-Boxen zeigen die Konsensus-Sequenz  $T^8RGYNNA^{14}RT(N^{17}N^{17.1})GG^{19}$ , die eine Länge von 11 bis 13 bp aufweist.



**Abbildung 3.1.11: Alignment der A-Boxen**  
Dargestellt ist ein Alignment der ersten drei Nukleotide, sowie der A-Boxen aller *D. discoideum*-tRNA-Gene. Die Sequenzlogos wurden mit dem Programm WebLogo erzeugt (<http://weblogo.berkeley.edu>).

### Abstände zwischen A- und B-Boxen

Der Transkriptionsfaktor TFIIC bindet sowohl an die A-Box, wie auch an die B-Box von tRNA-Genen. Für *D. discoideum*-tRNA-Gene konnte bisher nur gezeigt werden, dass TFIIC an die B-Box bindet (Bukenberg 1994). Um sich einen besseren Überblick verschaffen zu können, wie TFIIC an die DNA der tRNA-Gene gebunden wird, wurden die Abstände zwischen der A- und der B-Box aller 39 gefundenen tRNA-Gen-Familien ermittelt. Eine Übersicht der Abstände dieser beiden Promotorregionen ist in Abbildung 3.1.12 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Abstand zwischen der A- und der B-Box von 40 bp bis 65 bp variiert, wobei 16 der 39 tRNA-Gen-Familien einen Abstand von  $45 \pm 1$  bp besitzen.



**Abbildung 3.1.12: Abstände zwischen der A- und der B-Box von tRNA-Genen**

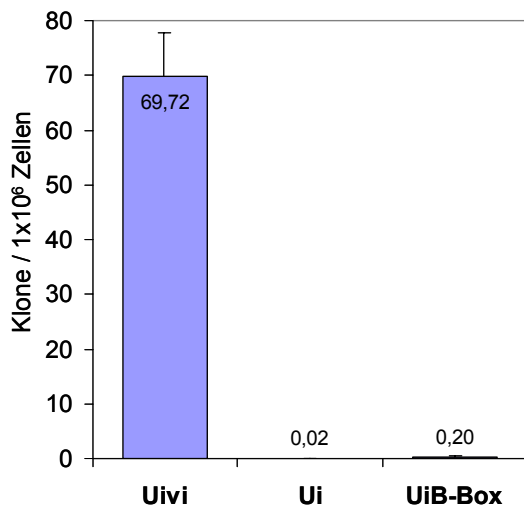
Grafisch dargestellt ist die Verteilung der Abstände zwischen der A- und der B-Box aller 39 bekannten tRNA-Gen-Familien in *Dictyostelium discoideum*.

### 3.1.3.2 Isolierung von TRE-Integrationen an einer isolierten B-Box

Da der Transkriptionsfaktor TFIIIC an die B-Box der tRNA-Gene bindet, sollte die Konsensus-Sequenz einer B-Box als Integrationsziel für TRE-Retrotransposons in der TRE-Falle getestet werden.

Durch Einzelstrangmutagenese wurde das Motiv „**GTCGCAGGTTCGAATC**“ in entgegengesetzter Orientierung zum UMPS-Gen in die leere TRE-Falle des Vektors pUi eingebracht und so der Vektor pUiB-Box hergestellt. Dieser Vektor wurde in DH1-Zellen transformiert und dadurch der Stamm UiB-Box erzeugt. Fünf unabhängige Klone dieses Stammes wurden kultiviert und Gefrierstocks von diesen Zellen angefertigt. Dabei war darauf zu achten, dass alle Zelllinien eine ähnliche Teilungsrate hatten wie die Zellen der Stämme Uivi und Ui und von dem Zeitpunkt der Transformation bis zum Anfertigen des Stocks gleich lange in Kultur waren.

Von den Stämmen Ui, Uivi und UiB-Box wurden gleichzeitig jeweils zwei Klone in Kultur genommen. Es wurden 5-FO-Selektionen mit jeweils fünf Petrischalen mit je  $5 \times 10^6$  Zellen von jedem Klon durchgeführt. Die Klonzahlen der beiden Klone eines Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $10^6$  eingesetzten Zellen umgerechnet. Das Ergebnis ist grafisch in Abbildung 3.1.13 dargestellt. Es ist keine deutliche Erhöhung der Retrotranspositionsfrequenz an der B-Box im Vergleich zu der leeren TRE-Falle zu erkennen. Trotzdem wurden drei 5-FO-resistente Klone (#1-5, #3-1 und #4-3) analog zu 3.1.1 mittels PCR-Analyse mit den Primern UMP20 und UMP21 untersucht.



**Abbildung 3.1.13: Retrotranspositionsfrequenzen an einer B-Box**

Dargestellt sind die Ergebnisse der 5-FO-Selektionen mit den Stämmen Uivi, Ui und UiB-Box. Für die Selektionen wurden 5 Petrischalen von je 2 unabhängigen Klonen jedes Stammes mit je  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Klonzahlen der beiden Klone jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

Die PCR-Produkte von allen drei untersuchten Klonen deuteten durch ihre Größe auf Integrationen von TRE-Elementen hin (Daten nicht gezeigt). Diese PCR-Produkte wurden isoliert und die Integrationsorte der TRE-Elemente durch Sequenzierung bestimmt. Dazu wurden an den isolierten PCR-Produkten Nested-PCRs mit den Primern Val(UAC)exB und Rep104 sowie mit den Primern Rep83 und UMP22 durchgeführt. Der Primer Val(UAC)exB bindet komplementär an die B-Box. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und anschließend sequenziert. Die Sequenz des 3'-Endes von Klon #3-1 war nicht zu ermitteln. Die Sequenzen der anderen beiden integrierten TREs sind in Abbildung 3.1.14 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in Klon #1-5 ein an Position 205 5'-verkürztes TRE5-A-Element im Abstand von ca. 100 bp oberhalb der B-Box in die TRE-Falle integriert ist. Da die Integrationsstelle in einen langen homopolymeren A-Stretch liegt und dieser bei der Integration des Retrotransposons verlängert wurde, war sowohl der Integrationsabstand zu der B-Box, wie auch die Länge der TSD nicht genau zu ermitteln. Bei den beiden Basen am 5'-Ende der TSD (AA)TG(AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA) konnte nicht bestimmt werden, ob diese durch die TSD oder durch den Poly-A-Anhang des Elementes erzeugt wurden. Bei den 24 Adeninen auf der 3'-Seite der TSD konnte nicht bestimmt werden, ob diese durch die TSD, oder durch die Verlängerung des A-Stretches erzeugt wurden. Zusätzlich wurde hinter dem verlängerten A-Stretch ein Guanin bei der Integration eingefügt. Die TSD kann somit theoretisch eine Länge von 2-28 bp besitzen. Wenn für diese Integration eine typische TSD von ca. 14 bp angenommen wird, so ergibt sich ein Integrationsabstand zu der B-Box von ca. 102 bp. Das an Position 195-197 5'-verkürzte TRE-Element in Klon #3-1 wurde ebenfalls in den A-Stretch integriert und weist an seinem 5'-Ende eine Mikrohomologie zur Zielsequenz von 2 bp (AA) auf. Da es in denselben A-Stretch, wie das TRE5-A-Element in Klon #1-5 integriert wurde, besitzt es einen ähnlichen Abstand zu der B-Box. Die Entfernung zu der B-Box und die Orientierung der beiden integrierten Elemente entsprechen in etwa dem Abstand einer typischen TRE-Integration oberhalb einer B-Box, die sich in einem tRNA-Gen befindet.



### 3.1.4 Ist ein in die TRE-Falle inseriertes tRNA-Gen aktiv?

Die Ergebnisse aus den vorausgegangenen Versuchen deuten auf zwei mögliche Mechanismen hin, wie tRNA-Gene in *Dictyostelium discoideum* von den TRE5-Retrotransposons erkannt werden könnten. Es ist möglich, dass TRE5-A-Elemente DNA-spezifische Retrotransposons sind, die über ihre Proteine die Sequenz der B-Box von tRNA-Genen erkennen und in einem Abstand von ca. 100 bp oberhalb dieser Erkennungssequenz in das Genom integrieren. Die andere Möglichkeit ist, dass die Integration der TRE-Retrotransposons über eine Protein/Protein-Interaktion von Transposonproteinen mit den Transkriptionsfaktoren TFIIB oder TFIIC, die über die B-Box an das tRNA-Gen gebunden sind, vermittelt wird.

Da sich die tRNA-Gene, die in der TRE-Falle getestet wurden, in einem Intron eines von der RNA-Polymerase II-transkribierten Gens befanden, ist nicht sicher, ob an diese tRNA-Gene die Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIC binden können. Bolton et. al (2003) zeigten, dass die Transkriptionsapparate der Polymerase II und der Polymerase III sich gegenseitig behindern können. Um überprüfen zu können, ob tRNA-Gene in der TRE-Falle dennoch aktiv transkribiert werden, wurden Suppressor-tRNA Untersuchungen des Glu<sup>Sup</sup>-Gens in der TRE-Falle durchgeführt.

Bei den Suppressor-tRNA Untersuchungen wird in ein Reporter-gen ein Stopp-Codon eingefügt. Dieses wird zusammen mit einem tRNA-Gen, dessen Anticodon so verändert wurde, dass es dieses Stopp-Codon in eine Aminosäure translatiert, in *D. discoideum*-Zellen transformiert. Anhand der Aktivität des Reporter-gens kann die Aktivität des tRNA-Gens bestimmt werden. Für die Suppressor-tRNA Versuche wurde das *lacZ*-Gen und ein Glu<sup>Sup</sup>-Gen verwendet, welches ein *amber*-Stopp-Codon in eine Glutaminsäure translatiert. Da in *D. discoideum* nur ca. 5,5% aller Proteine mit einem *amber*-Stopp-Codon terminiert werden, können *D. discoideum*-Zellen mit einem *amber*-Suppressor-tRNA-Gen ohne auffälligen Phänotyp wachsen. Aus diesem Grund eignet sich nur dieses Stopp-Codon für Suppressionsversuche (Dingermann 1990; Winckler 2005b).

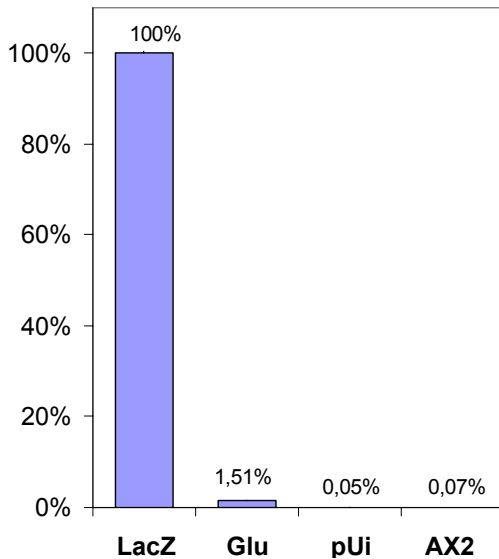
Der Vektor pDd-Gal17-A15P besitzt eine G418-Expressionskassette und eine *lacZ*-Expressionskassette. In das *lacZ*-Gen dieses Vektors wurde durch eine Doppelstrangmutagenese mit den Primern LacZ(amber)1 und LacZ(amber)2 ein

GAA<sup>Glu</sup>-Codon durch ein TAG<sup>amber</sup>-Codon ersetzt und dadurch der Vektor pDd-Gal-A15P(amber) hergestellt.

Um die Aktivität des Glu<sup>Sup</sup>-Gens zu testen wurden Doppeltransformationen in AX2-Zellen durchgeführt, bei denen den Zellen zum einen das Plasmid pDd-Gal-A15P(amber) und zum anderen das Glu<sup>Sup</sup>-Gen in dem Vektor pUigi, bzw. als Negativkontrolle das Plasmid pUi integriert wurden.

Zusätzlich wurde der unveränderte *lacZ*-Expressionsvektor pDd-Gal17-A15P in AX2-Zellen transformiert. 20 unabhängige, G418-resistente Klone wurden von jeder Transformation kultiviert, jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen pelletiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden gleichzeitig CPRG-Tests mit je einem Pellet von 10 unterschiedlichen Klonen jeder Transformation durchgeführt. Zusätzlich wurden 3 Pellets untransformierter AX2-Zellen als „Leerwert“ getestet. Da sich in Vorversuchen, wie erwartet, stark unterschiedliche  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanden abzeichneten, wurden von den *lacZ*-Sämen jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen, von den *lacZ*<sup>amber</sup>+Uigi-Stämmen jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen und von den *lacZ*<sup>amber</sup>+Ui-Stämmen, sowie den AX2-Kontrollen jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen für die Versuche eingesetzt. Die Verdünnungsfaktoren der Zellen wurden nach den Messungen eingerechnet.



**Abbildung 3.1.15: Suppressor-Aktivitätstest des Glu<sup>Sup</sup>-Gens**

Das *lacZ*-Gen, sowie das *lacZ*<sup>amber</sup>-Gen, jeweils zusammen mit dem Plasmiden pUigi und pUi, wurden in AX2-Zellen transformiert, Pellets (n=10) wurden im CPRG-Tests nach 4,5 min bei einer OD<sub>550</sub> vermessen. Zusätzlich wurde der CPRG-Test an untransformierten AX2-Zellen (n=3) durchgeführt. Dargestellt ist die *in vivo* Suppressor-Aktivität des Glu<sup>Sup</sup>-Gens durch die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des *lacZ*-Gens im Vergleich zu *lacZ*<sup>amber</sup>+pUigi, normiert auf *lacZ*. Die Fehlerbalken sind aufgrund der geringen Standardabweichung nicht erkennbar.

Die Verfärbung der Lösung wurde bei allen Klonen gleichzeitig nach 30 s und anschließend jede Minute in einem ELISA-Reader bei 550 nm gemessen. Die Werte für jeden Stamm wurden zusammengefasst. Es wurde festgestellt, dass nach 4 min 30 s bei allen Proben der Farbumschlag im linearen Bereich lag (Daten nicht gezeigt). Für die Ermittlung der Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase und damit der Aktivität des Glu<sup>Sup</sup>-Gens wurden daher die Werte der OD<sub>550</sub> nach 4 min 30 s ausgewertet. In Abbildung 3.1.15 ist zu erkennen, dass die Suppression des *amber*-Stopp-Codons in dem *lacZ*-Gen mit dem Glu<sup>Sup</sup>-Gen ca. 1,5% natürlichen *lacZ*-Aktivität entspricht. Dieser Wert entspricht einer

Suppression durch ein aktives tRNA-Gen aus früheren Versuchen (Dingermann 1990). Damit konnte exemplarisch für das Glu<sup>Sup</sup>-Gen gezeigt werden, dass die tRNA-Gene in der TRE-Falle aktiv transkribiert werden.

### 3.1.5 B-Box Mutanten von tRNA-Genen

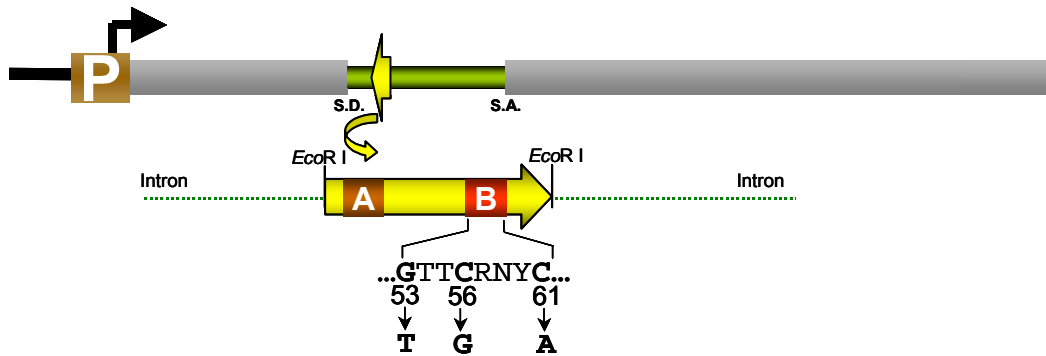
tRNA-Gene werden von der RNA-Polymerase III zuerst in ein Vorläufermolekül transkribiert, woraus anschließend die funktionelle tRNA prozessiert wird (Geiduschek 2001). Ein essentieller Schritt bei der Initiation der Transkription ist dabei die Bindung des Transkriptionsfaktors TFIIIC an die B-Box der tRNA-Gene. In früheren Arbeiten wurde für das *Drosophila*-tRNA<sup>Arg</sup>-Gen (Gaeta 1990), das tRNA<sup>Ser</sup>-Gen (Nichols 1989) und das U6-Gen (Kaiser 1995) aus *Saccharomyces cerevisiae*, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt, dass das Cytosin an Position 56 (C56) eine essentielle Base für die TFIIIC-Bindung ist. Für das Guanin an Position 53 (G53) wurde gezeigt, dass es wahrscheinlich essentiell für diese Bindung ist, während das Cytosin an Position 61 (C61) keine so entscheidende Funktion zu haben scheint. Während die Daten für das C56 in allen Versuchen korrelierten, gibt es bei den Ergebnisse für die anderen beiden Basen zwischen den *in vivo* und *in vitro* Daten Differenzen (Gaeta 1990; Kaiser 1995; Nichols 1989).

In Abschnitt 3.1.3 dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konsensussequenz einer *D. discoideum*-B-Box der anderer eukaryotischer B-Boxen entspricht.

In den vorausgegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die B-Box von tRNA-Genen ein Integrationsziel für TRE-Elemente darstellt und dass die tRNA-Gene in der TRE-Falle aktiv transkribiert werden. Um testen zu können, ob die Integrationen der TRE-Elemente über Protein-Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren der Polymerase III vermittelt wird, sollten inaktive tRNA-Gene in der TRE-Falle getestet werden.

Dazu wurden je 3 Mutanten von zwei *D. discoideum*-tRNA-Gens hergestellt, bei denen jeweils eine Base, wie in Abbildung 3.1.16 schematisch dargestellt ist, ausgetauscht wurde. Zuerst sollte überprüft werden, ob diese tRNA-Gene durch die Mutationen inaktiviert wurden. Anschließend sollte die Retrotranspositionsfrequenz an diesen Genen in der TRE-Falle ermittelt werden.





**Abbildung 3.1.16: Mutationen in der B-Box**

Schematische Darstellung eines tRNA-Gens in der TRE-Falle. Die Mutationen in der B-Box sind angedeutet.

Da es für *D. discoideum*-tRNA-Gene im Gegensatz zu humanen, Hefe- oder Drosophila-tRNA-Genen nicht die Möglichkeit eines *in vitro* Transkriptions-Testsystems gibt, kann die Aktivität von *Dictyostelium*-tRNA-Genen nicht direkt gemessen werden.

Daher soll zum einen die TFIIIC-Bindung an die tRNA-Gene *in vitro* mittels Gelshift-Experimenten untersucht werden und zum anderen die Aktivität der tRNA-Gene *in vivo* durch einen Suppressionstest gemessen werden. Die Suppressions-Messung kann mit dem Val<sup>UAC</sup>-Gen nicht durchgeführt werden, da die Valinyl-tRNA-Synthetase das Val<sup>UAC</sup>-Gen nur dann mit einer Aminosäure belädt, wenn das Val-Gen das richtige Anticodon besitzt (Fukai 2003; Horowitz 1999; Ramesh 2001). Aus diesem Grund wurden Suppressor tRNA-Versuche nur mit dem Glu<sup>UUC</sup>-Suppressor-tRNA (Glu<sup>Sup</sup>) durchgeführt.

### 3.1.5.1 Mutanten des Val<sup>UAC</sup>-Gens

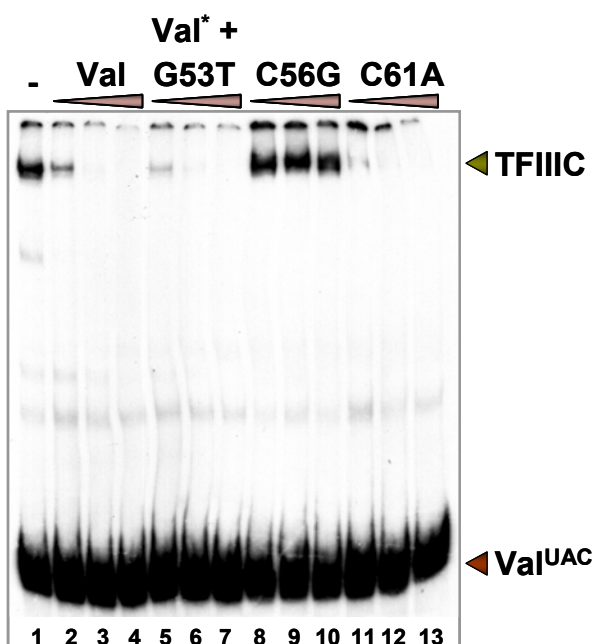
#### Herstellung der Vektoren.

Die Plasmide pUivi53, pUivi56 und pUivi61 mit den mutierten Val<sup>UAC</sup>-Genen in der TRE-Falle wurden durch Einzelstrangmutagenese mit den Primern ValUAC-G53T ValUAC-C56G bzw. ValUAC-C61A an dem Plasmid pUivi hergestellt. In dem Plasmid pUivi53 wurde das G an Position 53 gegen ein T ausgetauscht, in pUivi56 das C an Position 56 gegen ein G und in pUivi61 wurde das C an Position 61 gegen ein A ausgetauscht.

## EMSA-Untersuchungen

Es sollte mit Hilfe des Electrophoretic Mobility Gel Shift Assays (EMSA) getestet werden, ob der Transkriptionsfaktor TFIIC *in vitro* an die DNA der mutierten Val<sup>UAC</sup>-Gene bindet. In einer früheren Arbeit wurde bereits mittels EMSA gezeigt, dass TFIIC *in vitro* an die B-Box von *D. discoideum*-tRNA-Genen bindet (Bukenberger 1994).

Die radioaktive DNA-Probe für einen Gel-Shift sollte nicht länger als ca. 250 bp sein, aber wenigstens um ca. 30 bp über die Proteinbindedomäne (B-Box) herausragen und 5'-T-Überhänge besitzen. Da dies mit den Vektoren der TRE-Falle (pUivi etc.) nicht möglich war, wurde das Val<sup>UAC</sup>-Gen als *Eco*RI/*Hind*III-Fragment aus dem Vektor pVal<sup>UAC</sup> geschnitten und die Enden mit der Fill-in-Methode radioaktiv markiert. Die Bindung der mutierten tRNA-Gene wurde indirekt durch Konkurrenz gemessen. Dabei wurden pro Inkubation 5 µl AX2-Kernextrakt (ca. 1 µg Gesamtprotein) in Gegenwart von 10 fmol markierter Val<sup>UAC</sup>-DNA mit 1 µg Poly[dA-dT]•Poly[dA-dT] DNA und 1 µg Kompetitor-DNA bei Raumtemperatur inkubiert. In der ersten Inkubation bestand die Kompetitor-DNA nur aus dem Plasmid pUi, in den weiteren Inkubationen wurde die Kompetitor-DNA schrittweise durch die Plasmide pUivi, pUivi53, pUivi56 bzw. pUivi61 ersetzt. In Abbildung 3.1.17 ist das Autoradiogramm dieses Gel-Shifts dargestellt. In der ersten Spur, in der nur mit dem Plasmid pUi kompetiert wurde, ist keine Konkurrenz zu erkennen. Während die Plasmide pUivi53 und pUivi61 eine ähnlich gute Konkurrenz, wie das Plasmid pUivi zeigten, kompetiert das Plasmid pUivi56 die Bindung des radioaktiv markierten Val<sup>UAC</sup>-Gens an TFIIC nicht. Dieser Gel-Shift zeigt dass die Mutation an Position 56 das Val<sup>UAC</sup>-Gen *in vitro* inaktiviert.

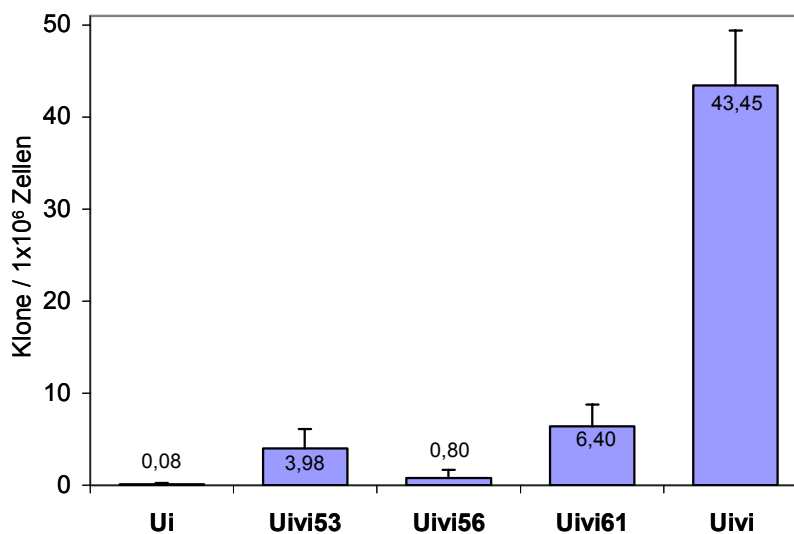


**Abbildung 3.1.17: Gel-Shift Val<sup>UAC</sup> + Kompetitor mit TFIIC**

Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Gel-Shifts (EMSA) des Val<sup>UAC</sup>-Gens. 1 µg Gesamtprotein aus AX2-Kernextrakten wurde pro Inkubation mit 10 fmol radioaktiv-markierter Val<sup>UAC</sup>-DNA in Anwesenheit von 1 µg Poly[dA-dT]•Poly[dA-dT] DNA und 1 µg Kompetitor-DNA hybridisiert. Die Proben wurden auf ein 4%iges, natives PAA-Gel aufgetragen und autoradiographiert. Die Kompetitor-DNA bestand in Spur 1 aus 1 µg des Vektors pUi. In den Spuren 2-4 sind in der Kompetitor-DNA steigende Mengen (0,1 0,5; 1,0 µg) pUi durch den Vektor pUivi ersetzt worden, analog dazu in den Spuren 5-7 durch pUivi53, in den Spuren 8-10 durch pUivi56 und in den Spuren 11-13 pUivi61. Durch Pfeilspitzen sind die Bandengrößen der TFIIC-DNA-Proteinkomplexe und die der ungebundenen Val<sup>UAC</sup>-DNA markiert.

### **In vivo Retrotranspositionstest**

Um die Retrotranspositionsrate an den verschiedenen Mutanten des Val<sup>UAC</sup>-Gens testen zu können, wurden die Plasmide pUi, pUivi, pUivi53, pUivi56 und pUivi61 stabil in DH1-Zellen transformiert und so die Stämme Ui, Uivi, Uivi53, Uivi56 und Uivi61 hergestellt. Von jedem Stamm wurden jeweils fünf unabhängige Klone kultiviert und Gefrierstocks von den Zellen hergestellt. Dabei war darauf zu achten, dass alle Zelllinien eine ähnliche Teilungsrate hatten und vom Zeitpunkt der Transformation bis zum Anfertigen des Stocks gleich lange in Kultur waren. Alle Stocks wurden überprüft und gleichzeitig in Kultur genommen. Es wurden 5-FO-Selektionen von 2 Klonen jedes Stammes mit jeweils fünf Petrischalen mit je  $4 \times 10^6$  Zellen durchgeführt. Die Klonzahlen jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $10^6$  eingesetzten Zellen umgerechnet. Das Ergebnis ist grafisch in Abbildung 3.1.18 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Retrotranspositionsfrequenzen an den beiden Val<sup>UAC</sup>-Genen mit den Mutationen an Position 53 und 61 deutlich geringer waren, als an dem nicht mutierten Val<sup>UAC</sup>-Gen. An dem Val<sup>UAC</sup>-Gen mit der Mutation an Position 56 fand so gut wie keine Retrotransposition statt.



**Abbildung 3.1.18: 5-FO-Selektionen mit Val<sup>UAC</sup>-Mutanten**

Dargestellt sind die Ergebnisse der 5-FO-Selektionen mit den Mutanten des Val<sup>UAC</sup>-Gens. Es wurden von den Stämmen Ui, Uivi, Uivi53, Uivi56 und Uivi61 je 5 Petrischalen von je 2 unabhängigen Klonen mit  $4 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Klonzahlen der beiden Klone jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

Der Versuch ist mit unterschiedlichen Mengen an eingesetzten Zellen pro Petrischale und ähnlichem Ergebnis wiederholt worden (Daten nicht gezeigt). Es wurden sechs 5-FO-resistente Klone des Stammes Uivi56 mit PCR-Analysen untersucht, bei keinem konnte eine Integration eines Transposons gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.5.2 Mutanten des Glu<sup>Sup</sup>-Gens

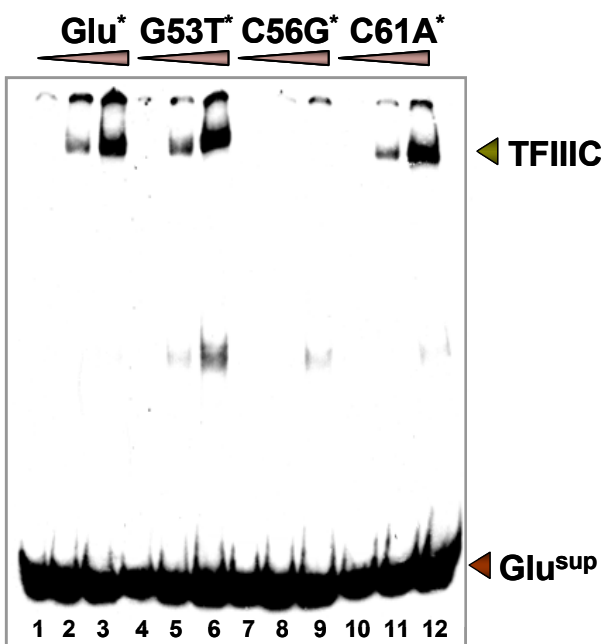
Für das Glu<sup>UUC</sup>-Gen konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sich dieses für Suppressor-tRNA-Versuche eignet (Dingermann 1990). Aus diesem Grund, und da das Glu<sup>UUC</sup>-Gen als Suppressor-tRNA-Gen (Glu<sup>Sup</sup>) vorlag, wurde dieses Gen als zweites *D. discoideum*-tRNA-Gen gewählt.

#### Herstellung der Vektoren.

Die Plasmide pUigi53, pUigi56 und pUigi61 mit den mutierten Glu<sup>Sup</sup>-Genen in der TRE-Falle wurden durch Einzelstrangmutagenese mit den Primern GluG53T, GluC56G bzw. GluC61A an dem Plasmid pUigi hergestellt. In dem Plasmid pUigi53 wurde das G an Position 53 gegen ein T ausgetauscht, in pUigi56 das C an Position 56 gegen ein G und in pUigi61 wurde das C an Position 61 gegen ein A ausgetauscht.

#### EMSA-Untersuchungen

Da das Glu<sup>Sup</sup>-Gen ist in dem Plasmid pUigi auf der 3'-Seite seinen Terminator besitzt, ist es im Gegensatz zu dem Val<sup>UAC</sup>-Gen in dem Plasmid pUivi, lang genug als Sonde für einen Gel-Shift. Das Glu<sup>Sup</sup>-Gen wurde als *EcoR* I-Fragment aus pUigi herausgeschnitten, die Überhänge mit der Fill-in-Methode radioaktiv markiert und das Fragment als Sonde für den Gel-Shift benutzt.



**Abbildung 3.1.19: Gel-Shift Glu<sup>Sup</sup>-Mutationen mit TFIIC**

Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Gel-Shifts (EMSA) des Glu<sup>Sup</sup>-Gens. Je 0,1 µg, 0,5 µg bzw. 1 µg Gesamtprotein aus AX2-Kernextrakten wurden pro Inkubation mit 10 fmol radioaktiv-markierter Glu<sup>Sup</sup>-DNA in Anwesenheit von 1 µg Poly[dA-dT]•Poly[dA-dT] DNA und 1 µg pUi-DNA hybridisiert. Die Proben wurden auf ein 4%iges, natives PAA-Gel aufgetragen und autoradiographiert. In den Spuren 1-3 sind steigende Mengen Kernextrakt mit markierter Glu<sup>Sup</sup>-DNA aufgetragen, in den Spuren 4-6 sind steigende Mengen Kernextrakt mit markierter Glu<sup>Sup</sup>53-DNA, in den Spuren 7-9 sind steigende Mengen Kernextrakt mit markierter Glu<sup>Sup</sup>56-DNA und in den Spuren 10-12 sind steigende Mengen Kernextrakt mit markierter Glu<sup>Sup</sup>61-DNA aufgetragen. Durch Pfeilspitzen sind die Bandengrößen der TFIIC-DNA-Proteinkomplexe und die der ungebundenen Glu<sup>Sup</sup>-DNA markiert.

Ebenso wurden die mutierten Glu<sup>Sup</sup>-Gene aus den Vektoren Uigi53, Uigi56 und Uigi61 herausgeschnitten und markiert. Pro Inkubation wurden 10 fmol markierte DNA mit stei-

genden Mengen Kernextrakt (0,1 µg; 0,5 µg; 1 µg), je 1 µg Poly[dA-dT]•Poly[dA-dT] DNA und 1 µg pUi-Vektor inkubiert und auf ein 4%iges PAA aufgetragen. In Abbildung 3.1.19 ist das Autoradiogramm dieses Gel-Shifts dargestellt. Es ist zu erkennen, dass TFIIIC sowohl an das Glu<sup>Sup</sup>-Gen, wie auch das Gen mit Mutationen an den Positionen 53 und 61 bindet. Die Mutation an Position 56 scheint das Glu<sup>Sup</sup>-Gen *in vitro* zu inaktivieren.

### Suppressor-tRNA Untersuchungen

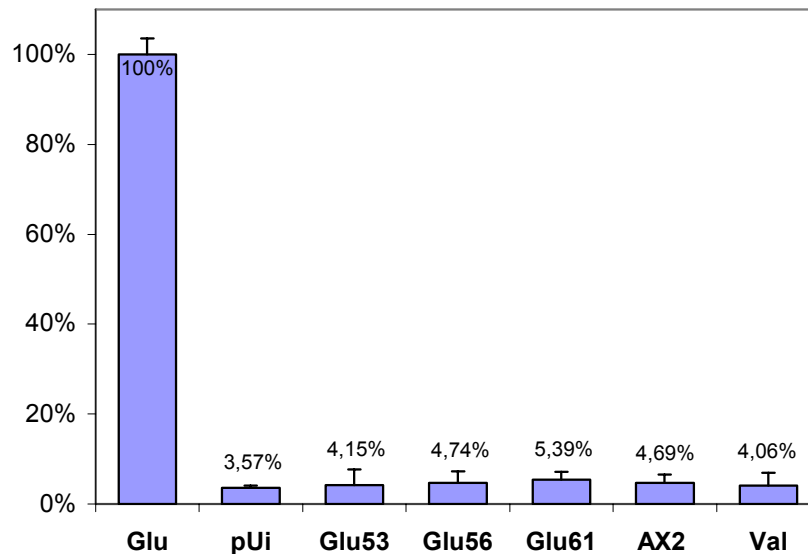
Die Suppressor-tRNA Untersuchungen wurden zusammen mit den Versuchen in 3.1.4 durchgeführt. Dazu wurden Doppeltransformationen in AX2-Zellen durchgeführt, bei denen den Zellen zum einen das Plasmid pDd Gal A15P amber und zum anderen die Vektoren pUigi, pUigi53, pUigi56 und pUigi61 integriert wurden.

Aus einem Val<sup>UAC</sup>-Gen in pUivi wurde durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer ValUAC-Sup ein Suppressor-tRNA-Gen hergestellt (pUiviS). Dieses Plasmid wurde ebenfalls zusammen mit dem Plasmid pDd Gal A15P amber in AX2-Zellen transformiert, um überprüfen zu können, ob das Val<sup>UAC</sup>-Gen tatsächlich nicht als Suppressor-tRNA-Gen funktioniert. Zusätzlich wurde das unveränderte *lacZ*-Plasmid pDd Gal 17-A15P in AX2-Zellen transformiert. Von jeder Transformation wurden 20 unabhängige, G418-resistente Klone kultiviert, jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen pelletiert und bei -80°C gelagert.

Die CPRG-Tests wurden wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Klone der Doppeltransformatanden mit dem *lacZ*<sup>amber</sup>-Gen und dem Glu<sup>Sup</sup>-Gen, dessen Mutanten, dem Val<sup>Sup</sup>-Gen und der leeren TRE-Falle untersucht. Zusätzlich wurden 3 Pellets untransformierter AX2-Zellen als „Leerwert“ getestet.

Von den Stämmen mit dem Val<sup>Sup</sup>-Gen und den Mutanten des Glu<sup>Sup</sup>-Gens wurden  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt, von den Zellen mit dem Glu<sup>Sup</sup>-Gen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

Für die Ermittlung der Enzymaktivität der β-Galaktosidase und damit der Aktivität der tRNA-Gene wurden die Werte der OD<sub>550</sub> nach 4 min 30 s genommen, da die Zunahme der Optischen Dichte zu diesem Zeitpunkt bei allen Stämmen im linearen Bereich lag. In Abbildung 3.1.20 sind die Suppressionsraten des Glu<sup>Sup</sup>-Gens im Vergleich zu den B-Box-Mutanten und dem Val<sup>Sup</sup>-Gen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die drei Mutanten des Glu<sup>Sup</sup>-Gens, wie auch das Val<sup>Sup</sup>-Gen keine Suppression zeigen.



**Abbildung 3.1.20: Suppressor-Aktivitätstest mit mutierten Glu<sup>Sup</sup>-Genen**

Dargestellt ist die *in vivo* Aktivität des Glu<sup>Sup</sup>-Gens und dessen Mutanten mit Hilfe der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Dazu wurde das *lacZ*<sup>amber</sup>-Gen jeweils zusammen mit Glu<sup>Sup</sup>-Gen in der TRE-Falle (Glu), der leeren TRE-Falle (pUi), den Vektoren mit den mutierten Glu<sup>Sup</sup>-Genen in der TRE-Falle (Glu53, Glu56, Glu61) und dem Val<sup>Sup</sup>-Gen in der TRE-Falle in AX2-Zellen transformiert, Pellets (n=10) wurden im CPRG-Tests nach 4,5 min bei einer OD<sub>550</sub> vermessen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Als Negativkontrollen dienten untransformierte AX2-Zellen (n=3). Die Werte wurden auf das Glu<sup>Sup</sup>-Gen normiert.

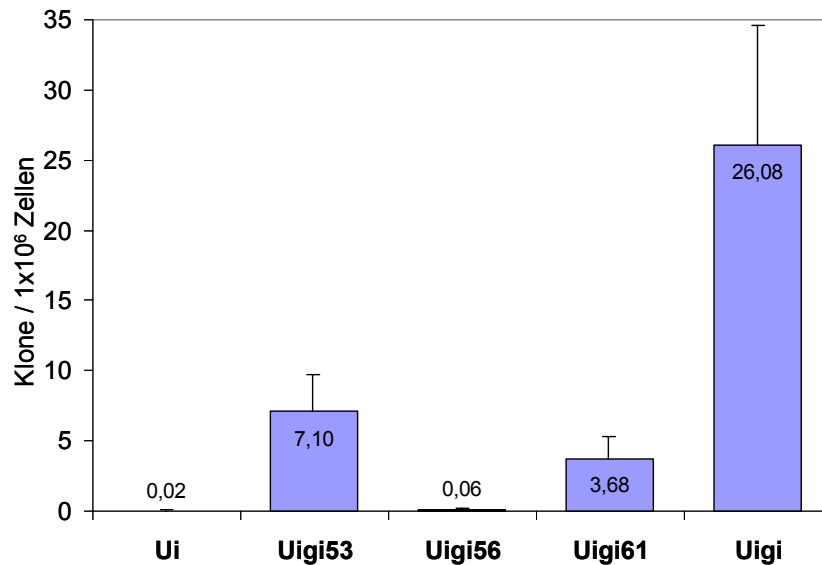
### ***In vivo* Retrotranspositionstest**

Durch Transformation der Plasmide pUigi53, pUigi56 und pUigi61 in den Stamm DH1 wurden die Stämme Uigi53, Uigi56 und Uigi61 hergestellt. Es wurden von jedem Stamm fünf unabhängige Klone kultiviert und Gefrierstocks von den Zellen hergestellt, wobei auch hier darauf geachtet wurde, dass alle Zelllinien eine ähnlich Teilungsrate wie die Stämme Uig und Uigi hatten, so wie dass die Zellen vom Zeitpunkt der Transformation bis zum Anfertigen des Stocks gleich lange in Kultur waren.

Je 5 Klone der Stämme Ui, Uigi, Uigi53, Uigi56 und Uigi61 wurden gleichzeitig in Kultur genommen. Von jedem Klon wurden 5-FO-Selektionen mit jeweils drei Petrischalen mit je  $5 \times 10^6$  Zellen durchgeführt. Die Klonzahlen der 5 Klone eines Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $10^6$  eingesetzten Zellen umgerechnet. Das Ergebnis ist grafisch in Abbildung 3.1.21 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Retrotranspositionsfrequenz an den beiden Glu<sup>Sup</sup>-Genen mit den Mutationen an Position 53 und 61 deutlich geringer ist als an dem Wild-Typ- Glu<sup>Sup</sup>-Gen. An dem Glu<sup>Sup</sup>-Gen mit der Mutation an Position 56 findet fast gar keine Retrotransposition statt.

Der Versuch ist mit ähnlichem Ergebnis mit unterschiedlichen Mengen an eingesetzten Zellen pro Petrischale wiederholt worden (Daten nicht gezeigt). Es wurden insgesamt 20 5-FO-resistente Klone des Stammes Uigi56 mit PCR-Analysen untersucht. Bei keinem

dieser Klone konnte eine Integration eines Transposons gefunden werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.1.21: 5-FO-Selektionen mit  $\text{Glu}^{\text{sup}}$ -Mutanten**

Dargestellt sind die Ergebnisse der 5-FO-Selektionen mit den Mutanten des  $\text{Glu}^{\text{sup}}$ -Gens. Es wurden von den Stämmen Ui, Uigi, Uigi53, Uigi56 und Uigi61 je 3 Petrischalen von je 5 unabhängigen Klonen mit  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Klonzahlen der 5 Klone jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

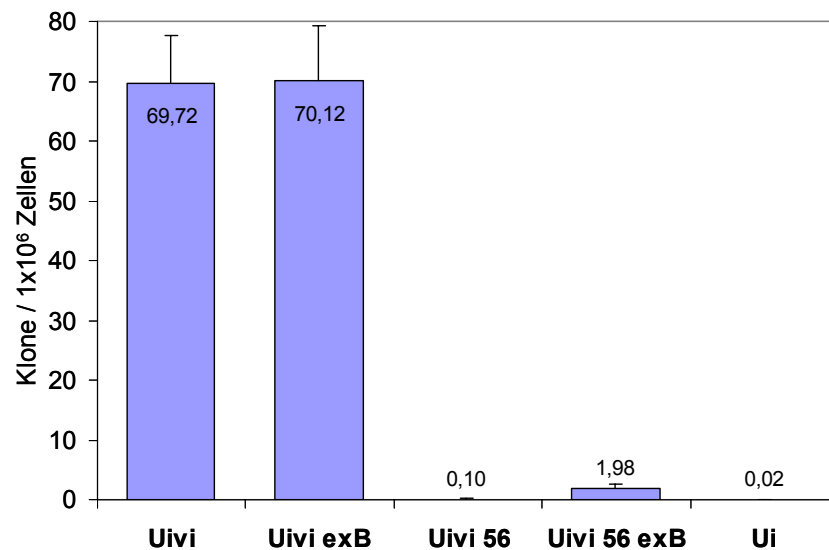
### 3.1.6 Welchen Einfluss hat eine externe B-Box?

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein inaktiviertes  $\text{Val}^{\text{UAC}}(\text{C56G})$ -tRNA-Gen kein Integrationsziel für TRE-Elemente darstellt, sollte überprüft werden, ob eine externe B-Box eine inaktivierte interne B-Box ersetzen kann. Dazu wurde die Konsensussequenz einer B-Box „**GTTCGCAGGTTCTGAATC**“ durch Einzelstrangmutagenesen jeweils 34 bp unterhalb der B-Box eines  $\text{Val}^{\text{UAC}}$ -Gens und eines mutierten  $\text{Val}^{\text{UAC}}(\text{C56G})$ -Gens in die Plasmide pUivi und pUivi56 eingebracht. Dadurch wurden die Plasmide pUiviexB und pUivi56exB hergestellt.

Durch Transformation der Plasmide pUiviexB und pUivi56exB in den Stamm DH1 wurden die Stämme UiviexB und Uivi56exB hergestellt. Es wurden von jedem Stamm fünf unabhängige Klone kultiviert und Gefrierstocks von den Zellen hergestellt, wobei auch hier darauf geachtet wurde, dass alle Zelllinien eine ähnlich Teilungsrate wie die Stämme Uivi, Uivi56 und Ui hatten. Alle Zellen wurden vom Zeitpunkt der Transformation bis zum Anfertigen der Stocks gleich lange in Kultur gehalten.

### **In vivo Retrotranspositionstest**

Je zwei Klone der Stämme Uivi, UiviexB, Uivi56 Uivi56exB und Ui wurden gleichzeitig in Kultur genommen. Von jedem Klon wurden 5-FO-Selektionen mit jeweils fünf Petrischalen mit je  $5 \times 10^6$  Zellen durchgeführt. Der Versuch wurde zusammen mit dem Versuch in Abbildung 3.1.13 durchgeführt. Die Klonzahlen der beiden Klone jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $1 \times 10^6$  eingesetzten Zellen umgerechnet. Das Ergebnis ist grafisch in Abbildung 3.1.22 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Retrotranspositionsfrequenz in dem Stamm UiviexB ähnlich wie in dem Stamm Uivi ist. Der Stamm Uivi56exB zeigt eine etwas höhere Retrotranspositionsrate, als der Stamm Uivi56. Das lässt darauf schließen, dass die externe B-Box evtl. die mutierte interne B-Box ersetzen kann.



**Abbildung 3.1.22: 5-FO-Selektionen der Stämme UiviexB und UixB**

Dargestellt sind die Ergebnisse der 5-FO-Selektionen mit den Mutanten des  $\text{Val}^{\text{UAC}}$ -Gens. Es wurden von den Stämmen Ui, Uivi, Uivi53, Uivi56 und Uivi61 je fünf Petrischalen von je zwei unabhängigen Klone mit  $4 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Klonzahlen der beiden Klone jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $1 \times 10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingezeichnet.

In Abschnitt 3.1.3.2 konnte gezeigt werden, dass die Konsensussequenz der B-Box ein schwaches Integrationsziel für TRE-Retrotransposons darstellt. Wenn ein TRE5-A-Transposon die externe B-Box als Integrationsziel erkennt und das mutierte tRNA-Gen in dem Stamm Uivi56 ignoriert, müsste es im Abstand von ca. 100 bp oberhalb der externen B-Box integrieren. Der Integrationsort wäre ca. 5 bp oberhalb des  $\text{Val}^{\text{UAC}}$ -Gens. Wenn die externe B-Box die interne B-Box ersetzen könnte, müssten TRE-Elemente ca. 50 bp oberhalb des  $\text{Val}^{\text{UAC}}$ -Gens in die TRE-Falle integrieren.

Es wurden 41 5-FO-resistente Klone kultiviert und gDNA von den Zellen präpariert. Mittels PCR-Analyse mit den Primern UMP20 und UMP21 wurden diese gDNAs analog zu 3.1.1 untersucht. Bei neun von den 41 Klone deuteten die PCR-Banden auf eine Integration





mutierten B-Box bei der Integration ignoriert wurde. Da die 5'-Verkürzung in dem Bereich lag, der nur bei TRE5-A.1 Elementen vorkommt, konnte ohne weitere Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei dem integrierten Transposon um ein TRE5-A.1-Element handelte.

Bei Klon #1-3 ist zu erkennen, dass ein komplettes TRE5-A Element im Abstand von 50 bp oberhalb des Val<sup>UAC</sup>-Gens bzw. 146 bp oberhalb der externen B-Box in die TRE-Falle integriert ist. Der Abstand deutet darauf hin, dass das Val<sup>UAC</sup>-Gen mit der mutierten B-Box von dem TRE5-A-Element als Integrationsziel erkannt wurde.

Durch die Sequenzen der 3'-Enden der beiden Elemente konnte gezeigt werden, dass das integrierte TRE in Klon #9A einen Poly-A-Anhang von 14 bp besitzt und auch eine TSD von ebenfalls 14 bp (GACCGAATTCTTAA) erzeugt hat. Das Element in Klon #1-3 besitzt einen Poly-A-Anhang von 13 bp und hat eine TSD von 15 bp (TTTTTTTTTTTTTTTT) in der Zielsequenz erzeugt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass beide TRE5-A-Transposons orthodox in die TRE-Falle integriert wurden.

### **3.1.7 TRE-Integrationen an einem ribosomalen 5S-Gen**

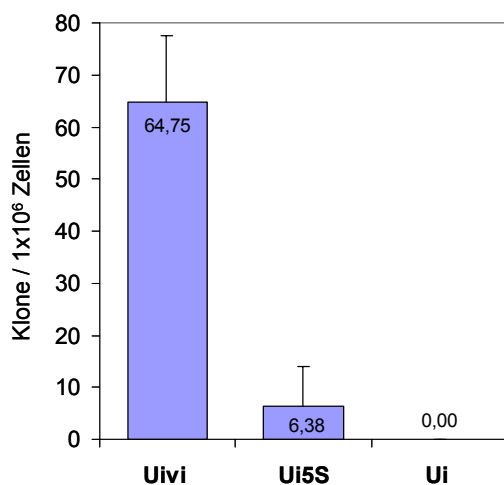
Nachdem in mehreren Versuchen gezeigt werden konnte, dass die B-Box eines tRNA-Gene eine essentielle Funktion bei der Integration von TRE-Elementen einnimmt, sollte mit einem weiteren Pol III-Gen überprüft werden, ob die TRE-Elemente sequenz-spezifisch oder über eine Protein-Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren der Polymerase III integrieren. Dazu wurde das ribosomale 5S-Gen gewählt, welches keine Sequenz-Homologie zu tRNA-Genen, bzw. einer B-Box aufweist. Das r5S-Gen wird aber ebenfalls von TFIIC und TFIIIB besetzt. Allerdings werden diese Faktoren durch einen zusätzlichen Faktor (TFIIIA) unabhängig von den tRNA-Gen-typischen B-Boxen rekrutiert. Das r5S-Gen liegt im *Dictyostelium*-Genom zusammen mit weiteren ribosomalen Genen auf einem 88 kb großen Palindrom im Zellkern vor. Das Palindrom existiert in ca. 100 Kopien in jedem Zellkern und besteht aus zwei identischen Armen, sodass das r5S-Gen in ca. 200 Kopien im Genom vorliegt. Ob das r5S-Gen auch auf Chromosom 4 lokalisiert ist, konnte durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt nicht mit Sicherheit festgestellt werden (G. Glöckner, FLI Jena, persönliche Mitteilung). Es konnten in der Umgebung der r5S-Gene keine natürlichen Integrationen von TRE-Elementen gefunden werden.

### **In vivo Retrotranspositionstest**

Das r5S-Gen wurde mit den Primern 5SrDNA01 und 5SrDNA02 mittels PCR an genomischer AX2-DNA amplifiziert und in den Vektor pUi kloniert. Der Vektor pUi5S enthält das r5S-Gen in Orientierung des UMPS-Gens.

Durch Transformation des Plasmids pUi5S in den Stamm DH1 wurde der Stamm Ui5S hergestellt. Von diesem Stamm wurden fünf unabhängige Klone kultiviert und Gefrierstocks von den Zellen hergestellt, wobei auch hier darauf geachtet wurde, dass alle Zelllinien eine ähnliche Teilungsrate wie die Stämme Uivi und Ui hatten. Alle Zellen wurden von dem Zeitpunkt der Transformation bis zum Anfertigen des Stocks gleich lange in Kultur gehalten.

Es wurden 5-FO-Selektionen von je zwei Klonen jedes Stammes mit jeweils fünf Petrischalen und je  $8 \times 10^5$  Zellen pro Petrischale durchgeführt. Die Klonzahlen jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $1 \times 10^6$  eingesetzten Zellen umgerechnet. Das Ergebnis ist grafisch in Abbildung 3.1.24 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Retrotranspositionsfrequenz an dem r5S-Gen ca. 10% der Frequenz an dem Val<sup>UAC</sup>-Gen betrug.

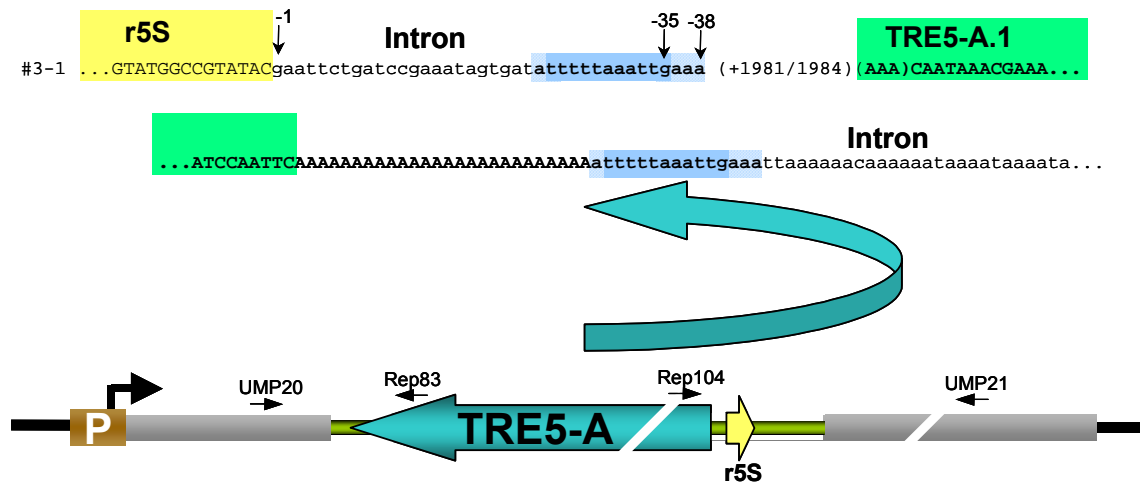


**Abbildung 3.1.24: 5-FO-Selektionen mit dem r5S-Gen**

Dargestellt sind die Ergebnisse der 5-FO-Selektionen mit den Stämmen Uivi, Ui5S und Ui. Es wurden von jedem Stamm je fünf Petrischalen von je zwei unabhängigen Klonen mit  $8 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Die Klonzahlen der beiden Klone jedes Stammes wurden zusammengefasst und auf Klone pro  $10^6$  eingesetzte Zellen umgerechnet. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingezeichnet.

Von dem Stamm Ui5S wurden fünf 5-FO-resistente Klone kultiviert und gDNA isoliert. An diesen gDNAs wurden PCRs mit den Primern UMP20 und UMP21 durchgeführt. Zwei PCR-Produkte enthielten ein größeres PCR-Fragment als die Kontrolle an der TRE-Falle ohne Integrationsereignis und deuteten so auf eine Integration eines Transposons hin (Daten nicht gezeigt). Diese beiden PCR-Fragmente wurden isoliert und daran eine Nested-PCR mit den Primern 5SrDNA03 und Rep104 durchgeführt. Der Primer 5SrDNA03 bindet komplementär an das r5S-Gen. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und anschließend sequenziert. Für den Klon #3-1 konnte gezeigt werden, dass ein 5'-verkürztes TRE5-A.1 Element im Abstand von 35-38 bp oberhalb des r5S-Gens in die TRE-Falle integriert wurde. Da das Transposon in dem Bereich 5'-verkürzt wurde, der nur

in TRE5-A.1-Elementen vorhanden ist, war ohne weitere Untersuchungen geklärt, dass es sich bei dem integrierten Transposon um ein TRE5-A.1 Element handelte.



**Abbildung 3.1.25: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Ui5S**

Dargestellt sind die flankierenden Sequenzen und der Abstand des integrierten TRE5-A.1-Transposons zu dem r5S-Gen in dem 5-FO-resistenten Klon #3-1 des Stammes Ui5S. Die Position der ersten Base des Transposons ist in Klammern angegeben. Das r5S-Gen ist gelb unterlegt, das TRE-Element ist grün und die erzeugte TSD ist blau unterlegt. Bei dem Adenin auf der 5'-Seite der TSD und den drei Adeninen auf der 3'-Seite der TSD kann nicht festgelegt werden, ob diese zu der TSD, oder zu dem 5'-Ende, bzw. dem Poly-A-Anhang des Retrotransposons gezählt werden müssen.

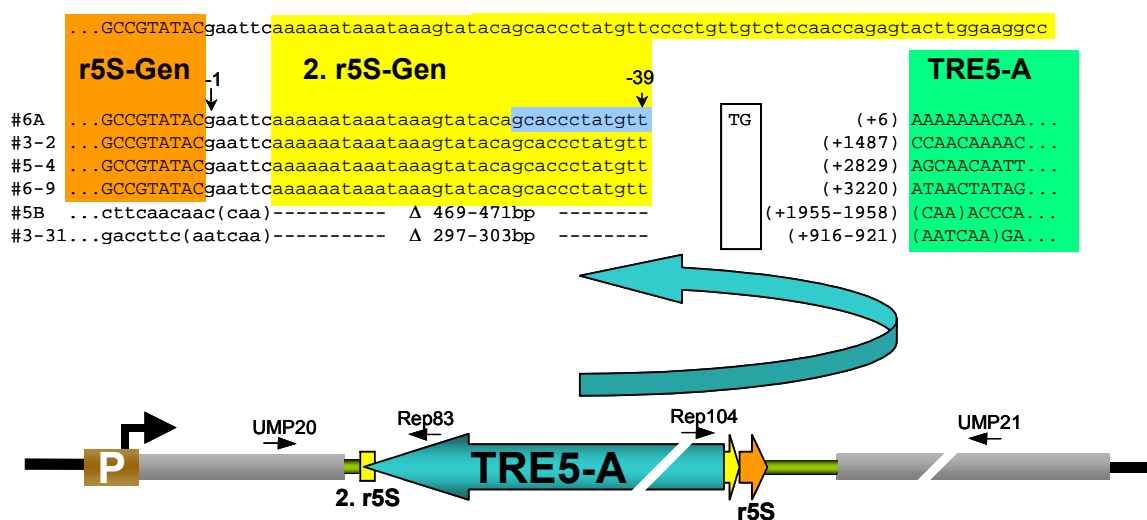
An dem Integrationsort des TRE-Elementes ist eine Mikrohomologie von 3 bp (AAA) beobachtet worden, daher war der Abstand zum r5S-Gen und das erste Nukleotid des integrierten Transposons nicht genau zu bestimmen.

Um die 3'-Seite des integrierten Transposons untersuchen zu können, wurde an dem gereinigten UMP20/21 PCR-Produkt eine Nested-PCR mit den Primern Rep83 und UMP20 durchgeführt, das PCR-Produkt in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen des integrierten TREs sind in Abbildung 3.1.25 dargestellt. Bei dem Adenin am 5'-Ende der TSD war nicht eindeutig zu klären, ob es durch die TSD oder durch den Poly-A-Anhang entstanden ist. Das integrierte TRE5-A.1-Element besitzt einen Poly-A-Anhang von 26-27 bp und hat in der Zielsequenz eine TSD von 11-15 bp ((A)TTTTTAAATTG(AAA)) erzeugt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das TRE5-A-Transposons orthodox in die TRE-Falle integriert wurde.

### Zwei r5S-Gene in der TRE-Falle

Durch einen Fehler beim Klonieren des Vektors pUi5S ist zuvor das Plasmid pUi5S2x hergestellt worden, in dem zwei r5S-Gene tandemartig in die TRE-Falle kloniert wurden. Der Fehler ist erst beim Untersuchen der integrierten Transposons in dem Stamm Ui5S2x aufgefallen. Transformationen und 5-FO-Selektionen wurden wie in den anderen Kapiteln beschrieben durchgeführt. Von diesem Stamm wurden 30 5-FO-resistente Klone kultiviert,

gDNA isoliert und diese mittels PCR weiter untersucht. 10 PCR-Reaktionen ergaben ein größeres PCR-Fragment, als die Kontrolle an der TRE-Falle ohne Integrationsereignis und deuteten so auf eine Integration eines mobilen Elementes hin (Daten nicht gezeigt). Diese PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben weiter untersucht. Die Integrationssequenzen für sechs Klone sind in Abbildung 3.1.26 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei vier Klonen ein TRE5-A-Retrotransposon in einem Abstand von 39 bp oberhalb des ersten r5S-Genes in die TRE-Falle integriert wurde. Für den Klon #6A wurde eine TSD von 12 bp (GCACCCTATGTT) und ein Poly-A-Anhang von 13 bp nachgewiesen.



**Abbildung 3.1.26: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Ui5S2x**

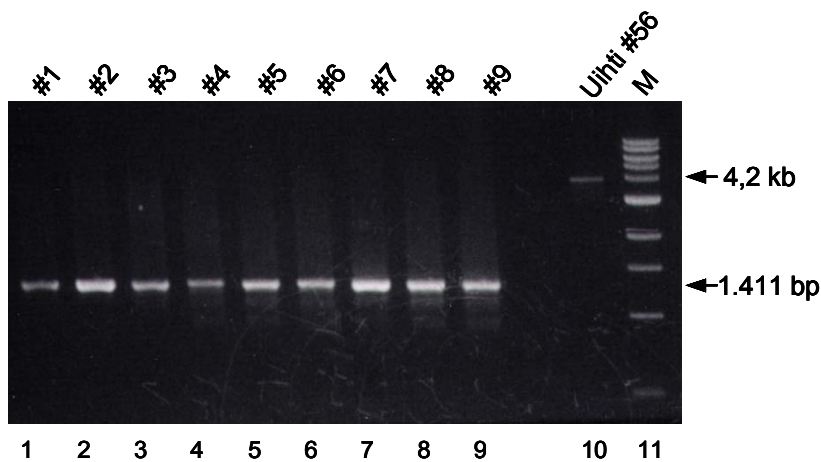
Dargestellt sind die flankierenden Sequenzen und der Abstand der integrierten TRE-Elemente zu dem r5S-Gen in 5-FO-resistenten Klonen des Stammes Ui5S2x. Die erste Base des TRE5-A-Elementes ist in Klammern angegeben. Die durch die Retrotransposition zusätzlich eingefügten Nucleotide stehen in der Box vor den Klammern. Das r5S-Gen, welches als Integrationsziel erkannt wurde ist orange unterlegt, das zweite r5S-Gen ist gelb markiert, das TRE-Element ist grün und die erzeugte TSD in Klon #6A ist blau unterlegt. Die durch Zielsequenz-Deletionen entfernten Bereiche bei den Klonen #5B und #3-31 ist durch Striche gekennzeichnet und die Mikrohomologien in Klammern gesetzt.

Bei den Integrationen in den Klonen #5B und #3-31 wurden sowohl Mikrohomologien, wie auch Zielsequenz-Deletionen beobachtet. Wenn man die Zielsequenz-Deletionen herausrechnet und dabei eine typische TSD annimmt, ergibt sich bei beiden Integrationen ein ursprünglicher Abstand von ca. 40 bp zu dem r5S-Gen.

In Klon #3-31 betrug die Länge der Mikrohomologie 6 bp (AATCAA) und die Länge der Deletion 297-303 bp. In Klon #5B betrug die Länge der Mikrohomologie 3 bp (CAA) und die Länge der Deletion 469-471 bp. Durch die beiden großen Zielsequenz-Deletionen wurde das r5S-Gen auch deletiert.

### 3.1.8 Gibt es TRE-Integrationen in die leere TRE-Falle?

Während aller 5-FO-Selektionen in dieser Arbeit diente der Stamm Ui, der eine leere TRE-Falle trägt, als Negativkontrolle. Um zu zeigen, dass die entstandenen 5-FO-resistenten Klone dieses Stammes durch natürliche Mutationen und nicht durch unspezifische Transposon-Integrationen entstanden sind, wurden 22 dieser Klone analog zu 3.1.1 untersucht. Von diesen Klonen wurde gDNA isoliert. Diese gDNAs wurden mittels PCR mit den Primern UMP20 und UMP21 untersucht und die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Wenn keine Integration in der TRE-Falle stattgefunden hat, besitzt das PCR-Produkt der leeren TRE-Falle eine Größe von 1.411 bp. In Abbildung 3.1.27 sind neun der 22 PCR-Produkte dargestellt. Zusätzlich wurde eine PCR mit denselben Primern an gDNA des Klons Uihti#56 durchgeführt und verdünnt als Positivkontrolle aufgetragen. Bei dem Klon Uihti#56 ist ein fast komplettes TRE5-A.2 vor dem humanen Met-Gen integriert, sodass das PCR-Produkt eine Größe von ca. 4,2 kb besitzt (vgl. 3.1.1). Es ist zu erkennen, dass alle neun dargestellten PCR-Produkte der 5-FO-resistenten Ui-Klone ca. 1.400 bp groß sind und damit nicht auf eine spezifische Integration eines Transposons hindeuten.

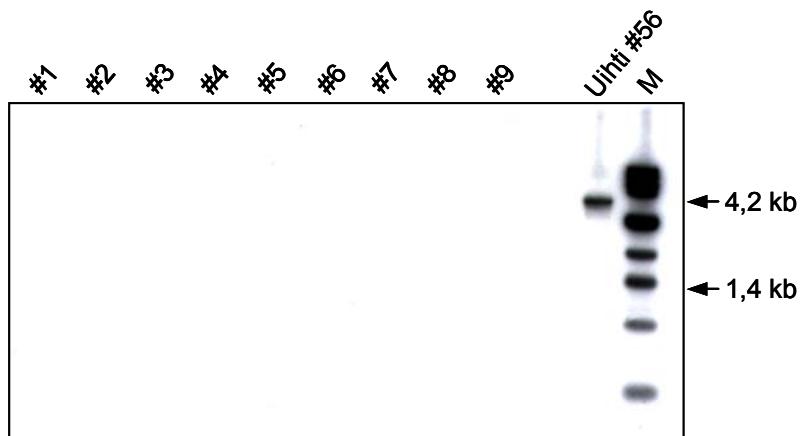


**Abbildung 3.1.27: 5-FO-resistente Klone des Stammes Ui**

Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung. Auf ein 1,2%iges Agarosegel wurden die PCR-Produkte mit den Primern UMP20 und UMP21 an gDNA von neun 5-FO-resistenten Klonen des Stammes Ui (Spur 1-9) und dem Klon Uihti#56 (1:10 verdünnt, Spur 10) aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine 1kb-Leiter der Fa. NEB aufgetragen.

Um nachzuweisen, dass tatsächlich keine TRE5-A-Integrationen in der TRE-Falle die Ursache für die *ura*<sup>-</sup>-Phänotypen der Ui-Klone sind, wurde von diesem Gel ein Southernblot angefertigt. Dieser wurde mit einer radioaktiven Sonde eines kompletten TRE5-A.1-Elementes hybridisiert. Die Sonde wurde mit der radioaktiven Nick-Markierung an dem kompletten Plasmid pB3 hergestellt, sodass wie in Abbildung 3.1.28 auch die 1 kb-Leiter mit der Sonde hybridisieren sollte. Das Plasmid pB3 beinhaltet ein fast komplettes TRE5-A.1-Element und ein TRE5-A.3-Element. Das Autoradiogramm dieses

Southernblots ist in Abbildung 3.1.28 dargestellt. Darauf ist zu erkennen, dass nur die Positivkontrolle und der Größenmarker mit der Sonde hybridisieren.



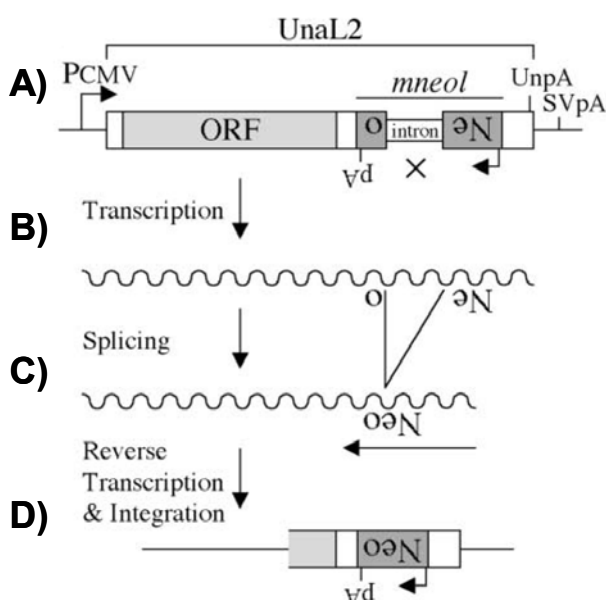
**Abbildung 3.1.28: Southernblot der Ui-Klone**

Das Agarosegel aus Abbildung 3.1.27 wurde auf eine Membran geblottet und mit der radioaktiven Sonde eines TRE5-A-Elementes hybridisiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm dieses Blots.

Die  $ura^-$ -Phänotypen aller untersuchter Ui-Klone sind nicht auf unspezifische Integrationen von TRE5-A-Elementen zurückzuführen, sondern auf natürliche Mutationen innerhalb des UMPS-Gens.

## 3.2 Konstruktion nichtautonomer TRE5-A-Elemente

In dieser Dissertation sollte ein Testsystem entwickelt werden, mit dem die Mobilität eines artifiziellen, minimalen TRE-Retrotransposons untersucht werden kann. Ein Testsystem, mit dem *de novo*-Integrationen von Retrotransposons in verschiedenen Zelltypen untersucht werden können ist bereits für andere Non-LTR-Retrotransposons wie das humane L1-Element entwickelt worden (Moran 1996) (vgl. 1.2.5.2). Dabei wird die reverse Transkription genutzt, um resistente Zellen zu erzeugen, in denen ein Retrotranspositionseignis stattgefunden hat. In die 3'-UTR eines kompletten L1-Elementes wurde dazu eine Neomycin-Expressionskassette in umgekehrter Orientierung des Elementes eingesetzt. In dieser Neomycin-Kassette befindet sich ein Intron in Orientierung des L1-Elementes, sodass das Neomycin-Gen nicht funktionell exprimiert wird, und somit keine Resistenz erzeugt werden kann. Das Intron wird nach der Transkription des artifiziellen Elementes herausgespleißt. Sobald dieses Element wieder in das Genom der Wirtszellen integriert wurde, kann das Neomycin-Gen funktionell exprimiert werden und G418-Resistenz erzeugen. Dieses artifizielle LINE-Retrotransposon wurde in einen Vektor kloniert, der nicht ins Genom integriert wird, sondern nach der Transformation in moderater Kopienzahl als Episom im Zellkern vorliegt und zusätzlich für eine Hygromycin-Resistenz kodiert (Moran 1996). Das Testsystem ist in Abbildung 3.2.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.2.1: Retrotranspositions-assay für markierte LINE-Elemente**

Dargestellt ist der Mechanismus des Retrotranspositionsassays für LINE-Elemente. **A)** In die 3'-UTR eines L2-Elementes ist in entgegengesetzter Orientierung eine Neomycin-Expressionskassette eingesetzt worden, in der sich wiederum ein Intron in umgekehrter Orientierung befindet. Das Neomycin-Gen kann nicht exprimiert werden. **B)** Das L2-Element wird transkribiert und **C)** das Intron in der Neomycin-Expressionskassette wird herausgespleißt. **D)** Das Transkript wird ins Genom der Wirtszelle integriert und revers transkribiert. Da das Intron aus der Neomycin-Expressionskassette herausgespleißt wurde, ist das Neomycin-Gen funktionell. Modifiziert nach Kajikawa (2002)

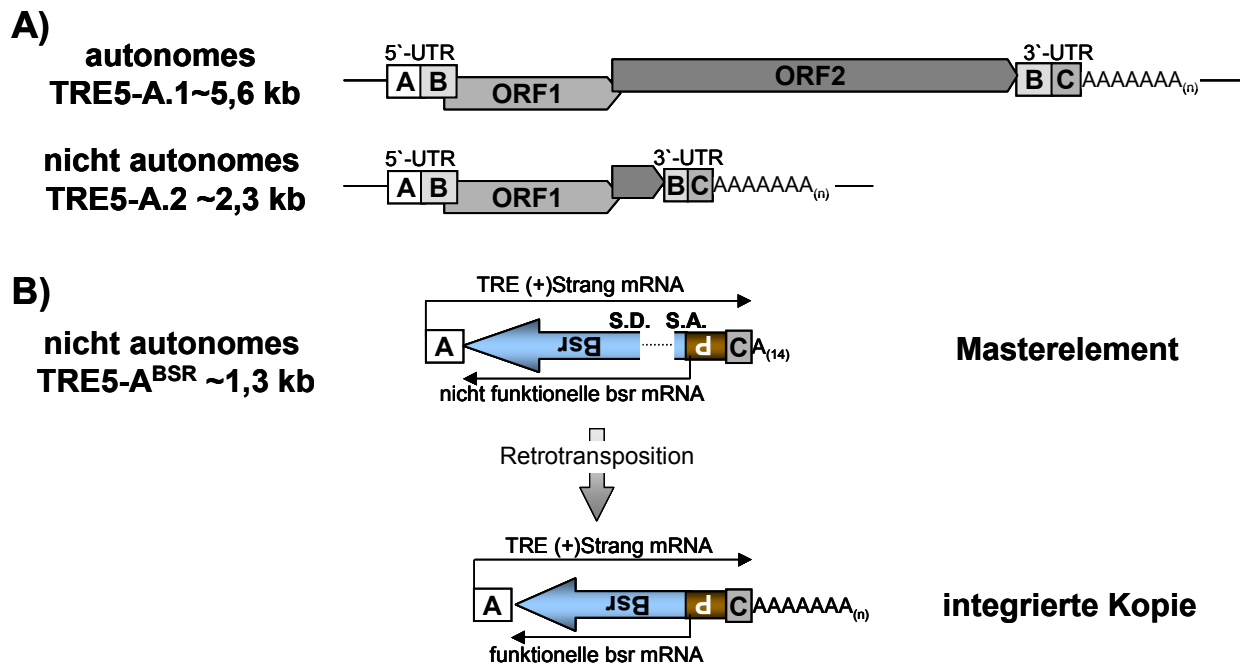
Um überprüfen zu können, welche Elemente eines TRE5-A-Retrotransposons für die Mobilisierung des Elementes notwendig sind, sollte dieses System so für *D. discoideum* Zellen adaptiert werden, dass verschiedene Elemente des Transposons ausgetauscht



werden können. Dafür mussten einige Modifikationen im Vergleich zu dem oben beschriebenen System vorgenommen werden:

- Da eine Kopie Neomycin im *Dictyostelium*-Genom nicht ausreicht, um G418-Resistenz zu erzeugen, wurde anstelle der Neomycin-Resistenz die Blastidicin-Resistenz gewählt (vgl. 2.3.2).
- Ein komplettes TRE5-A.2-Element, welches ein minimales aktives TRE-Retrotransposon darstellt, besteht unter anderem aus zwei B-Modulen und kann daher nicht kloniert werden. Zunächst wurde ein potentiell Mini-TRE (TRE5-A<sup>BSR</sup>), das nur aus einem kompletten A-Modul mit der Wiederholung der ersten 70 bp, einem Blastidicin-Resistenzgen mit Actin15-Promotor und einem C-Modul mit einem Poly-Adenin-Stretch von 14 bp besteht, kloniert. Auf den Terminator der Blastidicin-Expressionskassette konnte verzichtet werden, da der Poly-Adenosin-Stretch am Ende des A-Moduls wahrscheinlich die Blastidicin-mRNA terminiert.
- Da transiente Expressionen in *D. discoideum* sehr ineffektiv sind und für die Retrotranspositions-Versuche möglichst viele Kopien des Master TRE5<sup>BSR</sup>-Elementes im Genom vorhanden sein sollten, wurde das Masterelement zusammen mit einem Vektor, der für eine Neomycin-Resistenz kodiert, stabil ins Genom von AX2-Zellen transformiert. Bei einer Doppeltransformation mit anschließender G418-Selektion (8 µg/ml) ist davon auszugehen, dass ca. 500 Kopien beider Vektoren tandemartig ins Genom integriert werden.

Das konstruierte TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element kodiert nicht für die zur Retrotransposition notwendigen Proteine. Ähnlich wie die TRE5-A.2-Retrotransposons müssen die TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente *in trans* von den Proteinen der natürlichen TRE5-A.1-Elementen in den Zellen mobilisiert werden. Das Testsystem für ein markiertes TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element ist in Abbildung 3.2.2 dargestellt.



**Abbildung 3.2.2: Retrotranspositionsschema für markierte TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente**

**A)** Schematisch dargestellt sind ein autonomes TRE5-A.1-Element und ein nicht autonomes TRE5-A.2-Element. **B)** Zwischen das A- und das C-Modul eines TRE5-A-Elementes wurde im umgekehrter Orientierung ein Blasticidin-Resistenzgen mit einem A15-Promotor kloniert. In dem Blasticidin-Gen befindet sich Orientierung des A- und C-Moduls ein Intron, das herausgespleißt wird, wenn das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element transkribiert wird. Erst nach der Integration und reversen Transkription dieses Elementes kann das Blasticidin-Gen exprimiert werden.

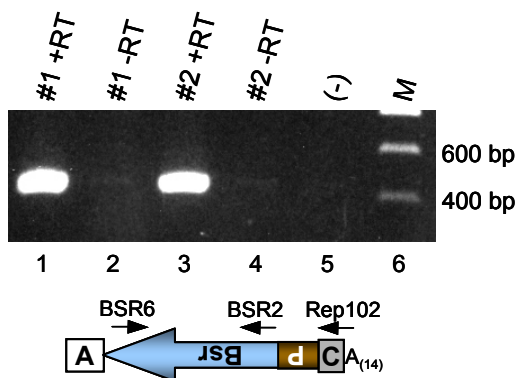
## 3.2.1 Etablierung des Testsystems

### 3.2.1.1 Vollständige Transkription

Für eine Retrotransposition eines TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes ist es unter anderem notwendig, dass die TRE-(+)-Strang-mRNA vollständig über den umgekehrten A15-Promotor, der einen A/T-Gehalt von ca. 90% besitzt, bis zu dem 3'-Ende des C-Moduls transkribiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde das Plasmid pGEM\_A-BSR-C, wie in Abschnitt 7.4.2 beschrieben, kloniert. Dieses Plasmid enthält ein TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element, welches der integrierten Kopie aus Abbildung 3.2.2 entspricht.

Die Stämme A-BSR-C#1 und #2 wurden hergestellt, indem dieses Plasmid stabil in AX2-Zellen transformiert wurde. Die Zellen wurden mit Blasticidin (4 µg/ml) selektioniert und zwei resistente Klone kultiviert. Von diesen Stämmen wurde zunächst die mRNA isoliert, woran anschließend je eine spezifische cDNA mit dem Primer Rep102 hergestellt wurde. Der Primer Rep102 bindet an dem äusseren 3'-Ende des C-Moduls komplementär an die (+)-Strang DNA. An diesen cDNAs wurde eine RT-PCR mit den Primern BSR2 und

BSR6 durchgeführt. Die Primer BSR2 und BSR6 binden in dem Blastocidin-Gen und ergeben ein PCR-Produkt von ca. 450 bp. Die RT-PCR kann nur ein Produkt ergeben, wenn die komplette mRNA des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes bis zur Primerbindestelle vom Rep102 am 3'-Ende des C-Moduls vorlag. Als Kontrollen wurden RT-PCRs zum einen an cDNA-Ansätzen, denen keine Reverse Transkriptase zugegeben wurde und zum anderen ohne Template durchgeführt. In Abbildung 3.2.3 ist zu erkennen, dass die RT-PCRs funktioniert haben und somit eine komplette (+)-Strang-mRNA des TRE5-A<sup>BSR</sup> transkribiert wurde.



**Abbildung 3.2.3: RT-PCR TRE5-A<sup>BSR</sup>**

Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung. Auf ein 1,5%iges Agarosegel wurden die RT-PCR-Produkte von zwei Blastocidin-resistenten AX2-Transformanten mit dem Plasmid pGEM\_A-BSR-C aufgetragen (Spur 1 und 3). Die cDNAs wurden jeweils mit dem Primer Rep102 hergestellt, die RT-PCRs wurden mit den Primern BSR6 und BSR2 durchgeführt. Für Spur 2 und Spur 4 wurde zur Kontrolle der mRNA als Template ein cDNA-Ansatz ohne Reverse Transkriptase verwendet, die RT-PCR in Spur 5 wurde ohne Template durchgeführt.

### 3.2.1.2 Herausspleißen des Introns durch Retrotransposition

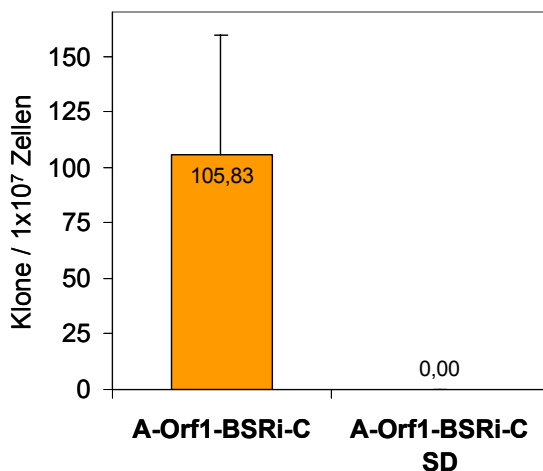
Nachdem geklärt wurde, dass der Actin15-Promotor die Transkription der TRE-(+)-Strang-mRNA nicht terminiert, wurde das Plasmid pGEM\_A-BSRi-C kloniert. Dieses Plasmid enthält das Master-TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element aus Abbildung 3.2.2. Dazu wurde in das Blastocidin-Gen des Vektors pGEM\_A-BSR-C, in entgegengesetzter Orientierung, das 74 bp lange Intron 2 aus dem S17-Gen eingefügt (Bauerle 1995).

Der Vektor pGEM\_A-BSRi-C wurde zusammen mit dem Vektor pISAR, der eine G418-Resistenzkassette trägt, in AX2-Zellen transformiert. Ein G418-resistenter Klon wurde kultiviert. Dadurch wurde der Stamm A-BSRi-C hergestellt und von diesem gDNA isoliert. Zellen dieses Stammes wurden mit Blastocidin (4 µg/ml) selektioniert. Die Zellen, in denen ein TRE5<sup>BSR</sup>-Element mobilisiert wurde, entwickelten durch dieses Retrotranspositionereignis eine Blastocidin-Resistenz und bildeten dadurch einen sichtbaren Klon auf der Petrischale.

### Mutation der Splice-Donor-Site

Es sollte aufgezeigt werden, dass die Blastocin-Resistenz dieser Klone tatsächlich durch funktionelles Herausgespleißen des Introns entsteht. Dazu wurde zunächst die Splice-Donor-Site in dem Plasmid pGEM\_A-ORF1-BSRi-C durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer BSR07 zerstört (GTAAG→AAAGC), und so das Plasmid pGEM\_A-ORF1-BSRi-C SD hergestellt.

Die Plasmide pGEM\_A-ORF1-BSRi-C SD und pGEM\_A-ORF1-BSRi-C wurden jeweils zusammen mit dem Plasmid pISAR in AX2-Zellen transformiert. Von beiden Transformationen wurden je fünf unabhängige, G418-resistente Klone kultiviert. 34 Tage nach der Transformation wurden von jedem Klon drei Petrischalen mit je  $1 \times 10^7$  Zellen mit Blastocidin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) selektiert. Die Blastocidin-resistenten Klone wurden pro Petrischale gezählt und in Abbildung 3.2.4 grafisch dargestellt. Während bei den Transformanden mit der intakten Splice-Site ca. 100 Klone pro  $10^7$  Zellen entstanden, entstanden auf den 15 Petrischalen der transformierten Zellen mit der mutierten Splice-Donor-Site keine Blastocidin-resistenten Klone. Dies zeigte, dass jeder Blastocidin-resistente Klon in diesem Testsystem durch eine Retrotransposition eines TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes entstanden sein musste.



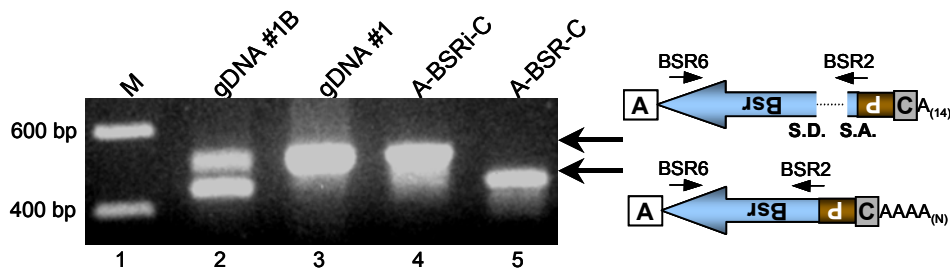
**Abbildung 3.2.4: BSR-Selektion mit mutierter Splice-Donor-Site**

Die Plasmide pGEM\_A-ORF1-BSRi-C SD und pGEM\_A-ORF1-BSRi-C wurden jeweils zusammen mit dem Plasmid pISAR in AX2-Zellen transformiert. Von beiden Transformationen wurden jeweils fünf G418-resistente Klone kultiviert. 34 Tage nach der Transformation wurden von jedem Klon drei Petrischalen mit je  $1 \times 10^7$  Zellen mit Blastocidin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) selektiert und die Klone pro Petrischale gezählt. Die Klonzahlen wurden für jeden Stamm zusammengefasst. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

### DNA-Analysen eines Blastocidin-resistenten Klons

Von einem Blastocidin-resistenten Klon des Stammes A-BSRi-C wurde gDNA präpariert und diese mit den Primern BSR2 und BSR6 amplifiziert. Bei Zellen, in denen ein TRE5<sup>BSR</sup>-Element mobilisiert wurde, sollten zwei unterschiedlich große PCR-Produkte entstehen, da zum einen die Masterelemente mit dem Intron (521 bp), und zum anderen das mobilisierte Element ohne Intron (447 bp) amplifiziert werden müssten. Die PCR mit den Primern BSR2 und BSR6 wurde auch an der gDNA, die vor der Blastocidin-Selektion isoliert wurde, durchgeführt. Als Größenvergleich wurde die PCR zusätzlich an den Vektoren

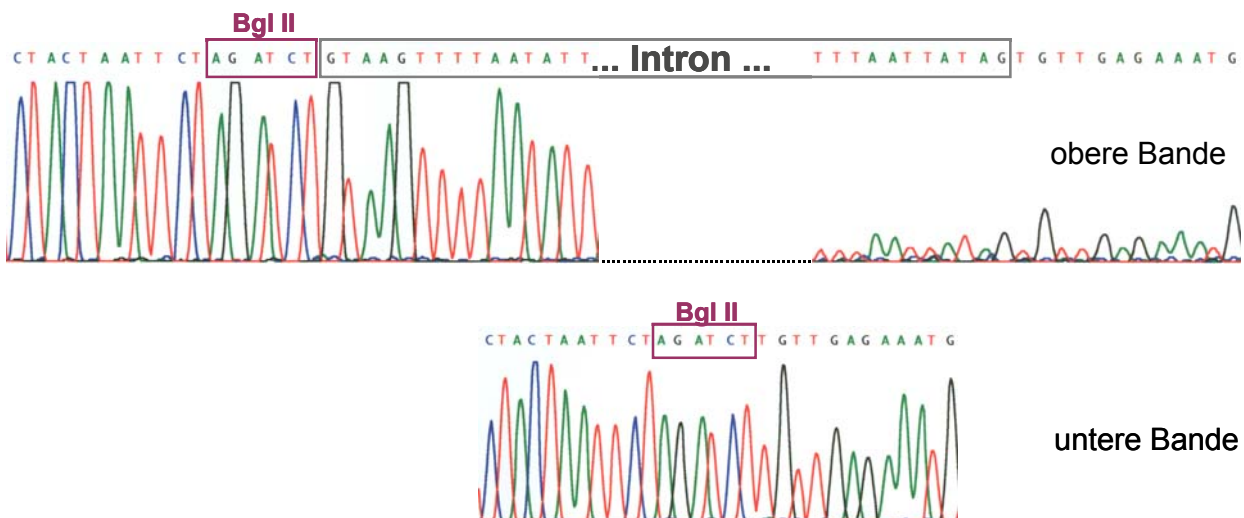
ren pGEM\_A-BSR-C und pGEM\_A-BSRi-C durchgeführt. In Abbildung 3.2.5 ist zu erkennen, dass alle PCR-Produkte die erwarteten Größen besaßen.



**Abbildung 3.2.5: PCR an BSR-restitenten AX2-A-BSRi-C Zellen**

Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung. Auf ein 1,5%iges Agarosegel wurden die PCR-Produkte mit den Primern BSR2 und BSR6 aufgetragen. In Spur 3 wurde als Template gDNA von einem G418-resistenten AX2-Klon, der mit den Plasmiden pGEM\_A-ORF1-BSRi-C und pISAR transformiert wurde, verwendet (#1). Diese Zellen wurden mit Blastidicin (4 µg/ml) selektiert. gDNA von einem Blastidicin-resistenten Klon wurde in Spur 2 als Template verwendet (#1B). In den Spuren 4 und 5 wurden zur Größenkontrolle die Vektoren pGEM\_A-BSR-C und pGEM\_A-BSRi-C als PCR-Template verwendet.

Spur 2 in Abbildung 3.2.5 enthält sowohl die PCR-Bande für die Master-Elemente des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Transposons, wie auch die mobilisierte Kopie dieses Elementes. Diese beiden Banden wurden isoliert und sequenziert.



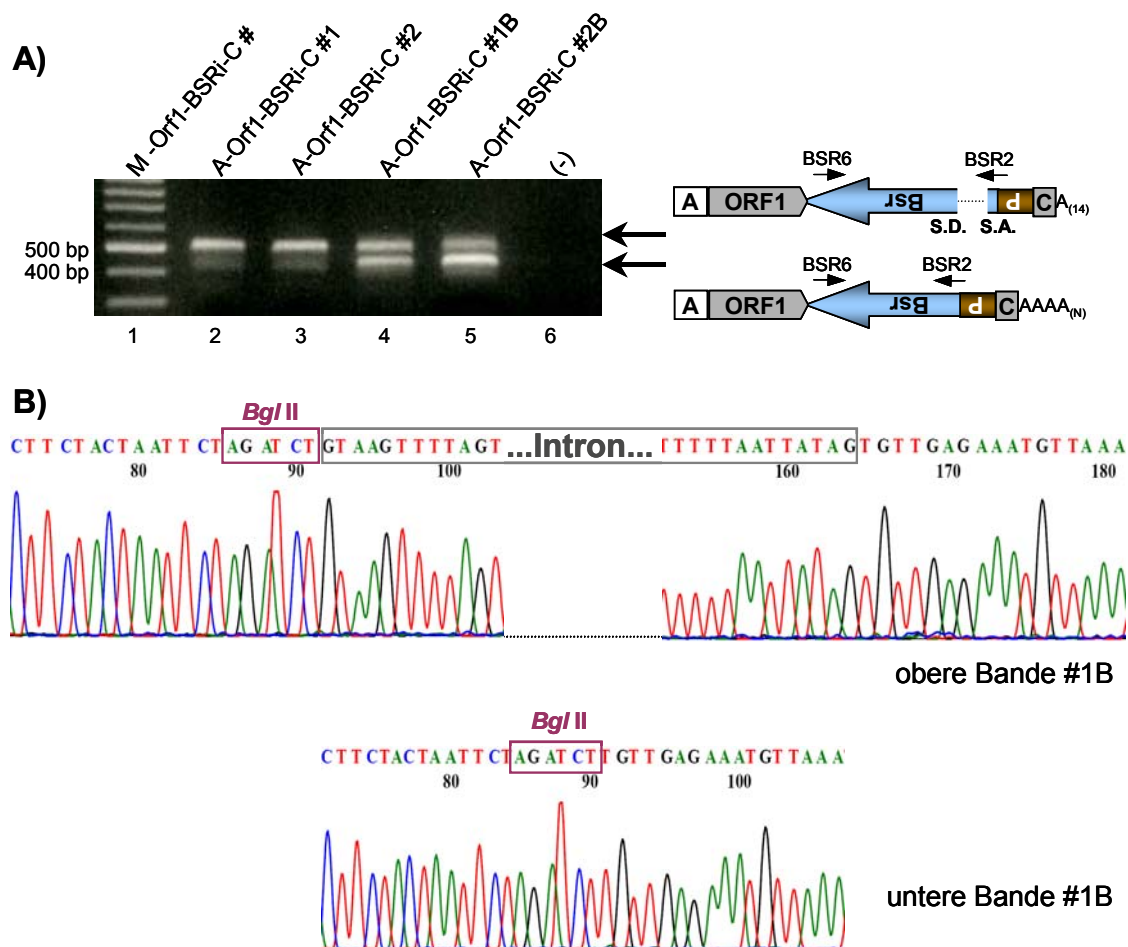
**Abbildung 3.2.6: Sequenzen des Introns eines mobilisierten A-BSRi-C-Elementes**

Die beiden PCR-Fragmente aus Spur 2 in Abbildung 3.2.5 wurden isoliert und sequenziert. Dargestellt sind die flankierenden Sequenzen des Introns bzw. die Stelle an der das Intron in einem A-BSRi-C-Element herausgespleißt wurde.

In Abbildung 3.2.6 ist anhand der Sequenzen zu erkennen, dass bei dem Template des kleineren PCR-Fragmentes das Intron herausgespleißt wurde. Durch das orthodoxe Herauspleißten des Introns konnte gezeigt werden, dass das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element von dem A-Modul aus transkribiert wurde, dieses Transkript anschließend revers transkribiert und in das Genom integriert wurde. Damit konnte bestätigt werden, dass das artifizielle TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element in *Dictyostelium discoideum*-Zellen mobil ist.

### TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element mit einem ORF1

In weiteren Versuchen wurde erkannt, dass ein TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element, welches hinter dem A-Modul zusätzlich den ORF1 eines TRE5-A.1-Elementes besitzt, eine deutlich höhere Retrotranspositionsfrequenz, als ein A-BSRi-C-Element, zeigt. Dies korreliert mit bisherigen Erkenntnissen über andere Non-LTR-Retrotransposons, bei denen eine Mobilisierung durch Retrotransposon-kodierte Proteine *in trans* deutlich schwächer ist, als eine Mobilisierung *in cis* (vgl. 1.2.3.2).



**Abbildung 3.2.7: Untersuchung von A-ORF1-BSRi-C Klonen**

**A)** Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung. Auf ein 1,5%iges Agarosegel wurden PCR-Produkte mit den Primern BSR2 und BSR6 aufgetragen. In Spur 2 und 3 wurde als Template gDNA von zwei unabhängigen G418-resistenten AX2-Klonen, die mit den Plasmiden pGEM\_A-ORF1-BSRi-C und pISAR transformiert wurden, verwendet (#1 und #2). Diese Zellen wurden mit Blastidicin (4 µg/ml) selektiert. gDNA von je einem Blastidicin-resistenten Klon wurde in Spur 4 und 5 als Template verwendet (#1B und #2B). Zur Kontrolle wurde die PCR in Spur 6 ohne Template durchgeführt. **B)** Die Bande aus Spur 2 und die untere Bande aus Spur 4 wurden isoliert, in den Vektor pGEM<sup>®</sup>T ligiert und sequenziert. Dargestellt sind die flankierenden Sequenzen des Introns in dem Blastidicin-Gen.

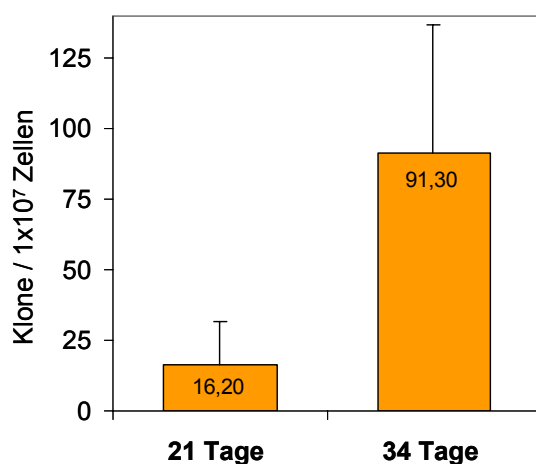
Der Vektor pGEM\_A-ORF1-BSRi-C wurde hergestellt, in dem hinter das A-Modul des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes in dem Vektor pGEM\_A-BSRi-C der ORF1 eines TRE5-A-Retrotransposons kloniert wurde. Dieser Vektor wurde zusammen mit dem Vektor

pISAR in AX2-Zellen transformiert und so der Stamm A-ORF1-BSRi-C hergestellt. Da dieses Element als Ausgangspunkt für weitere Modifikationen gewählt wurde, wurde auch für diese Element analog zu dem A-BSRi-C-Element gezeigt, dass die Blastocidin-resistenten Klone durch Mobilisierung eines TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes entstanden sind. Dies ist in Abbildung 3.2.7 für zwei Blastocidin-resistente Klone dargestellt (die Sequenzdaten sind nur für Klon #1 gezeigt). Insgesamt wurde für 15 Blastocidin-resistente Klone nachgewiesen, dass das Intron wie erwartet herausgespleißt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Spuren 2 und 3, in denen gDNA von den transformierten Zellen vor der Blastocidin-Selektion als Template diente, zeigten auch schwache PCR-Banden von mobilisierten Elementen ohne Intron. Dies ist durch die hohe Aktivität des A-ORF1-BSRi-C Elementes zu erklären. Da genügend Elemente schon vor der Blastocidin-Selektion mobilisiert wurden, um vor dem Hintergrund der Zellen ohne Retrotranspositionereignis mittels PCR detektiert werden zu können.

Es wurde mehrfach versucht, dieses aktive Element nach transients Expression, also ohne vorherige Selektion mit G418 und Integration des Masterplasmides in das *Dictyostelium*-Genom, zu mobilisieren. Dabei sind keine Blastocidin-resistenten Klone entstanden.

### Akkumulation von Retrotranspositionereignissen

Um zu zeigen, dass die TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element kontinuierlich mobilisiert werden, wurden fünf Klone des Stammes A-ORF1-BSRi-C kultiviert. Nach 21 Tagen wurden von jedem Klon drei Petrischalen mit jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen mit Blastocidin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) selektioniert. Die restlichen Zellen wurden weiter kultiviert und 13 Tage später (34 Tage nach der Transformation) eine weitere Selektion mit diesen Zellen angesetzt. Die Klonzahlen der 15 Petrischalen pro Zeitpunkt wurden zusammengefasst und in Abbildung 3.2.8 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass mehr TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente mobilisiert wurden, wenn die Zellen länger in Kultur gehalten werden.



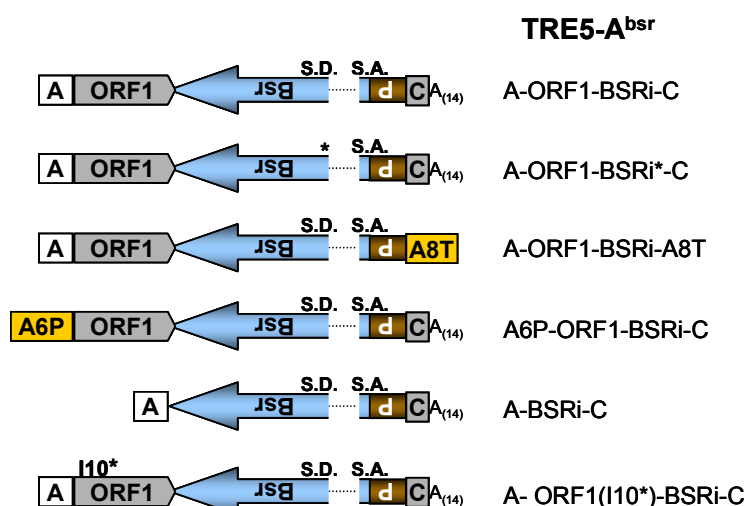
**Abbildung 3.2.8: Mobilisierte Elemente pro Zeit**

AX2-Zellen wurden mit den Plasmiden pISAR und pGEM\_A-ORF1-BSRi-C transformiert und anschließend mit G418 (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) selektioniert. Von jeweils 5 Klonen wurden jeweils 3 Petrischalen mit je  $10^7$  Zellen 21 bzw. 34 Tage nach der Transformation mit Blastocidin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) selektioniert. Die Klone pro Petrischale wurden ausgezählt. Die Klonzahlen aller Petrischalen eines Zeitpunktes wurden zusammengefasst und grafisch dargestellt. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

### 3.2.2 Retrotranspositionsfrequenzen verschiedener TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente

Es sollten verschiedene Teile eines aktiven TRE5-A<sup>BSR</sup>-Retrotransposons modifiziert oder ausgetauscht werden, um überprüfen zu können, welche Teile eines artifiziellen TREs notwendig zur Retrotransposition sind. Dazu wurden drei weitere Plasmide aus dem Vektor pGEM\_A-ORF1-BSRi-C hergestellt.

- Das C-Modul wurde in dem Vektor pGEM\_A-ORF1-BSRi-C gegen einen Actin8-Terminator ausgetauscht (pGEM\_A-ORF1-BSRi-A8T). Mit diesem Konstrukt sollte gezeigt werden, dass die TRE5-A-Elemente das C-Modul zu ihrer Mobilisierung benötigen.
- Das A-Modul wurde in dem Vektor pGEM\_A-ORF1-BSRi-C gegen einen Actin6-Promotor ausgetauscht (pGEM\_A6P-ORF1-BSRi-C). Der Actin6-Promotor wurde so kloniert, dass das die beiden ATGs an dem 3'-Ende des Promotors *in frame* mit dem ATG von ORF1 des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes liegen. Mit diesem Konstrukt sollte überprüft werden, ob die TRE5-A-Elemente das A-Modul oder „nur“ einen beliebigen Promotor zu ihrer Mobilisierung benötigen.
- In Vorversuchen stellte sich heraus, dass TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente mit einem ORF1 aktiver sind, als A-BSRi-C-Elemente. Daher sollte überprüft werden, ob sich die Aktivität eines TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes änderte, wenn nur die ORF1-mRNA *in cis* vorlag, aber das ORF1-Protein *in trans* von anderen TRE-Elementen in der Zelle bereit gestellt werden musste. Dazu wurde der Vektor pGEM\_A-ORF1(I10\*)-BSRi-C mit einer Doppelstrangmutagenese an dem Vektor pGEM\_A-ORF1-BSRi-C hergestellt. Durch die Mutation wurde an Aminosäureposition 10 im ORF1 ein *ochre*-Stopp-Codon eingefügt, sodass das ORF1-Protein von diesem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element nicht exprimiert werden konnte.



**Abbildung 3.2.9:**

#### TRE5-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte

Schematisch dargestellt sind die TRE5-A<sup>BSR</sup>-Konstrukte, die auf ihre Retrotranspositionsfrequenz untersucht werden sollten

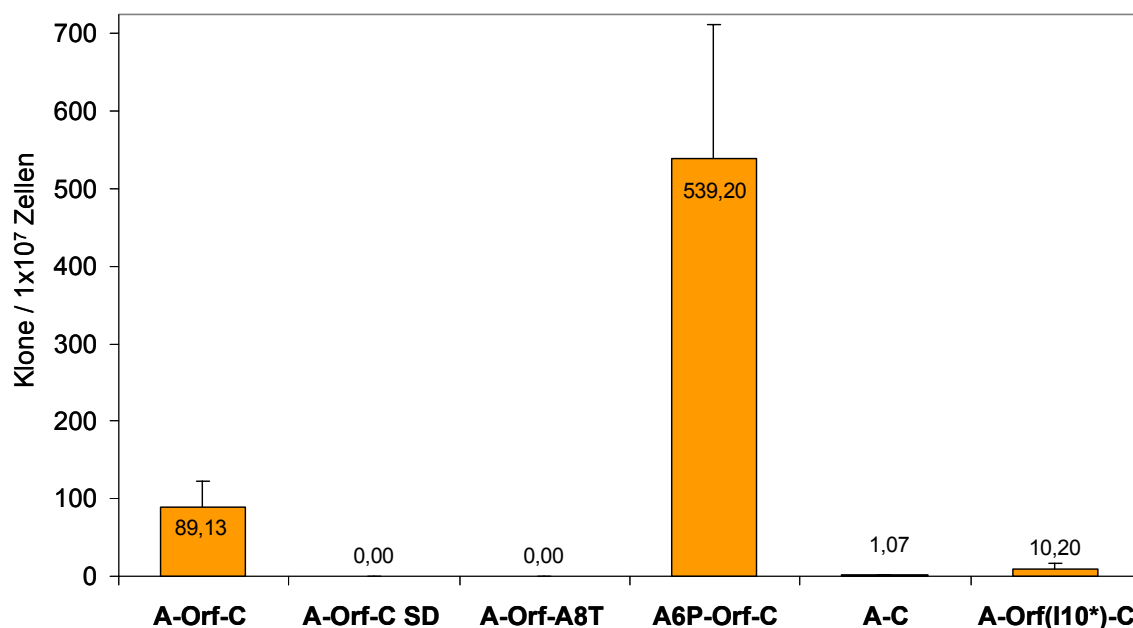


Die TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente dieser drei Vektoren sollten zusammen mit den TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementen A-BSRi-C, A-ORF1-BSRi-C und A-ORF1-BSRi-C\_SD auf ihre Retrotranspositionsfrequenz untersucht werden. Eine Übersicht dieser TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente ist in Abbildung 3.2.9 dargestellt.

Die Konstrukte aus Abbildung 3.2.9 wurden jeweils zusammen mit dem Plasmid pISAR in AX2-Zellen transformiert und je fünf unabhängige, G418-resistente Klone kultiviert. 34 Tage nach der Transformation wurden von jedem Klon drei Petrischalen mit je  $1 \times 10^7$  Zellen mit Blasticidin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) selektioniert. Die Blasticidin-resistenten Klone pro Petrischale wurden gezählt, die Klonzahlen der 15 Petrischalen jedes Stammes zusammengefasst und in Abbildung 3.2.10 grafisch dargestellt.

Wie erwartet, entstanden in dem Stamm A-ORF1-BSRi-C ca. 100 Blasticidin-resistente Klone pro  $10^7$  Zellen und in dem Stamm A-ORF1-BSRi-C SD mit der mutierten Splice-Donor-Site kein Blasticidin-resistenter Klon.

In dem Stamm mit dem das C-Modul gegen den Actin8-Terminator ausgetauscht wurde, fand keine Retrotransposition des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes statt. Damit konnte gezeigt werden, dass das C-Modul ein essentieller Faktor für die Retrotransposition der TRE5-A-Elemente ist.



**Abbildung 3.2.10: Retrotranspositionsfrequenzen von TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementen**

Sechs unterschiedliche TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente wurden jeweils zusammen mit dem Plasmid pISAR in AX2-Zellen transformiert, je fünf G418-resistente Klone wurden kultiviert. 34 Tage nach der Transformation wurden von jedem Klon drei Petrischalen mit je  $1 \times 10^7$  Zellen mit Blasticidin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) selektioniert. Die Blasticidin-resistenten Klone pro Petrischale wurden gezählt, die Klonzahlen aller 15 Petrischalen eines Stammes wurden zusammengefasst und grafisch dargestellt. Als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung eingesetzt.

Der Stamm mit dem Actin6-Promotor in dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element zeigte eine deutlich höhere Transpositionsrate als der Stamm A-ORF1-BSRi-C. Die höhere Transpositionsrate

des Elementes mit dem Actin6-Promotor gegenüber dem Element mit dem A-Modul lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass der Actin6-Promotor ein stärkerer Promotor, als das A-Modul ist und somit sowohl mehr TRE5-A<sup>BSR</sup>-Transkript, als auch mehr ORF1-Protein in den Zellen vorlag. Es konnte damit gezeigt werden, dass das A-Modul nur als Promotor für die Mobilisierung der TREs benötigt wird und keine weitere essentielle Funktion für die Mobilisierung der TRE5-A-Elemente besitzt.

Das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element ohne ORF1 (A-BSRi-C) generierte ca. 1 Klon pro Petrischale mit  $10^7$  eingesetzten Zellen. Daran ist deutlich zu erkennen, dass der ORF1 *in cis* für die Aktivität der TRE-Elemente sehr wichtig, aber nicht zwingend notwendig ist.

Das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element mit der Mutation in ORF1 erbrachte ca. 10 Klone pro eingesetzten  $10^7$  Zellen. Dies ist deutlich mehr als bei dem Stamm, dessen TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element nicht für ORF1 kodiert, aber auch deutlich weniger, als bei dem Stamm mit einem intakten ORF1. Das deutet darauf hin, dass sowohl die ORF1 mRNA *in cis*, als auch die ORF1-Proteine *in cis* die Aktivität der TRE5-A-Elemente zu erhöhen.

Alle Selektionen wurden wenigstens einmal mit neuen Transformanden und ähnlichem Ergebnis wiederholt (Daten nicht gezeigt).

Es wurde versucht mit einem Western-Blot zu zeigen, dass in den Stämmen mit dem Actin6-Promotor mehr ORF1-Protein vorliegt, als in den Stämmen mit einem A-Modul vor dem ORF1. In beiden Fällen sind neben den eingebrachten Konstrukten ca. 70 natürliche Kopien von TRE5-A-Elementen in den Zellen vorhanden. Das ORF1-Protein konnte in AX2-Zellen durch einem Western-Blot mit Gesamtzellextrakt bisher nicht nachgewiesen werden (Hentschel 2001b). Auch in den Transformanden der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente konnte das ORF1-Protein im Westernblot nicht detektiert werden.

Die beiden Vektoren pGEM\_A-BSRi-C und pGEM\_A-ORF1(I10\*)-BSRi-C wurden zusammen mit dem ORF1-Expressionsplasmid pDXA-HC-ORF1 in AX2-Zellen transformiert, sodass in diesen Zellen mehr ORF1-Protein vorhanden war. Diese Transformanden zeigten keine höhere Retrotranspositionsfrequenz als die Transformanden ohne das ORF1-Expressionsplasmid (Daten nicht gezeigt). Auch in diesen beiden Stämmen konnte ORF1 im Westernblot nicht nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Integrationsorte der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente

Die Integrationsorte von einigen *de novo* TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementen sollten untersucht werden um zu überprüfen, ob diese Elemente in dem erwarteten Abstand oberhalb von Pol III-Genen ins Genom integriert wurden. Dies sollte eigentlich mittels inverser PCR

geschehen. Trotz mehrerer Modifikationen war es nicht möglich, mittels iPCR die neu integrierten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente vor dem genomischen Hintergrund von ca. 500 Master-elementen zu isolieren. Aus diesem Grund musste eine andere Strategie gewählt werden um die Integrationsorte der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente zu untersuchen. Diese gewählte Strategie basierte auf der Annahme, dass die Elemente orientierungsspezifisch, oberhalb von tRNA-Genen integrieren. Die Integrationsorte sollten mit einer spezifischen PCR zwischen bestimmten tRNA-Genen und dem Blastocidin-Resistenzgen amplifiziert werden.

Oberhalb vieler *D. discoideum*-tRNA-Gene sind bereits natürliche TRE5-A-Elemente integriert. Daher wäre es kompliziert, TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente, die ein A-Modul besitzen, von den natürlichen Elementen zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die Integrationsorte nur für das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element bestimmt, welches den Actin6-Promotor besitzt (A6-ORF1-BSRi-C).

Zunächst wurden Blastocidin-Selektionen mit diesem Stamm auf mehreren Petrischalen durchgeführt. Jeweils etwa 200 Blastocidin-resistente Klone wurden gepoolt und davon genomische DNA präpariert. An diesen gDNAs wurden PCRs mit einem tRNA-Gen spezifischen Primer und dem Primer BSR5, der komplementär an das 5'-Ende der Blastocidin-Resistenzkassette bindet, durchgeführt. Die tRNA-Gen spezifischen Primer binden komplementär an die (+)-Strang-DNA an dem 3'-Ende des tRNA-Gens. Es wurden die tRNA-Gene der Familien Val<sup>UAC</sup>, Val<sup>AAC</sup>, Glu<sup>UUC</sup>, Asp<sup>GUC</sup>, Leu<sup>UAA</sup>, Gly<sup>GCC</sup> und Lys<sup>UUU</sup> ausgewählt. Die tRNA-Gene dieser Familien stellen insgesamt 125 aller 390 tRNA-Gene in *D. discoideum* dar. Eine Übersicht über die Kopienzahl aller 390 tRNA-Gene im *Dictyostelium*-Genom ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

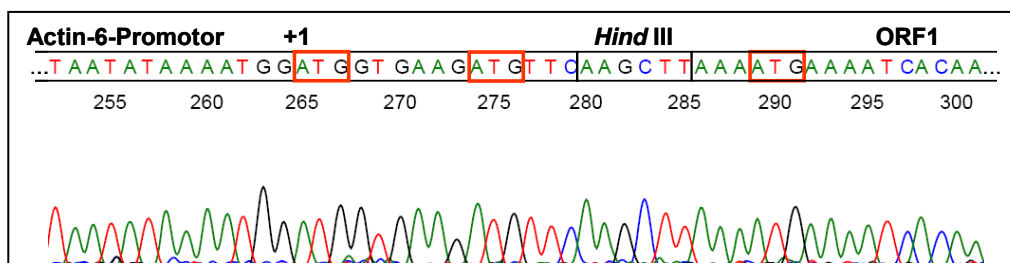
tRNA-Gen	Kopienzahl	tRNA-Gen	Kopienzahl	tRNA-Gen	Kopienzahl	tRNA-Gen	Kopienzahl	tRNA-Gen	Kopienzahl
Ala <sup>AGC</sup>	15	Asp <sup>AUC</sup>	0	His <sup>AUG</sup>	0	Met <sup>CAU</sup>	14	Ser <sup>ACU</sup>	0
Ala <sup>UGC</sup>	8	Cys <sup>GCA</sup>	8	Ile <sup>AAU</sup>	17	Phe <sup>GAA</sup>	13	Thr <sup>AGU</sup>	16
Ala <sup>GGC</sup>	0	Cys <sup>ACA</sup>	0	Ile <sup>UAU</sup>	4	Phe <sup>AAA</sup>	0	Thr <sup>CGU</sup>	1
Ala <sup>CGC</sup>	0	Gln <sup>CUG</sup>	1	Ile <sup>GAU</sup>	0	Pro <sup>AGG</sup>	1	Thr <sup>UGU</sup>	6
Arg <sup>ACG</sup>	6	Gln <sup>UUG</sup>	13	Leu <sup>AAG</sup>	11	Pro <sup>UGG</sup>	15	Thr <sup>GGU</sup>	0
Arg <sup>CCU</sup>	1	Glu <sup>CUC</sup>	3	Leu <sup>CAA</sup>	4	Pro <sup>GGG</sup>	0	Trp <sup>CCA</sup>	7
Arg <sup>UCG</sup>	1	<b>Glu<sup>UUC</sup></b>	<b>19</b>	Leu <sup>CAG</sup>	1	Pro <sup>CGG</sup>	0	Tyr <sup>GUA</sup>	12
Arg <sup>UCU</sup>	10	<b>Gly<sup>GCC</sup></b>	<b>18</b>	<b>Leu<sup>UAA</sup></b>	<b>17</b>	Ser <sup>AGA</sup>	9	Tyr <sup>AUA</sup>	0
Arg <sup>GCG</sup>	0	Gly <sup>UCC</sup>	5	Leu <sup>UAG</sup>	3	Ser <sup>CGA</sup>	1	<b>Val<sup>AAC</sup></b>	<b>21</b>
Arg <sup>COG</sup>	0	Gly <sup>ACC</sup>	0	Leu <sup>GAG</sup>	0	Ser <sup>GCU</sup>	12	Val <sup>CAC</sup>	1
Asn <sup>GUU</sup>	18	Gly <sup>CCC</sup>	0	Lys <sup>CUU</sup>	10	Ser <sup>UGA</sup>	14	<b>Val<sup>UAC</sup></b>	<b>6</b>
Asn <sup>AUU</sup>	0	His <sup>GUG</sup>	9	<b>Lys<sup>UUU</sup></b>	<b>22</b>	Ser <sup>GGA</sup>	0	Val <sup>GAC</sup>	0
<b>Asp<sup>GUC</sup></b>	<b>22</b>								

**Tabelle 3-1: Verteilung der tRNA-Gene in *D. discoideum***

Dargestellt ist eine Übersicht der Kopienzahlen aller tRNA-Gene im Genom von *D. discoideum*. Markiert sind die tRNA-Gen Familien, in deren Umgebung nach TRE5-A<sup>BSR</sup>-Integrationen gesucht wurde.

Eine schematische Übersicht, wie die TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente vor einem tRNA-Gen integriert sein sollten, ist in Abbildung 3.2.12.A dargestellt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T ligiert und anschließend sequenziert.

Die Sequenzen für acht Integrationsorte des A6-ORF1-BSRi-C-Elementes sind in Abbildung 3.2.12.A dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass der Actin6-Promotor kein interner Promotor wie das A-Modul ist. Das Transkript dieses Promotor beginnt kurz vor seinem 3'-Ende, d. h. die mRNA eines vollständigen TRE5-A<sup>bsr</sup>-Element beginnt ca. 50 bp oberhalb von ORF1. An dem 3'-Ende des Promotors befinden sich zwei weitere ATGs in frame mit dem eigentlichen Start-Codon von ORF1. Das Adenin des ersten ATGs wurde als Nukleotid +1 dieses TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes gezählt. Der Translationsstart von ORF1 ist in Abbildung 3.2.11 dargestellt.



**Abbildung 3.2.11: Umgebung des Translationsstartes von ORF1**

Dargestellt ist der Übergang zwischen dem Actin6-Promotor und ORF1 in dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element A6-ORF1-BSRi-C. Das als +1 gezählte Nukleotid ist angedeutet.

In Abbildung 3.2.12.A ist zu erkennen, dass drei Integrationen zwischen 45 bp und 50 bp unterhalb von tRNA-Genen auf verschiedenen Chromosomen stattgefunden haben. Die Integration in Klon #Leu<sup>UAA</sup>6 lag mit -28 bp deutlich näher als erwartet an einem tRNA-Gen. Ob hier eine Zielsequenz-Deletion vorlag wurde nicht untersucht. Vier weitere Integrationen wurden zwischen -114 bp und -127 bp unterhalb einer genomischen B-Box, die nicht mit einem tRNA-Gen assoziiert ist, gefunden. Diese B-Box liegt auf dem extrachromosomalen Palindrom. Da diese B-Box sehr starke Homologie zu den B-Boxen der tRNA-Gene aufweist, binden auch die tRNA-Gen spezifischen Primer für das Val<sup>AAC</sup>- und das Lys<sup>UUU</sup>-Gen an diese B-Box. Aus diesem Grund wurden TRE5-A<sup>BSR</sup>-Integrationen unterhalb dieser B-Box durch die PCR ebenfalls amplifiziert. Ein Alignment dieser B-Box zu den 3'-Enden dieser tRNA-Gene sind in Abbildung 3.2.12.B dargestellt. Darin ist deutlich zu erkennen, dass die 3'-Enden der beiden Primer an die B-Box auf dem Palindrom hybridisieren können. Bei den acht untersuchten Elementen wurde durch Sequenzdaten gezeigt, dass das Intron orthodox aus der Blasticidin-Resistenzkassette herausgespleißt wurde (Daten nicht gezeigt). Fünf der acht integrierten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente beginnen 38-44 bp vor dem ersten ATG von ORF1. Dies deutet darauf hin, dass das Transkript dieses Promotors in diesem Bereich beginnt, und dass es sich bei den integrierten Elementen nicht um 5'-verkürzte, sondern um komplett integrierte Elemente handelt.

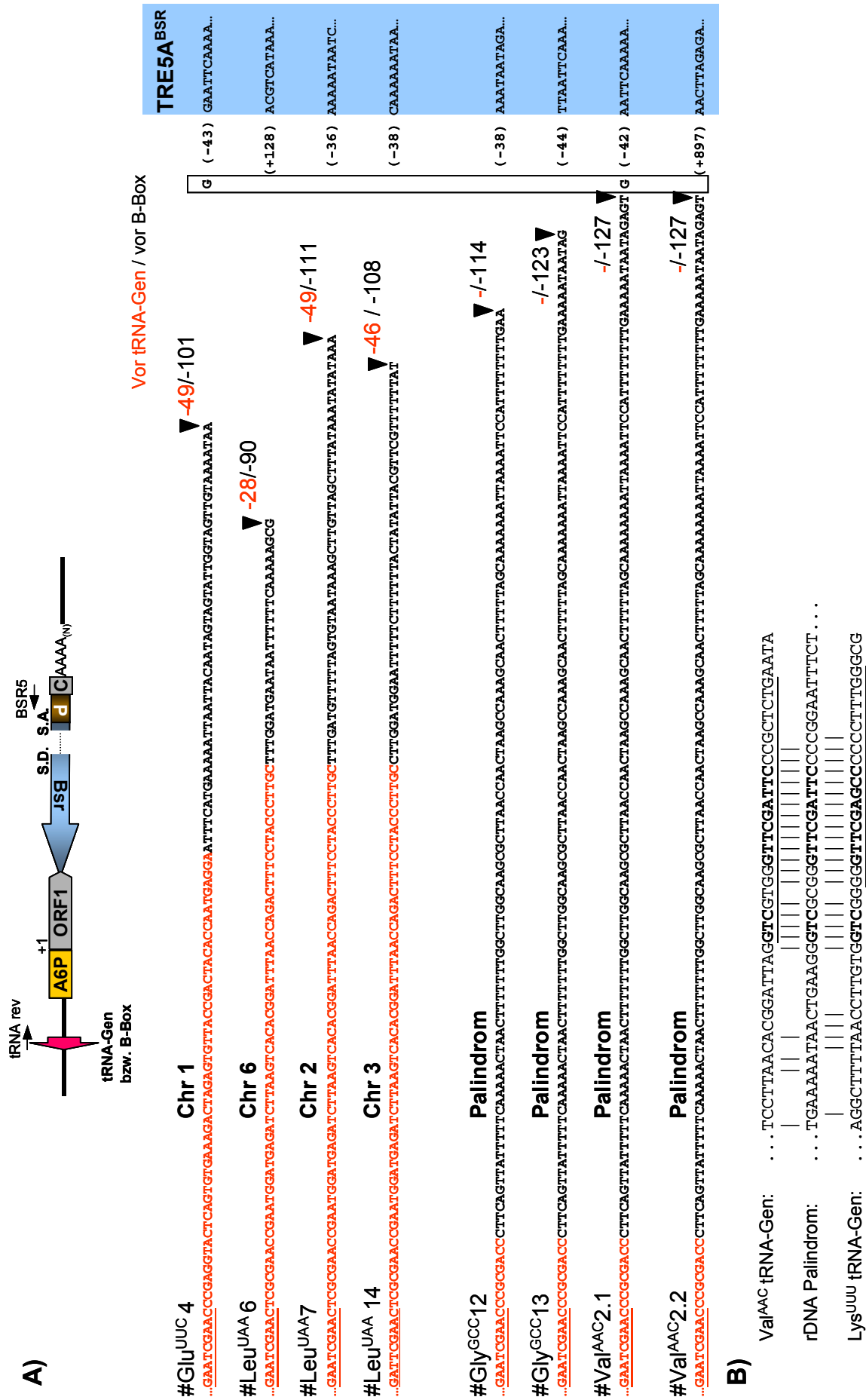


Abbildung 3.2.12: Integrationsorte der TRE5A<sup>BSR</sup>-Elemente

**Abbildung 3.2.12: Integrationsorte der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente**

Der Vektor pGEM\_A6P-ORF1-BSRI-C wurde zusammen mit dem Vektor pISAR in AX2-Zellen transformiert, G418-resistente Klone kultiviert und mehrere zugewachsene Petrischalen (je ca.  $10^7$  Zellen) mit Blastidicin (4  $\mu\text{g/ml}$ ) selektioniert. Die Blastidicin-resistenten Klone jeder Petrischalen ( $n \approx 200$ ) wurden gepoolt, gDNA präpariert und daran PCRs mit dem Primer BSR5 und einem tRNA-Gen spezifischen Primer (Val(AAC)rev, Glu(UUC)rev, Leu(UAA)rev, Gly(GCC)rev) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T kloniert und darin sequenziert. Die Sequenzen sind in **A**) dargestellt. Die tRNA-Gene bzw. die B-Box auf dem Palindrom sind rot dargestellt, die konservierten Bereiche der B-Boxen sind unterstrichen. Die TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente sind blau unterlegt, die Position der ersten Base des Transposons ist in Klammern angegeben. Als +1 Nukleotid wird das A des ersten ATG des Actin6-Promotors gezählt. Durch die Retrotransposition zusätzlich eingefügten Nukleotide stehen in der Box vor den Klammern. Die Integrationsorte sind mit einem Pfeil markiert und die Abstände zu dem tRNA-Gen bzw. der B-Box sind in roten bzw. schwarzen Zahlen angegeben. **B**) Die B-Box auf dem Palindrom wurde amplifiziert, da die Primer Val(AAC)rev und Gly(GCC)rev auch auf dem Palindrom hybridisieren. Ein Alignment der B-Box auf dem Palindrom mit den 3'-Enden des Gly<sup>GCC</sup>- und des Val<sup>AAC</sup>-Gens ist dargestellt. Die Primerbindestellen in den beiden Genen sind unterstrichen.

**Untersuchungen der TSD und genomischen Umgebung eines Integrationsortes**

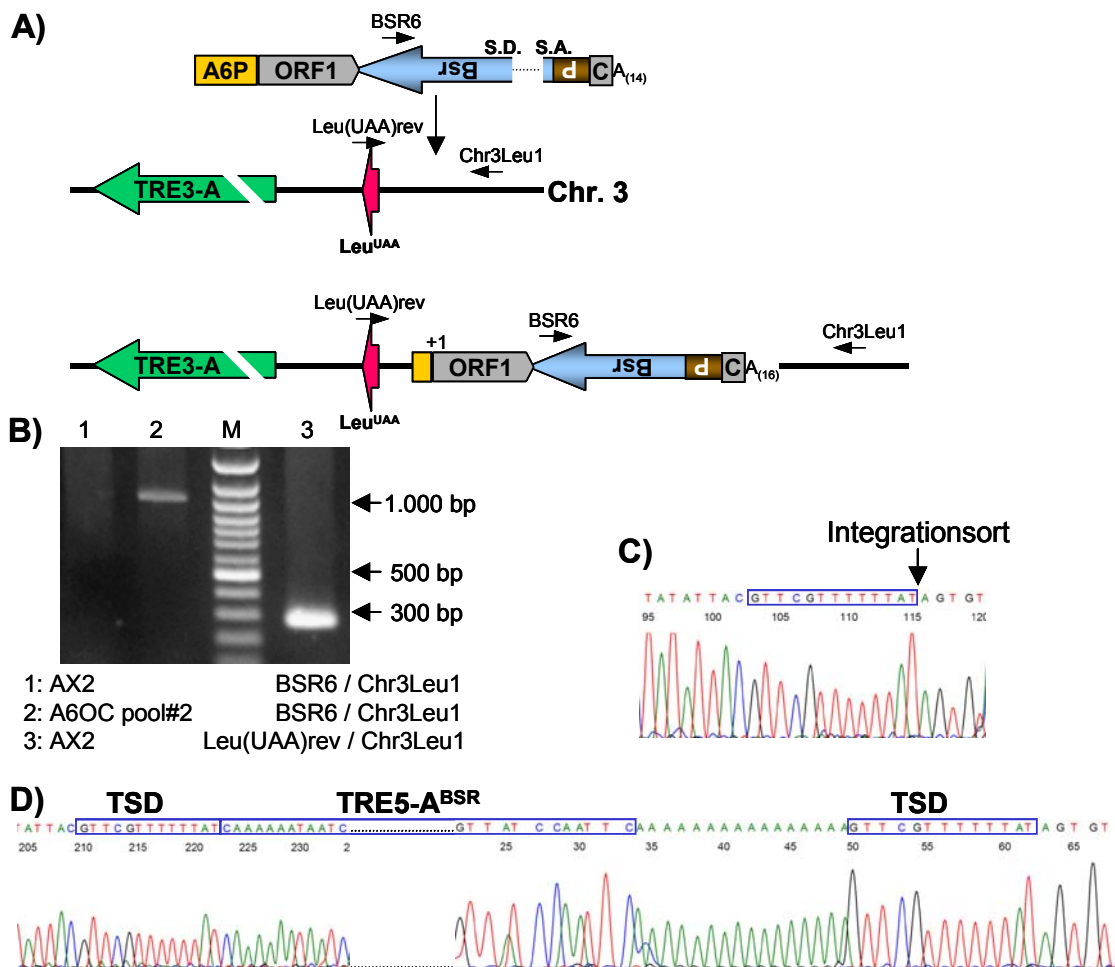
Für einen Klon sollte gezeigt werden, dass das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element orthodox in das *Dictyostelium*-Genom integriert wurde. Dafür wurde zum einen die Zielsequenz-Verdopplung (TSD) des integrierten Elementes und zum anderen der genomische Ort vor der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Integration von Klon #Leu<sup>UAA</sup>14 untersucht. Das als Integrationsziel erkannte Leu<sup>UAA</sup>-tRNA-Gen liegt auf Chromosom 3 an Position 4606291 bis 4606373 (Dictybase DDB0232430). 45 bp unterhalb dieses Gens befindet sich eine externe B-Box. Im Abstand von 99 bp unterhalb der internen B-Box des tRNA-Gens ist ein komplettes TRE3-A-Element in das Genom integriert. Auf der 5'-Seite des tRNA-Gens zeigt das Genomprojekt keine Integration eines Transposons.

Zunächst wurde an der gDNA des Pools #A6OC2 eine PCR mit dem Primer Chr3Leu1 und dem Primer BSR6 durchgeführt. Die gDNA des Pools #A6OC2 diente als Template für den Klon #Leu<sup>UAA</sup>14. Der Primer BSR6 bindet komplementär an die (-)-Strang DNA des Blastidicin-Gens in dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element, der Primer Chr3Leu1 bindet ca. 250 bp unterhalb des Leu<sup>UAA</sup>-Gens auf Chromosom 3. Als Kontrolle wurde diese PCR auch an genomischer AX2-DNA durchgeführt.

Zusätzlich wurde an der AX2-gDNA eine PCR mit dem Primer Chr3Leu1 und dem Leu<sup>UAA</sup>-Gen spezifischen Primer Leu(UAA)rev durchgeführt. In Abbildung 3.2.13 sind die PCR-Produkte auf einem Agarosegel dargestellt. Wie zu erwarten war, ergab die Primerkombination BSR6 und Chr3Leu1 an genomischer AX2-DNA kein PCR-Produkt, während das PCR-Produkt an der DNA des Pools #A6OC2 eine erwartete Größe von ca. 1.200 bp besaß. Die PCR mit den Primern Chr3Leu1 und Leu(UAA)rev an der AX2 gDNA ergab eine erwartete, ca. 300 bp große, PCR-Bande.

Die PCR-Produkte wurden isoliert, in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T ligiert und sequenziert. Die Sequenzen in Abbildung 3.2.13 zeigen, dass das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element in Klon #Leu<sup>UAA</sup>14

einen Poly-A-Anhang von 16 bp besitzt und eine TSD von 13 bp (GTTCGTTTTTTAT) erzeugt hat.



**Abbildung 3.2.13: Untersuchung der Integration des Klon #Leu<sup>UAA</sup>14**

**A)** Schematisch dargestellt ist der Integrationsort des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element in Klon #Leu<sup>UAA</sup>14 **B)** Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung. Die PCR-Produkte mit den Primern BSR6 und Chr3Leu1 an AX2-gDNA (Spur 1) und gDNA des Pools #A6OC2 (Spur 2) wurden auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. In Spur 3 wurde das PCR-Produkt mit den Primern Leu(UAA)rev und Chr3Leu1 an AX2-gDNA aufgetragen. Der Integrationsort auf Chromosom 3 ist **C)** vor der Integration des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes und **D)** nach der Integration dargestellt.

Somit konnte für dieses Element gezeigt werden, dass dieses orthodox in das Genom integriert wurde.

## 4 Diskussion

### 4.1 TRE-Falle

#### 4.1.1 Die TRE-Falle als Integrationsziel für TRE-Elemente

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Val<sup>UAC</sup>-Gen für zwei weitere tRNA-Gene, gezeigt, dass diese ein Integrationsziel für TRE5-A-Elemente darstellen. Damit konnte experimentell untermauert werden, dass wahrscheinlich alle tRNA-Gene ein Integrationsziel für TRE5-A-Elemente darstellen. Dies korreliert mit den Daten aus dem *Dictyostelium*-Genomprojekt, wo oberhalb vieler unterschiedlicher tRNA-Gene TRE-Integrationen gefunden wurden, ohne dass bestimmte tRNA-Gene bevorzugt werden (Winckler 2005a).

Bei den Integrationen in der Umgebung dieser drei tRNA-Gene konnte gezeigt werden, dass die untersuchten TRE5-A-Retrotransposons ausnahmslos oberhalb dieser tRNA-Gene in die TRE-Falle integrierten. In der Regel integrierten diese Retrotransposons in einem Abstand von ca. 50 bp zu den tRNA-Genen. Die 5'-Enden aller integrierten TRE-Retrotransposons zeigten in Richtung des tRNA-Gens. Somit zeigten alle untersuchten Elemente die erwartete Orientierung in Bezug auf das tRNA-Gen. Insbesondere durch das Glu<sup>Sup</sup>-Gen, welches in beiden Orientierungen in die TRE-Falle kloniert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Integrationen der TRE-Elemente unabhängig von den flankierenden Sequenzen der tRNA-Gene sind.

Bei allen untersuchten Integrationen, die einen Abstand von  $48 \pm 2$  bp zu dem Köder-tRNA-Gen besaßen, konnten Zielsequenz-Verdopplungen (TSD), die durch die integrierten Retrotransposons verursacht wurden, nachgewiesen werden. Die untersuchten TSDs besaßen variable Längen von 11-19 bp. Die Integrationen, die einen kürzeren Abstand zu dem Ziel-Gen zeigten, wurden näher untersucht. Dabei konnten Deletionen der Zielsequenz anstelle von Zielsequenz-Verdopplungen festgestellt werden.

Bei vielen Integrationen wurden zwischen der Ziel-DNA und dem 5'-Ende des Retrotransposons bis zu 40 zusätzliche Nukleotide eingefügt. Die meisten integrierten TRE5-A-Elemente waren 5'-verkürzt.

Bei einigen gefundenen Integrationen war die Länge der TSDs, der zusätzlich eingefügten Nukleotide, der Poly-A-Anhänge, sowie die Abstände zu der Köder-DNA nicht exakt zu ermitteln, da einzelne Basen durch Mikrohomologien an den Übergängen zu beiden Seiten



gezählt werden konnten. In diesen Fällen wurden jeweils die möglichen Bereiche angegeben.

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit eine *de novo*-Integration eines TRE3-C-Elementes gefunden werden. Dieses Element zeigte mit dem Abstand und der Orientierung zu dem tRNA-Gen sowie der Länge der erzeugten TSD die gleichen Integrations-Eigenschaften wie die im Genom gefundenen TRE3-C-Elemente. Für TRE3-C-Elemente konnte somit nachgewiesen werden, dass diese in aktuellen *D. discoideum*-Stämmen noch aktiv sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch noch weitere Non-LTR-Retrotransposons (z. B. TRE3-A und TRE5-B) in *D. discoideum* mit einer schwachen Frequenz aktiv sind.

Da die TRE-Falle in einer Kopie stabil in das Genom von *D. discoideum*-Zellen integriert wird, ist davon auszugehen, dass damit authentische Retrotranspositionen, die repräsentativ für das komplette Genom sind, untersucht werden können. Durch Suppressor-tRNA-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die tRNA-Gene, welche sich in der TRE-Falle und somit in dem Intron eines Pol II-Gens befinden ähnlich aktiv sind, wie tRNA-Gene in einer anderen Umgebung.

#### 4.1.2 Integrationen in der Umgebung eines heterologen tRNA-Gens

Mit dem humanen Met<sup>CAU</sup>-Gen wurde ein heterologes tRNA-Gen in der TRE-Falle als Integrationsziel getestet. Dieses Gen wurde von den TRE5-A-Retroelementen orthodox als Integrationsziel erkannt. Die geringe Integrationsfrequenz an dem humanen tRNA-Gen im Vergleich zu den *Dictyostelium*-tRNA-Genen lässt sich dadurch erklären, dass heterologe tRNA-Gene in *D. discoideum* wahrscheinlich nur schlecht transkribiert werden, da die Pol III-Transkriptionsfaktoren möglicherweise schwächer an das heterologe tRNA-Gen binden. Die Fähigkeit von TRE-Elementen vor einem humanen tRNA-Gen zu integrieren, zeigt jedoch, dass diese Elemente keine *Dictyostelium*-spezifischen Sequenzen zur Integration benötigen, sondern lediglich eine in allen tRNA-Genen konservierte DNA-Sequenz. Die einzigen konservierten Bereiche aller tRNA-Gene sind die Promotorregionen.

### 4.1.3 Integrationen in der Umgebung des ribosomalen 5S-Gens

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass mit dem ribosomalen 5S-Gen neben tRNA-Genen auch weitere Gene, die von der Polymerase III transkribiert werden, Integrationsziele für TRE-Retrotransposons darstellen können. Da das r5S-Gen keine Sequenzhomologie zu tRNA-Genen aufweist, konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass TRE-Retrotransposons nicht sequenzspezifisch vor tRNA-Genen, sondern positionspezifisch vor Pol III-Genen integrieren.

Die Transkriptionsfaktoren TFIIIB und TFIIIC sind an einem r5S-Gen ähnlich positioniert, wie an einem tRNA-Gen (Geiduschek 2001). Wenn die Integration von TRE-Elementen über einen oder beide Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, muß bei TRE-Integrationen vor einem r5S-Gen dieselbe Orientierung und ein ähnlicher Abstand wie bei Integrationen vor tRNA-Genen vermutet werden. Dies bestätigen die Daten der vorliegenden Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten TRE-Elemente oberhalb eines r5S-Gens in einem Abstand von ca. 39 bp und in derselben Orientierung, wie vor tRNA-Genen integrieren.

Das r5S-Gen liegt in dem Genom von *D. discoideum* mit anderen ribosomalen Genen in je zwei symmetrischen Kopien auf den ca. 100 Kopien eines extrachromosomalen Palindroms vor. Zusätzlich befindet sich eine Kopie dieses Palindroms auf Chromosom 4. Durch die Genomprojekt-Daten konnten keine TRE-Integrationen vor einem r5S-Gen gefunden werden. Es wurden weder auf einem Palindrom noch auf der Kopie auf Chromosom 4 Integrationen von mobilen Elementen gefunden. Zur Vermehrung dieses Palindroms gibt es verschiedene Theorien. Zum einen könnten die Palindrome von der chromosomalen Masterkopie immer neu gebildet werden (Sucgang 2003). Integrationen auf einem Palindrom könnten so nicht weitergegeben werden. Sobald eine Integration in der Masterkopie stattfindet, könnte dadurch die Neubildung des nun nicht mehr symmetrischen Palindroms gestört werden. Die Zelle könnte dadurch einen Selektionsnachteil gegenüber anderen Zellen besitzen. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich das Palindrom durch Selbst-Priming vermehrt (Eichinger 2005) und Palindrome mit einer Integration durch den hohen Turn-over so stark verdünnt werden, dass sie während der Evolution verloren gehen. Integrationen könnten auch durch die vielen Kopien mittels homologer Rekombination wieder entfernt werden. Es ist auch denkbar, dass sich auf einigen Kopien des Palindroms Integrationen befinden, die im Rahmen des Assemblings der Genomprojektdaten nicht detektiert werden konnten.

#### 4.1.4 Inaktivierte tRNA-Gene

Bei Transkriptions-Untersuchungen mit mutierten tRNA-Genen in verschiedenen Organismen konnte beobachtet werden, dass eine Mutation des Cytosins an Position 56 alle untersuchten tRNA-Gene inaktiviert, während die restlichen Mutationen in der B-Box keine ganz eindeutigen Ergebnisse lieferten (Baker 1986; Gaeta 1990; Kaiser 1995; Nichols 1989).

Da die Transkription von tRNA-Genen in *D. discoideum* weder *in vivo*, noch *in vitro* direkt untersucht werden kann, wurde in dieser Arbeit die TFIIIC-Bindung an dem Val<sup>UAC</sup>-Gen und dem Glu<sup>Sup</sup>-Gen sowie dieser Gene mit mutierten B-Boxen (G53C, C56G und C61A) zum einen *in vitro* mittels Gelshift gemessen. Zum anderen wurde die Aktivität des Glu-Gens und dessen B-Box-Mutanten *in vivo* mittels Suppressor-Aktivitätstest untersucht. Alle drei Mutationen unterdrücken die Suppressor-Aktivität des Glu-Gens komplett. Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob das tRNA-Gen durch die Mutation nicht translatiert, oder nicht richtig prozessiert wird. Die Gelshift-Experimente zeigten bei beiden tRNA-Genen, dass TFIIIC *in vitro* an die tRNA-Gene mit den Mutationen G53C und C61A bindet, aber nicht an die tRNA-Gene mit der Mutation C56G.

An beiden tRNA-Genen, sowie deren drei B-Box-Mutanten, wurden die Integrationsfrequenzen von TRE-Elementen gemessen. Dabei zeigte sich, dass bei den tRNA-Genen mit den Mutationen G53C und C61A die Integrationsfrequenz auf 9-27% reduziert war und dass die tRNA-Gene mit der Mutation C56G kein Integrationsziel für TRE-Elemente darstellten.

Die Daten von beiden tRNA-Genen mit der Mutation C56G deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivität des tRNA-Gens, der TFIIIC-Bindung und der Integrationsfrequenz oberhalb dieser tRNA-Gene hin. Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen diesen drei Versuchen mit den beiden Mutationen G53C und C61A kann nicht erklärt werden. Dies korreliert mit den Daten der anderen Arbeitsgruppen die für verschiedene tRNA-Gene unterschiedlicher Spezies zeigen konnten, dass eine Mutation des Cytosins an Position 56 alle tRNA-Gene inaktivierte, während die meisten anderen Mutationen in der B-Box widersprüchliche Daten lieferten (Baker 1986; Gaeta 1990; Kaiser 1995; Nichols 1989).

Das Val<sup>UAC</sup>(C56G)-Gen wurde für die weiteren Versuche, in denen ein tRNA-Gen mit einer inaktiven B-Box benötigt wurde, gewählt.

### 4.1.5 Externe B-Box

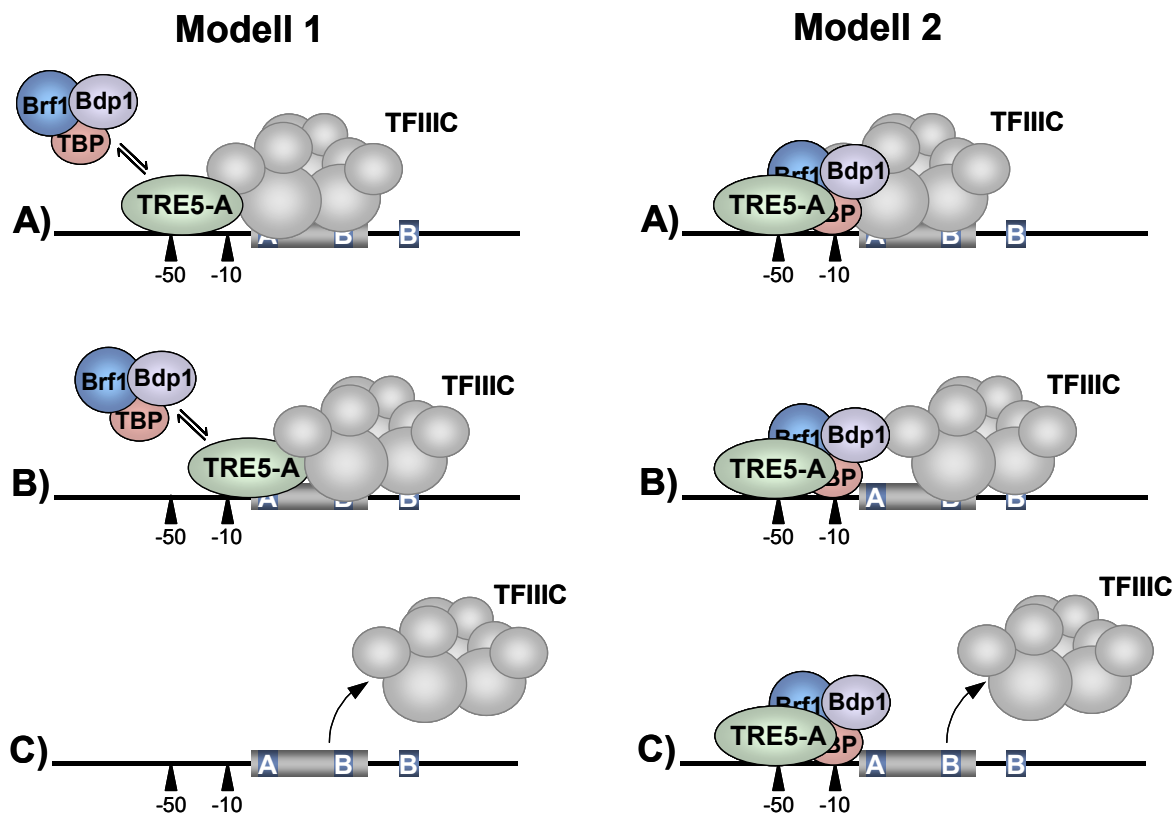
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein tRNA-Gen, welches durch eine mutierte B-Box kein Ziel für TRE-Elemente darstellt, durch eine zusätzliche, externe B-Box wieder ein Ziel für TRE-Elemente darstellen kann. Die Integrationsfrequenz an dem „geheilten“ tRNA-Gen war erheblich geringer, als die Integrationsfrequenz an einem tRNA-Gen mit aktiver B-Box. Damit konnte gezeigt werden, dass die externe B-Box wahrscheinlich die Funktion der internen B-Box zum Teil ersetzen kann.

Wird die Funktion der mutierten, internen B-Box durch eine externe B-Box ersetzt, müssten die TRE-Elemente ca. 100 bp oberhalb der internen B-Box (ca. 50 bp oberhalb des tRNA-Gens) integriert werden. Wird die Funktion der internen B-Box nicht wieder hergestellt und damit das tRNA-Gen von dem TRE5-A-Element, bzw. TFIIIC ignoriert, so wird nur die externe B-Box erkannt. In dem Fall müssten die TRE-Elemente ca. 100 bp oberhalb der externen B-Box (ca. 10 bp oberhalb des tRNA-Gens) integriert werden. Beide Fälle konnten in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die TRE-Integrationen ca. 50 bp vor einem inaktiven tRNA-Gen mit externer B-Box deuten darauf hin, dass eine externe B-Box die Funktion einer inaktiven internen B-Box zu einem Teil ersetzen kann. Um dies genauer belegen zu können, sollten aber sowohl Gelshifts, wie auch Suppressor tRNA-Untersuchungen mit einem solchen tRNA-Gen durchgeführt werden.

Aufgrund der Daten dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die Integration der TRE5-A-Elemente über die Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III vermittelt wird (vgl. 4.8). TFIIIC bindet an die interne B-Box des tRNA-Gens und rekrutiert TFIIIB an die 5'-Seite des tRNA-Gens (Geiduschek 2001). Roberts et al (2003) zeigten in *Saccharomyces cerevisiae*, dass die Polymerase III während der Transkription eines tRNA-Gens TFIIIC von der B-Box trennen kann, während TFIIIB an die DNA gebunden bleibt. Diese kann ohne TFIIIC weitere Transkriptionen des tRNA-Gens einleiten. Hofmann et al. (1991) diskutieren, dass die externe B-Box von *Dictyostelium*-tRNA-Genen als Parkposition für TFIIIC während der Transkription des tRNA-Gens benutzt werden kann. Kassavetis et al. (1989) konnten zeigen, dass TFIIIB ca. 45-50 bp oberhalb von tRNA-Genen an die DNA bindet. Da dies genau der Ort ist, an dem die TRE-Elemente integrieren, liegt die Vermutung nahe, dass die TRE-Integration nicht direkt über TFIIIC, sondern über TFIIIB vermittelt wird. Um darüber eine genauere Aussage treffen zu können, müssen die Untereinheiten von TFIIIB und TFIIIC (soweit bekannt) mittels Two-Hybrid-Analysen auf Interaktionen mit TRE-Proteinen untersucht werden.

Aufgrund dieser Eigenschaften wurden zwei mögliche Modelle erarbeitet wie die Präintegrationskomplexe von TRE5-A ein tRNA-Gen mit einer intakten internen B-Box und einer externen B-Box erkennen können. Diese sind in Abbildung 4.1.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1.1: Modelle zur Zielerkennung der TRE5-A-Proteine**

Dargestellt sind zwei mögliche Modelle, zu der Zielerkennung durch Ribonukleoprotein-Komplexe (RNPs) von TRE5-A-Elementen. **Modell 1 (A-C):** TFIIC interagiert mit den RNPs von TRE5-A. **A)** TFIIC ist an die interne B-Box gebunden. Sowohl TFIIB, wie auch der RNP-Komplex können an derselben Stelle an TFIIC binden. Die Topologie des gesamten Komplexes lässt die Ziel-DNA durch die TRE5-A-Endonuklease an der Position -50 schneiden. **B)** Wenn TFIIC während der Transkription des tRNA-Gens an die externe B-Box bindet, könnte die Endonuklease die Position -10 schneiden. **C)** Nachdem TFIIC nicht mehr gebunden ist, kann kein TRE5-A-Element integrieren. **Modell 2 (A-C):** TFIIB interagiert mit den RNPs von TRE5-A. **A)** TFIIC ist an die interne B-Box gebunden, rekrutiert TFIIB, an den der RNP-Komplex bindet. Die Topologie des gesamten Komplexes lässt die Ziel-DNA durch die TRE5-A-Endonuklease an der Position -50 schneiden. **B)** Wenn TFIIC während der Transkription des tRNA-Gens an die externe B-Box bindet, bleibt TFIIB an der DNA oberhalb des tRNA-Gens gebunden und die Endonuklease kann weiter an Position -50 schneiden. **C)** Nachdem TFIIC nicht mehr gebunden ist, kann TFIIB weiter an die DNA gebunden bleiben. Somit kann der RNP an TFIIB binden und die Integration von TRE5-A weiterhin einleiten.

Das tRNA-Gen ist durch die A- und die B-Box gekennzeichnet. Auf der DNA unterhalb des tRNA-Gens befindet sich eine externe B-Box. Die eingezeichneten Abstände beziehen sich auf das erste Nukleotid des tRNA-Gens. TFIIB besteht in *D. discoideum* aus den drei Untereinheiten TBP, Bdp1 und Brf1. Die Art und Anzahl der Untereinheiten von TFIIC ist nicht bekannt. TFIIC ist schematisch in grau dargestellt. Der RNP-Komplex von TRE5-A-Elementen besteht aus der mRNA, sowie den ORF1- und/oder ORF2-Proteinen von TRE5-A.

In dem ersten Modell bindet der TRE5-A-RNP-Komplex direkt an TFIIC. TFIIB und der TRE5-A-RNP-Komplex binden dort an derselben Stelle und kompetieren um die TFIIC-Bindung. Der RNP-Komplex würde so auf die DNA gesetzt werden, dass die TRE5-A-Endonuklease die DNA ca. 50 bp oberhalb des tRNA-Gens schneiden kann.

Sobald TFIIIC an die externe B-Box bindet, würde die TRE-Integration an der Position -10 stattfinden können. Wenn sich TFIIIC von dem tRNA-Gen komplett löst, kann keine TRE-Integration mehr stattfinden. In dem zweiten Modell bindet der RNP-Komplex an TFIIIB. TFIIIC wird nur benötigt, um TFIIIB an der richtigen Stelle oberhalb des tRNA-Gens auf der DNA zu positionieren. TFIIIB bleibt dort auch gebunden, wenn TFIIIC an die externe B-Box bindet oder das tRNA-Gen komplett verlässt. TFIIIB kann dort die Transkription des tRNA-Gens einleiten. Durch die TFIIIB-Bindung wird der RNP so positioniert, dass die Endonuklease von TRE5-A die DNA an der Position -50 schneiden kann. Somit kann die Retrotransposon mRNA an dieser Stelle integriert werden. Bei diesem zweiten Modell gibt es keine Möglichkeit, dass TRE5-A-Elemente an der Position -10 zu integrieren.

Da im Genom von *D. discoideum* keine orthodoxen TRE5-A-Integrationen an der Position -10 gefunden wurden (Winckler 2002) und für die Ty3-LTR-Retrotransposons gezeigt wurde, dass diese mit TFIIIB interagieren (Yieh 2000), ist anzunehmen, dass die Zielerkennung der TRE5-A-Elemente nach dem zweiten Modell zu funktioniert.

## 4.2 TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente

In der vorliegenden Arbeit konnte das von Moran et al. (1996) entwickelte Testsystem für L1-Retrotransposons auf die TRE-Elemente in *Dictyostelium discoideum* adaptiert werden. Mit diesem neuen Testsystem konnten artifizielle TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente mobilisiert und im Genom wieder gefunden werden. Dabei wurde gezeigt, dass diese Elemente orthodox oberhalb von tRNA-Genen an verschiedenen Stellen in das Genom integrierten. Dieses System eignet sich zur Klärung mehrerer Fragestellungen.

- Mit Hilfe des neu etablierten Testsystems konnte in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass während der Transposition der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente das Intron herausgespleißt wird. Damit wurde erstmals bewiesen, dass die TRE-Elemente, wie bisher vermutet wurde, Retrotransposons sind (vgl. 4.4).
- Es konnte untersucht werden, welche Bereiche der TRE-Elemente für die Retrotransposition notwendig sind. Dabei wurde unter anderem festgestellt, dass das A-Modul nur als Promotor benötigt wird und durch einen anderen Promotor (z. B. den Actin6-Promotor) ersetzt werden kann. Da gezeigt werden konnte, dass mit dem C-Modul das 3'-Ende der TRE-Elemente essentiell für die Retrotransposition ist, konnte die Vermutung untermauert werden, dass die TRE-Elemente über den TPRT-Mechanismus amplifiziert werden.

- Über diese Arbeit hinaus kann mit dem etablierten Testsystem untersucht werden, wie weit das C-Modul verkürzt werden kann, bis es seine Funktion nicht mehr erfüllt. Dadurch könnte evtl. die Funktion der 3'-Enden von Non-LTR-Retrotransposons besser verstanden werden.
- Es konnte gezeigt werden, dass TRE5-A-Elemente weniger aktiv sind, wenn sowohl die RNA von ORF1, als auch die ORF1-Proteine nicht *in cis* vorliegen. Weiterhin kann untersucht werden, ob TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente mit ORF2-RNA und ORF2-Proteinen *in cis* mobiler sind als die bisher untersuchten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente (vgl. 4.4.4).
- Wenn angenommen wird, dass die Zielerkennung der TRE-5A-Elemente durch die Proteine von ORF1 vermittelt wird (Chung 2006), sollte untersucht werden, ob der ORF1 eines TRE5-B-Elementes einem artifiziellen Element dieselbe Zielspezifität gibt. Sobald die Interaktionsdomänen der ORF1-Proteine mit einem Pol III-Transkriptionsfaktor bekannt sind, kann untersucht werden, wie sich Mutationen in diesem Bereich auf die Zielspezifität und die Aktivität des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes auswirken.
- Mit diesem Testsystem kann die Zielspezifität der TRE5-A-Elemente untersucht werden, indem viele mobilisierte Elemente inklusive der flankierenden Sequenzen isoliert und sequenziert werden. Dadurch kann die Frequenz bestimmt werden, mit der tRNA-Gene im Genom „angesprungen“ werden (vgl. 4.5).
- Mit diesem Testsystem können weitere Fragen, z. B. zu über die Expression der TRE-Elemente beantwortet werden, in dem das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element in verschiedenen Knock-Out-Zellen mobilisiert wird. Durch Messung der Retrotranspositionsfrequenz dieses Elementes in den Zellen können schnell Erkenntnisse gewonnen werden, ob die veränderten Gene in diesen Zellen einen Einfluss auf die Aktivität der TRE-Elemente haben. Da in *Dictyostelium discoideum* die meisten Knock-Out Zellen über eine Blastocidin-Resistenz hergestellt werden, mit diesem Testsystem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente aber nur in Blastocidin-sensitiven Zellen untersucht werden können, wäre es dazu sinnvoll, die Blastocidin-Kasstette gegen eine GFP-Expressionskastette auszutauschen. Anschließend würden nicht mehr Blastocidin-resistente Klone gezählt, sondern grün fluoreszierende Zellen. Dies hätte zusätzlich den Vorteil, dass solche Versuche in Echtzeit auswertbar wären und nicht zu einen bestimmten Zeitpunkt (dem Zeitpunkt der Selektion). Eine ähnliche Modifikation des artifiziellen L1-Elementes wurde bereits beschrieben (Ostertag 2000). Folgende *D. discoideum*-Mutanten sind in diesem Zusammenhang interessant:

- Die CbfA-Knock-Down-Zellen JH.D, da bereits bekannt ist, dass CbfA die Retrotranspositionsfrequenz von TRE5-A beeinflusst (Doktorarbeit Beck, diese Daten sollten vorher allerdings verifiziert werden);
- die RNAi-inkompetenten Zellen Helf, RrpA, RrpB und RrpC (Martens 2002; Popova 2006), da es Hinweise darauf gibt, dass TRE5-A-Transkripte in einigen dieser Stämme zunehmen (Daten nicht gezeigt);
- Mutanten wie ku80 und dnapks<sup>-</sup> (Hudson 2005), bei denen die Möglichkeit des Non-Homologous-End-Joining unterbunden wurde, da zelluläre DNA-Reparatursysteme wahrscheinlich an einer erfolgreichen Retrotransposition mitwirken.
- Einer gentherapeutischen Anwendung könnte näher gekommen werden, indem das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element weiter modifiziert wird. Der Promotor könnte gegen einen humanen Promotor ausgetauscht werden und dieses Element zusammen mit einem humanen Expressionsvektor für das ORF2-Protein von TRE5-A in humane Zellen transformiert werden. Es könnte auch versucht werden, Hybride aus dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element und einem humanen L1-Element in humanen Zellen zu mobilisieren. Für andere Non-LTR-Retrotransposons, wie z. B. das murine und das humane L1-Element, konnte bereits gezeigt werden, dass diese auch in heterologen Systemen (z. B. humanen, murinen, Ratten- und CHO-Zellen) aktiv sind (Alisch 2006; Ostertag 2002).
- Ebenso kann untersucht werden, ob und wie sich die Anzahl der A-Module eines TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes bei der Retrotransposition verändert, wie sich Hybride aus TRE5- und TRE3-Elementen verhalten, sowie ob ein B-Modul auch Promotoraktivität besitzt und so der ursprüngliche Promotor der TRE-Elemente sein könnte.

### 4.3 Vergleich der beiden Testsysteme

Mit der TRE-Falle und dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element stehen nun zwei sehr gute Testsysteme zur Verfügung, mit denen Fragen zur Retrotransposition von TRE-Elementen beantwortet werden können. Mit der TRE-Falle können verschiedene und modifizierte Integrationsziele von allen mobilen Elementen in *Dictyostelium discoideum* untersucht werden. Mit dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element steht ein Testsystem zur Verfügung, mit dem ein artifizielles Retrotransposon modifiziert, auf Mobilität getestet und anschließend inklusive der neuen flankierenden Sequenzen aus dem Genom isoliert werden kann. Diese beiden Testsysteme



me ergänzen sich optimal bei der Untersuchung des Retrotranspositions-Mechanismus von TRE5-A-Elementen. Bei allen Vorteilen, die diese beiden Systeme bieten, gibt es auch einige Schwierigkeiten.

So sind z. B. die DH1-Zellen, die für die TRE-Falle benötigt werden, schwieriger zu transformieren und zu kultivieren, als andere *D. discoideum*-Zellen. Um Transpositionsfrequenzen vergleichen zu können, ist es wichtig, dass alle zu vergleichenden Transformanden bis zu der Selektion gleich lange in Kultur waren und eine gleiche Teilungsrate besitzen. Daher ist es notwendig, alle für einen Versuch benötigten Transformanden gleichzeitig und aus den gleichen Zellen herzustellen. Des Weiteren ist es wichtig, darauf zu achten, dass keine Sekundär-Klone entstehen.

Das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Testsystem ist im Gegensatz zu der TRE-Falle einfacher zu Handhaben, da das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element nur in die zu untersuchenden Zellen transformiert werden muß. Der Nachteil, dass mit diesem System nur Blasticidin-sensitive Zellen untersucht werden können, sollte in Zukunft durch ein TRE5-A<sup>GFP</sup>-Element aufgehoben werden, bei dem Zellen, in denen ein Retrotranspositionereignis stattgefunden hat, GFP exprimieren. Zur Zeit bereitet die Isolierung des mobilisierten Elementes vor dem Hintergrund der über 100 genomischen Master-Elemente Schwierigkeiten. Dies könnte aber durch weitere Modifikationen bei der iPCR oder durch ein TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element mit einem zusätzlichen Bakterien-Promotor und einem Origin of replication gelöst werden (vgl. 4.5).

Für eine auswertbare Statistik über alle untersuchten Retrotranspositionereignisse ist es bei beiden Testsystemen notwendig, mehrere Petrischalen von mehreren unabhängigen Klonen jedes Stammes zu untersuchen. Dadurch kommt schnell ein hoher Zeit- und Materialaufwand zustande.

## 4.4 TRE5-A-Integrationen im Vergleich zu L1-Integrationen

Durch Aminosäuresequenz-Homologien wurde vor dieser Arbeit vermutet, dass die TRE5-A-Elemente Retrotransposons sind, die zu der Klasse der L1-Elemente gezählt werden (Feng 1996; Malik 1999).

Nachdem in dieser Arbeit bewiesen werden konnte, dass TRE5-A-Elemente tatsächlich Retrotransposons sind, konnten durch weitere Versuche viele Integrationsmerkmale, die

für die L1-Elemente gezeigt wurden, auch bei der Integration von TRE5-A-Elementen gefunden werden.

Mit Hilfe des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes konnte gezeigt werden, dass bei TRE-Elementen das 3'-Ende für die Mobilisierung essentiell ist. Dadurch wurde die Vermutung unterstützt, dass genau wie die L1-Elemente, auch die TRE5-A-Elemente über den TPRT-Mechanismus amplifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Retrotranspositionsfrequenz ähnlich, wie bei L1-Elementen eingeschränkt ist, wenn die ORF1-Proteine nicht *in cis* vorliegen. Bei den untersuchten TRE-Integrationen wurden 5'-Verkürzungen, Zielsequenz-Verdopplungen und -Deletionen, sowohl templated, als auch untemplated zusätzlich eingefügte Filler-DNA, wie auch einzelne zusätzliche Nukleotide gefunden. Bei vollständigen Integrationen bestanden diese Nukleotide, ähnlich wie bei L1-Integrationen, oftmals aus einem Guanin.

Neben dem Unterschied in der Zielspezifität sind im Vergleich zu L1-Integrationen weder bei den bereits im Genom vorhandenen TRE5-A-Elementen, noch bei den *de novo* TRE5-A-Integrationen Inversionen der 5'-Enden beobachtet worden. Diese treten bei ca. 12-16% aller L1-Integrationen auf (Symer 2002). Während für das L1-Element gezeigt wurde, dass sowohl ORF1, wie auch ORF2 *in cis* essentiell für die Mobilität sind (Alisch 2006; Wei 2001), besitzen die TRE5-A-Elemente wahrscheinlich nur eine *cis*-Präferenz für ihre beiden ORFs.

Auf die einzelnen Integrationsmerkmale wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

#### 4.4.1 Mikrohomologien und Zielsequenz-Deletionen

In dieser Arbeit wurden fünf TRE5-A-Integrationen in der Umgebung des humanen Met<sup>CAU</sup>-Gens, neun TRE5-A-Integrationen in der Umgebung des *D. discoideum* Glu<sup>Sup</sup>-Gens, sieben Integrationen in der Umgebung von r5S-Genen, drei Integrationen in der Umgebung einer isolierten B-Box und zwei Integrationen in der Umgebung des Val<sup>UAC</sup>-Gens mit einer inaktivierten internen B-Box und einer zusätzlichen externen B-Box in der TRE-Falle untersucht. Zusätzlich wurden acht Integrationen von TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementen untersucht. Von den insgesamt 34 untersuchten TRE5-A-Integrationen waren 27 mit einem vollständigen Pol III-Gen assoziiert. Von diesen 27 TRE5-A-Integrationen zeigten fünf Integrationen in der TRE-Falle und ein TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element einen kürzeren Ab-

stand zu dem Integrationsziel als erwartet. Dieser kürzere Abstand könnte durch Zielsequenz-Deletionen, die auch bei anderen Non-LTR-Retrotransposons beobachtet wurden (Gilbert 2002; 2005; Symer 2002), erklärt werden. Vier der fünf Integrationen in der TRE-Falle wurden auf Zielsequenz-Deletionen überprüft. Bei dem Klon #Uigi2C wurde eine Deletion auf der 5'-Seite des integrierten TRE-Elementes von 6-8 bp (TTTTCA(AA)) und bei dem Klon #Uigi6A wurde eine Deletion von 5-7 bp (AAATT(AA)) beobachtet. Bei den Klonen #Ui5S2x5B und #Ui5S2x3-31 wurden Deletionen von 469-471 bp bzw. 297-303 bp gefunden. Diese beiden Deletionen waren so groß, dass die Integrationsziele (r5S-Gen) auch deletiert wurden. Alle gefundenen Deletionen endeten an ihrem 3'-Ende mit mehreren Adeninen. Daher konnte nicht entschieden werden, ob diese Basen auch deletiert und durch die Poly-A-Anhänge der integrierten TRE-Elemente neu erzeugt wurden.

TRE-Elemente erzeugen normalerweise an den Integrationsorten Zielsequenz-Verdopplungen von ca. 11-19 bp. Da diese Bereiche bei den untersuchten Klonen fehlen, müssten sie eigentlich zu der Länge der Deletion addiert werden.

Bei drei der vier untersuchten Klone konnten zwischen dem 5'-Ende des integrierten TRE-Elementes und der genomischen Ziel-DNA Mikrohomologien von 2-6 bp beobachtet werden (#Uigi6A: AA; #Ui5S2x5B: CAA; #Ui5S2x3-31: AATCAA). Bei Klon #Uigi2C konnte keine Mikrohomologie gefunden werden.

Die Integration des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes in Klon #Leu<sup>UAA</sup>6, die einen Abstand von 28 bp zu dem tRNA-Gen besaß, wurde nicht auf eine Zielsequenz-Deletion untersucht. Bei dieser Integration konnte aber eine Mikrohomologie zwischen dem Integrationsort und dem 5'-Ende des integrierten Elementes von 1 bp (A) beobachtet werden. Um diese Integration auf Chromosom 6 auf eine vorhandene Zielsequenz-Deletion untersuchen zu können, müsste ähnlich wie für Klon #Leu<sup>UAA</sup>14 (vgl. 3.2.3) vorgegangen werden.

In einer vorausgegangenen Arbeit wurden 23 TRE5-A-Integrationen in Umgebung des Val<sup>UAC</sup>-Gens untersucht. Drei dieser Integrationen wiesen mit 27-43 bp einen kürzeren Abstand zu dem tRNA-Gen auf, als erwartet wurde (Beck 2002). Diese Integrationen wurden damals nicht auf Zielsequenzdeletionen untersucht. Es konnten im nachhinein aber bei allen drei Klonen Mikrohomologien von 1-3 bp am Integrationsort festgestellt werden (#49: T; #66: T; #86: CTA).

Somit wurden insgesamt bei sieben von acht Integrationen, bei denen eine Zielsequenz-Deletion vermutet oder nachgewiesen wurde, Mikrohomologien von 1 bp bis 6 bp gefunden.

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass Mikrohomologien bei der Integration von Non-LTR-Retrotransposons eine entscheidende Rolle spielen. Ostertag und Kazazian (2001b) konnten zeigen, dass Mikrohomologien von 1 bp bis 4 bp für das Twin Priming

und somit für die Inversion der 5'-Enden integrierter L1-Elemente verantwortlich sind. Zingler et al. (2005), Symer et al. (2002) und Martin et al. (2005) konnten zeigen, dass Mikrohomologien von 1 bp bis 12 bp zwischen dem 3'-Ende der TSD und der Transposon-cDNA für die 5'-Verkürzung von L1-Elementen verantwortlich sind. Martin et al. diskutierten, dass diese Mikrohomologien nicht perfekt sein müssen, sondern auch Fehler beinhalten dürfen. Symer et al. (2002) und Gilbert et al. (2002; 2005) zeigten, dass die Verknüpfung der 5'-Enden von L1-Elementen mit der Zielsequenz oftmals durch Mikrohomologien von 1 bp bis 3 bp vermittelt wird.

Sowohl Symer et al. als auch Gilbert et al. teilen sowohl die TSDs, wie auch die Zielsequenz-Deletionen jeweils in kurze und lange ein. Sie postulieren ähnliche Mechanismen, wie die kurzen Zielsequenz-Deletionen und -Verdopplungen entstehen können. Der zweite Schnitt in der Ziel-DNA durch die Retrotransposon-Endonuklease (der zumindest bei L1 nicht so spezifisch ist, wie der Erste (Christensen 2005; Gilbert 2002)), und normalerweise wenige bp rechts von dem ersten Schnitt stattfindet, kann demnach auch links von dem ersten Schnitt stattfinden. Liegt der zweite Schnitt wenige Basenpaare rechts von dem Ersten, entsteht eine kurze Zielsequenz-Verdopplung, liegt er einige bp links von dem ersten Schnitt, entsteht eine kurze Zielsequenz-Deletionen. Der zweite Schnitt kann in einigen Fällen aber auch bis zu mehreren kb von dem ersten Schnitt entfernt liegen, in diesen Fällen bildet die Transposon-cDNA einen R-Loop und es entstehen große Zielsequenz-Deletionen bzw. -Verdopplungen. Symer et al. diskutieren, dass der Ort des zweiten Schnittes z. B. durch Mikrohomologien der Transposon-cDNA mit der Ziel-DNA festgelegt werden kann. Christensen et al. (2005) postulieren, dass die Endonuklease von L1-Elementen aus zwei Untereinheiten besteht. Die erste Untereinheit bindet demnach an die Ziel-DNA und erzeugt dort einen Schnitt in dem unteren DNA-Strang. Die zweite Untereinheit, die in der Regel rechts der ersten bindet, erzeugt den Schnitt in dem oberen DNA-Strang.

Han et al. (2005) untersuchten Deletionen in der Zielsequenz, die durch Integrationen von L1-Elementen verursacht wurden, indem sie die natürlichen L1-Integrationen im humanen Genom und dem Chimpanzen-Genom verglichen. Sie erklären, dass Zielsequenz-Deletionen durch einen vorausgegangenen DNA-Doppelstrangbruch mit einem 3'-Überhang erzeugt werden. Dieser 3'-Überhang soll über Mikrohomologien mit der Transposon-cDNA hybridisieren.

Wenn die Zielsequenz-Deletionen bei der Integration von Retroelementen nach diesem Schema ablaufen würden, müssten sich bei den in dieser Arbeit gefundenen Zielsequenz-Deletionen zufällige Doppelstrangbrüche mit 3'-Überhängen oberhalb der untersuchten Integrationsstellen (z. B. in der TRE-Falle) vorgelegen haben, die durch die TRE-Elemente repariert wurden. Sollten im Genom so viele Doppelstrangbrüche vorlie-

gen, würde dies für ein äusserst instabiles Genom sprechen. Daher scheint die Erklärung für die Entstehung von Zielsequenz-Deletionen, die Symer et al. und Gilbert et al. vorschlagen, plausibler zu sein.

Chen et al. (2005) fassen in einem Review alle bisher veröffentlichten L1-abhängigen Integrationen zusammen und ermitteln, dass bei ca. 10% aller L1-Integrationen Deletionen in der Zielsequenz entstehen. Die Frequenzen in den einzelnen Arbeiten schwankten stark zwischen 1% und 50%. Einheitlich bei allen bisher gefundenen Integrationen, die Zielsequenz-Deletionen erzeugen ist eine 5'-Verkürzung der Retrotransposons.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei fünf von 34 Integrationen (~15%) Deletionen der Zielsequenz bei Integrationen von TRE5-A-Retrotransposons beobachtet. Alle fünf integrierten TRE-Elemente waren ebenfalls 5'-verkürzt. Daher ist davon auszugehen, dass sich TRE5-A-Retrotransposons in diesem Punkt ähnlich verhalten, wie L1-Elemente.

Deletionen der Zielsequenz, die durch Integrationen entstehen, sind auch bei weiteren Retroelementen in anderen Organismen gefunden worden. So diskutieren z. B. Ye et al. (2005), dass die sequenzspezifisch integrierenden R1-Elemente in *D. melanogaster* Zielsequenz-Deletionen von 23 bp verursachen können, während sie normalerweise TSDs von 14 bp bei ihrer Integration erzeugen. Da aber sowohl die natürlichen Zielsequenz-Verdopplungen, wie auch die beobachteten Deletionen immer die gleiche Länge besitzen, ist fraglich, ob dies über denselben Mechanismus, wie bei L1- und TRE-Elementen geschieht.

#### 4.4.2 Extra Nukleotide

Bei zwölf von den 34 in dieser Arbeit untersuchten Integrationen und bei acht der 22 untersuchten Integrationen in der Umgebung des Val<sup>UAC</sup>-Gens aus der vorausgegangenen Arbeit (Beck 2002) wurde ein zusätzliches Guanin am 5'-Ende des integrierten Transposons in die DNA integriert. Alle integrierten TRE-Elemente, bei denen ein zusätzliches Guanin am 5'-Ende integriert wurde, waren vollständig oder begannen in einem Bereich von 25 bp um ihren vermuteten Transkriptionsstart (+1 oder +200 im A-Modul, bzw. ca. 40 bp oberhalb des 3'-Endes des Actin6-Promotors). 17 dieser 20 Retrotransposons begannen innerhalb der ersten sechs Basen des theoretischen Transkriptionsstartes. Gilbert et al. (2005) haben bei Integrationen von L1-Elementen ähnliches gefunden und diskutierten, dass diese Guanine durch weiterlaufen der Reversen Transkriptase (RT) in das 7-Methyl Guanosin-Cap der Retrotransposon-RNA entstehen können.

Bei mehreren Integrationen wurden entweder zusätzlich zu dem Guanin oder ohne das Guanin weitere so genannte Filler-Nukleotide am 5'-Ende des TRE-Elementes integriert. In einem Fall (#UiB-Box4-3) konnte gezeigt werden, dass in den 36 bp Filler-Nukleotiden 25 bp aus einem Bereich ca. 120 bp unterhalb der Integrationsstelle kopiert wurden.

In den untersuchten Stämmen, in denen das tRNA-Gen in der TRE-Falle die umgekehrte Orientierung des UMPS-Gens hatte, wurden die TRE5-A-Retrotransposons in einen 15 bp langen homopolymeren Thymidin-Stretch integriert. Bei allen drei tRNA-Genen sind Integrationen beobachtet worden, bei denen dieser T-Stretch durch die Integration eines TRE5-A-Elementes verlängert wurde. In Klon #UiB-Box1-5 wurde ein TRE5-A-Element in einen homopolymeren Adenin-Stretch integriert. Dieser A-Stretch wurde durch die Integration ebenfalls verlängert. Ob dieses Phänomen durch die homopolymeren Zielregionen entsteht, oder ob TRE-Elemente auch bei nicht homopolymeren Zielbereichen gleiche Nukleotide als Filler-DNA einbauen, kann ebenso noch untersucht werden, wie die Möglichkeit, ob auch Cytosin-, oder Guanin-Stretche verlängert oder erzeugt werden.

#### 4.4.3 Unterschiede zwischen ursprünglichen und *de novo*-Integrationen

In mehreren Arbeiten (Gilbert 2002; Han 2005; Symer 2002) wurde festgestellt, dass sich sowohl die Länge der Poly-A-Anhänge, wie auch die durchschnittliche Länge der TSDs mit dem Alter von integrierten Retrotransposons verkürzen. Demnach verkürzen sich die Poly-A-Anhänge wahrscheinlich durch ein Überspringen (slippage) einzelner Nukleotide in homopolymeren Stretchen durch die Polymerase bei der Zellteilung. Integrationen mit langen Zielsequenz-Verdopplungen werden hingegen durch homologe Rekombination häufig aus dem Genom entfernt. Um überprüfen zu können, ob dies bei TRE-Elementen ebenfalls der Fall ist, wurden die Längen der TSDs und der Poly-A-Anhänge aller auf Chromosom 2 integrierten TRE5-A-Elemente untersucht und mit denen der neu integrierten Elemente aus dieser und der vorausgegangenen Arbeit verglichen. Die TSDs aller auf Chromosom 2 gefundenen TRE5-A-Elemente besaßen eine Länge von 11-14 bp ( $\bar{\varnothing}$ =13,1 bp, n=14) während die TSDs der *de novo*-Integrationen Längen von 12-20 bp ( $\bar{\varnothing}$ =15,9 bp, n=17) besaßen. Die Poly-A-Anhänge der TRE5-A-Elemente auf Chromosom 2 waren 9-24 bp lang ( $\bar{\varnothing}$ =13,6 bp, n=14), während die Poly-A-Anhänge der *de novo*-Integrationen mit 11-27 bp durchschnittlich ebenfalls 13,6 bp lang waren (n=17). Während bei den Längen der Poly-A-Anhänge kein Unterschied festzustellen war, waren die TSDs der *de novo*-Integrationen länger als die TSDs der älteren, chromosomalen

Integrationen. Um genauere Aussagen treffen zu können ob die durchschnittlichen Längen der TSDs und Poly-A-Anhänge mit dem Alter von Integrationen verkürzen, müssen alle chromosomalen Integrationen und erheblich mehr *de novo*-Integrationen untersucht werden.

#### 4.4.4 *cis* und *trans* Präferenzen

Es wurden Versuche mit dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element durchgeführt, bei denen in den ORF1 des Elementes ein Stopp-Codon eingefügt wurde, bzw. der ORF1 komplett entfernt wurde. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von TRE-Elementen sowohl, beim Fehlen der ORF1-mRNA, wie auch der ORF1-Proteine *in cis* jeweils etwa um den Faktor 10 gemindert wird. In Versuchen, bei denen mehr ORF1-Protein *in trans* in den Zellen vorlag, konnte keine Steigerung der Aktivität der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente beobachtet werden. Die aktiven TRE5-A.2-Elemente, wie auch das TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element, besitzen keinen ORF2. Sie müssen die ORF2-Proteine *in trans* rekrutieren. Daher kann auch der ORF2 *in cis* nicht essentiell für die Mobilität der TRE-Elemente sein. Ob trotzdem eine *cis*-Präferenz für ORF2 vorliegt und ein TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element mit einem ORF2 *in cis* mobiler ist, als die untersuchten TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente, kann weiterhin untersucht werden. Northernblot-Experimente zeigten, dass mindestens 10-mal Transkripte von TRE5-A.2 Elementen, als von TRE5-A.1-Elementen in *D. discoideum*-Zellen vorliegen (Daten nicht gezeigt). Da aber ähnlich viele *de novo*-Integrationen in der TRE-Falle von beiden Elementen gefunden wurden, könnte dies ein Hinweis für eine *cis*-Präferenz von ORF2 sein. Im Gegensatz zu den TRE-Elementen erhöht die Anwesenheit von ORF1 und ORF2 *in cis* nicht nur die Aktivität, sondern ist für die Mobilisierung essentiell (Alisch 2006; Wei 2001)

### 4.5 Ungerichtete Integrationen

Mit der TRE-Falle können nur Integrationen, die sich in der Falle zwischen den beiden Primern UMP20 und UMP21 befinden (~1.400 bp), untersucht werden. Da die Integrationen der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente mittels spezifischer tRNA-Gen Primer untersucht wurden, kann mit beiden Systemen nicht ausgeschlossen werden, dass TRE-Elemente unspezifisch integrieren können. In dieser Arbeit konnte nur gezeigt werden, dass diese Elemente

spezifisch ihr Ziel erkennen. Um festzustellen, wie viele TRE-Elemente an einer „falschen“ Stelle in das Genom integrieren, müssen die flankierenden Sequenzen vieler TRE5-A<sup>BSR</sup>-Integrationen tRNA-Gen-unabhängig untersucht werden. Da sich dies in dieser Arbeit mittels iPCR als sehr schwierig (bzw. nicht möglich) herausgestellt hat, gibt es mehrere Möglichkeiten zur Modifizierung des Testsystems. Zum einen kann die iPCR weiter modifiziert werden. Eine wahrscheinlich erfolversprechendere Methode bietet eine Weiterentwicklung des Testsystems von Moran et al. (1996) für artifizielle L1-Elemente. Dabei wird in die Kassetten mit dem Resistenzgen und dem Intron ein kurzer Bakterien-Promotor direkt vor das Resistenzgen und ein Origin of replication eingebracht (Gilbert 2002; Symer 2002). Durch das herausgespleißte Intron kann zuerst auf Zellen selektioniert werden, in denen ein Retrotranspositionereignis des artifiziellen Elementes stattgefunden hat. Von diesen Zellen wird genomische DNA isoliert, diese mit Restriktionsenzymen geschnitten und religiert. Je nach Auswahl des Restriktionsenzymes entstehen so Plasmide mit einem Origin of replication, der Resistenzkassette und dem transponierten Element inklusive der neuen flankierenden Sequenzen. Diese können schnell in Bakterien vermehrt und untersucht werden. Entscheidend bei dieser Weiterentwicklung ist, dass ein sehr kurzer Bakterien-Promotor verwendet wird, der zwischen dem eigentlichen Promotor und dem Resistenzgen platziert wird und der die Expression des Resistenz-Gens in den eukaryotischen Zellen nicht behindert.

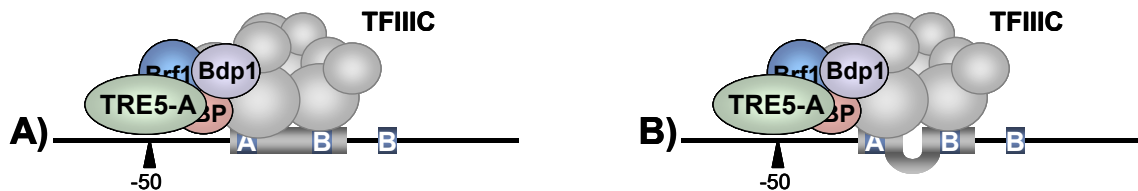
Da in der vorliegenden Arbeit viele TRE5-A-Integrationen in der TRE-Falle und des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes untersucht wurden, von denen sich ausnahmslos alle in der richtigen Orientierung und dem erwarteten Abstand vor der Zielsequenz befanden, wird die Frequenz, mit der TRE5-A-Elemente ungerichtet in das Genom integrieren, als sehr gering eingestuft. Wenn die Zielspezifität der TRE5-A-Elemente in Zukunft für eine humane Gentherapie genutzt werden sollte, ist es wichtig, dass weitere Versuche genau zeigen, wie gering die Frequenz einer ungerichteten Integration bei TRE5-A-Elementen ist.

## 4.6 Abstände zwischen der A- und B-Box

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Integrationen von TRE-Elementen über die Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III vermittelt werden. TFIIC bindet dabei mit den beiden flexiblen Bindedomänen  $\tau_B$  und  $\tau_A$  sowohl an die A-Box, wie auch an die B-Box der tRNA-Gene (Geiduschek 2001). Bei den verschiedenen *Dictyosteli-*



*um*-tRNA-Genen beträgt der Abstand der beiden Promotorregionen zwischen 40 bp und 65 bp. Abstände zwischen 30 bp und 60 bp entsprechen der optimalen Länge für die Pol III-Transkription. Durch Ausloopen, Biegen und Entwinden der DNA kann TFIIC sowohl an die A-Box, wie auch die B-Box binden (Baker 1987).



**Abbildung 4.6.1: TFIIC-Bindung an unterschiedlich langen tRNA-Genen**

Schematisch dargestellt ist die Bindung von TFIIC an **A)** einem kurzen und **B)** einem langen tRNA-Gen. Es besteht die Möglichkeit, dass die DNA bei langen tRNA-Genen zwischen der A- und der B-Box gebogen, entwunden und teilweise auch ausgeloopt sein kann.

Die Untersuchungen der *de novo*-Integrationen haben gezeigt, dass der Integrationsabstand zu der A-Box  $55 \pm 2$  bp beträgt, während der Abstand zu der B-Box je nach tRNA-Gen zwischen 98 bp und 111 bp variierte. Dies korreliert mit den natürlich im Genom integrierten TRE5-A-Elementen. Wie erwartet ist daher davon auszugehen, dass der Integrationsort von ca. 50 bp oberhalb des tRNA-Gens durch die Lage der A-Box bestimmt wird. Dies ist in Abbildung 4.6.1 schematisch dargestellt.

## 4.7 Integrationen an isolierten B-Boxen

Der Abstand der TRE5-A-Integrationen oberhalb einer isolierten B-Box in der TRE-Falle lag bei ca. 100-110 bp. Der Integrationsabstand der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente zu der isolierten B-Box auf dem Palindrom lag zwischen 114 bp und 127 bp. Dieser stark variierende Abstand lässt sich durch das Fehlen der A-Box erklären, die wahrscheinlich den genauen Integrationsabstand der TRE-Elemente zu den tRNA-Genen bestimmt (vgl. 4.6).

Die isolierte B-Box auf dem Palindrom ist erst durch die Integrationen der TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elemente gefunden worden. Aufgrund der gefundenen Integrationen, ist davon auszugehen, dass TFIIC an diese B-Box bindet.

In dieser Arbeit sind jeweils vier chromosomale TRE5-A<sup>BSR</sup>-Integrationen oberhalb von tRNA-Genen und vier Integrationen oberhalb der B-Box auf dem Palindrom gefunden worden. Diese B-Box besitzt eine perfekte Homologie zu den internen B-Boxen von *D discoideum*-tRNA-Genen, außerhalb dieser B-Box ist jedoch keine Homologie zu einem tRNA-Gen zu erkennen. Wenn diese B-Box keine Funktion hätte, wäre ihre Struktur im Laufe der Evolution wahrscheinlich nicht erhalten geblieben. Ob diese B-Box eventuell

eine Rolle bei der Replikation des Palindroms spielt oder welche andere Funktion sie haben könnte, ist nicht bekannt.

Auffällig ist jedoch, dass vier Integrationen an der isolierten B-Box auf dem Palindrom, jedoch keine Integration in der Umgebung des r5S-Gens auf dem Palindrom gefunden wurde. Ob dies mit der geringen Anzahl von acht untersuchten Integrationen zusammen hängt, oder ob dies ein Hinweis auf eine sehr starke TFIIIC-Bindung an dieser B-Box auf dem Palindrom ist, muß durch weitere Versuche geklärt werden.

Die Integrationen auf dem Palindrom zeigen, dass TRE-Elemente dort integrieren können. Während Integrationen dort natürlicherweise eventuell einen Selektionsnachteil für die Zelle darstellen können, wurde in diesen Versuchen auf Zellen mit einem Retrotranspositionereignis selektioniert. Daher geben diese Integrationen keinen Aufschluss darüber, ob TRE-Elemente natürlicherweise durch homologe Rekombinationen wieder von den Palindromen entfernt werden, oder ob solche Palindrome durch stetige Neubildung von Palindrome ohne Integrationen so stark verdünnt werden, dass sie verloren gehen (vgl. 4.1.3).

## 4.8 TRE-Integrationen benötigen TFIIIC

Zum einen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl das Val<sup>UAC</sup>-Gen, wie auch das Glu<sup>Sup</sup>-Gen keine Integrationsziele für TRE-Elemente darstellen, wenn ihre B-Boxen so mutiert wurden, dass TFIIIC nicht mehr an diese tRNA-Gene bindet. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass eine isolierte B-Box, bei der vermutet wird, dass TFIIIC an diese bindet, ein orthodoxes Integrationsziel für TRE-Elemente darstellt.

Die Möglichkeit, dass die TRE-Elemente die Sequenz der B-Box direkt erkennen, kann durch zwei erhaltene Erkenntnisse ausgeschlossen werden. Zum einen wurde auch das r5S-Gen, welches keine Sequenzhomologie zu tRNA-Genen oder der B-Box besitzt, als orthodoxes Integrationsziel erkannt. Zum anderen liegt die B-Box ca. 100 bp von der Integrationsstelle entfernt. Da für die Retrotransposition der TPRT-Mechanismus angenommen wird, wird der Integrationsort durch den Ort bestimmt, an dem die Endonuklease die Ziel-DNA schneidet. Es gibt Retrotransposon-Endonukleasen, welche die DNA bis zu 40 bp unterhalb ihrer Bindedomäne schneiden (Christensen 2005; Wah 1997; Yang 1999). Die Endonuklease der TRE5-A-Elemente gehört aber zu den apurinisch/apyrimidinischen Endonukleasen (APE). Diese Endonukleasen schneiden die DNA direkt an ihrer Bindestelle (Christensen 2005; Cost 1998). Daher ist auszuschließen, dass eine Mutation einer einzelnen Base in einem Abstand von ca. 100 bp zur Integrationsstelle Auswirkungen auf die Integrationen hätte.

## 4.9 Transposons in der Gentherapie

Ein Problem in der Gentherapie ist, dass die meisten Transfersysteme die therapeutischen Gene nicht stabil in das Genom des Empfängers integrieren und diese Gene somit nicht auf Dauer exprimiert werden können. Da Transposons ihre DNA stabil in das Genom integrieren, gibt es verschiedene Überlegungen, Transposons für die Gentherapie zu nutzen (Carlson 2005; Soifer 2004). Während Carlson et al. ein therapeutisches Gen durch die ITRs und die Transposase des DNA-Transposons „Sleeping Beauty“ mobilisieren, haben Soifer et al. einen Hybridvektor mit einem Adenovirus und einem L1-Element hergestellt (vgl. 1.6). Das Adenovirus bringt das L1-Element in die Zelle. Das L1-Element, welches zusätzlich für das therapeutische Gen kodiert, kann von dort aus in das Genom der Wirtszelle integrieren. Ein großes Problem dabei ist weiterhin die unspezifische Integration der L1-Elemente. Soifer et al. publizierten, dass die Zielsequenz für L1-Elemente (5'-TTTT/AA-3') öfter in nicht kodierenden Bereichen, als in kodierenden Bereichen vorkommt. Da aber gezeigt wurde, dass mehrere L1-Integrationen für menschliche Krankheiten verantwortlich sind (Chen 2005), ist dies keine Zielspezifität, die für eine Integration in unkritische DNA-Bereiche ausreichend ist.

Könnten Hybride aus L1- und TRE5-A-Elementen hergestellt werden, die in humanen Zellen oberhalb von Pol III-Genen in sichere Bereiche des Genoms integrieren, dann könnte mit solchen Elementen eine Gentherapie sicherer durchgeführt werden. Soifer et al gehen weder auf die Problematik, dass Adenoviren eine starke Immunabwehr im Körper auslösen können, noch auf die Problematik dass Non-LTR-Retrotransposons bei der Integration oft 5'-verkürzt werden näher ein. Sie sehen eher eine zusätzliche Sicherheit der integrierten Elemente durch die 5'-Verkürzung, da so oftmals die Promotoren während der Transposition verloren gehen und die meisten neu integrierten Retrotransposons so nicht mehr mobil sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TRE-Elemente auch mit einem nicht-internen Promotor (Actin6-Promotor) mobil sind. Würde ein solcher Promotor verwendet, könnten nur integrierte Kopien mobil sein, die hinter einem starken Pol II-Promotor in das Genom integriert wurden. Dies kann oberhalb von Pol III-Genen praktisch ausgeschlossen werden. Da aber die weitaus meisten Integrationen sowohl von L1- wie auch von TRE-Elementen 5'-verkürzt sind (Gilbert 2002; Symer 2002 und Daten aus dieser Arbeit), stellt dies ein größeres Problem dar.

## 4.10 Ausblick

Aufbauend auf die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bieten sich weitere Untersuchungen an.

- Die wichtigste Fragestellung, welche TRE5-A-Proteine mit welchen Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III interagieren, wird zur Zeit im Rahmen einer weiteren Promotion untersucht.
- Da bisher bereits drei unabhängige tRNA-Gene als Integrationsziele in der TRE-Falle mit sehr ähnlichen Ergebnissen untersucht wurden und weiterhin gezeigt wurde, dass auch eine isolierte B-Box ein Integrationsziel darstellt, scheinen weitere Experimente in diesem Kontext nicht notwendig zu sein.
- Nachdem durch die vorhandene Genomsequenz von *D. discoideum* auch die Konsensussequenz der A-Box in dieser Arbeit erstellt wurde, können nun analog zu den bereits untersuchten B-Box-Mutanten auch A-Box-Mutanten von tRNA-Genen hergestellt und untersucht werden.
- Durch Gelshift-Versuche sollte nachgewiesen werden, dass TFIIIC tatsächlich an eine isolierte B-Box binden kann.
- Es sollte mittels Gelshift und Suppressor-tRNA-Aktivitätsmessung genauer untersucht werden, wie eine externe B-Box eine inaktive, interne B-Box ersetzen kann.
- Es kann überprüft werden, ob TFIIIC an eine isolierte A-Box bindet und ob diese dann auch ein Ziel für TRE-Elemente darstellt. Da die C56G-mutierten tRNA-Gene, die eine intakte A-Box besitzen, aber weder TFIIIC-Bindung zeigen, noch ein Integrationsziel für TRE-Elemente darstellen, scheint dies eher unwahrscheinlich.
- Es sollte bei den Integrationen, bei denen Zielsequenz-Deletionen nur vermutet wurden, diese durch Sequenzierungen nachgewiesen werden. Des Weiteren können alle natürlichen Integrationen, die näher als erwartet vor einem tRNA-Gen integriert sind, auf vorhandene Zielsequenz-Verdopplungen untersucht werden, um dadurch einen weiteren Hinweis auf die Anzahl von Zielsequenz-Deletionen bei natürlich integrierten TRE-Elementen zu erhalten.

Die weiteren Möglichkeiten bezüglich des TRE5-A<sup>BSR</sup>-Elementes sind in Kapitel 4.2 ausführlich beschrieben.

## 5 Zusammenfassung

TRE5-A-Elemente sind Non-LTR-Retrotransposons aus dem zellulären Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, die zur Klasse der L1-Retrotransposons gehören. Die Besonderheit der TRE-Elemente liegt darin, dass sie orientierungsspezifisch ca. 50 bp oberhalb von tRNA-Genen in das Genom integrieren. Die Daten in dieser Arbeit zur Untersuchung des spezifischen Transpositions-Mechanismus basieren im Wesentlichen auf zwei Testsystemen. Zum einen wurde mit der TRE-Falle auf ein bereits bestehendes Testsystem zurückgegriffen, welches speziell darauf abzielt, die Integration von natürlicherweise aktiven TREs an einem definierten Ort zu untersuchen. Zum anderen wurde mit dem TRE5-A<sup>BSR</sup>-Element ein neues Testsystem zur Untersuchung von mobilen Elementen in *D. discoideum*-Zellen etabliert. Mit Hilfe dieses Testsystems konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal das ca. 15 Jahre alte, lediglich auf Proteinhomologien basierende Postulat, dass TRE5-A-Elemente Retrotransposons sind, experimentell bewiesen werden.

Es konnten mehrere typische Integrationsmerkmale, die bei dem gut untersuchten humanen L1-Element gefunden wurden, auch bei TRE5-A-Integrationen nachgewiesen werden. Zu diesen Eigenschaften zählen unter anderem häufige 5'-Verkürzungen der Elemente, variable Zielsequenz-Verdopplungen, durch Mikrohomologien verursachte Zielsequenz-Deletionen, zusätzlich eingefügte Nukleotide und *cis*-Präferenzen sowohl für das Vorhandensein der ORF1-mRNA, wie auch der ORF1-Proteine. Des Weiteren konnte die Vermutung erhärtet werden, dass die TRE5-A-Elemente ebenso wie die L1-Elemente durch den TPRT-Mechanismus amplifiziert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die 5'-UTR der TRE5-A-Elemente nur als interner Promotor benötigt wird und durch einen anderen Promotor ersetzt werden kann.

In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die spezifische Integration dieser Elemente oberhalb von tRNA-Genen nicht über eine sequenzspezifische Erkennung der DNA, sondern über Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III vermittelt wird. Der genaue Integrationsort wird dabei durch die Lage der A-Box innerhalb des tRNA-Gens bestimmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit einem humanen tRNA-Gen auch heterologe tRNA-Gene ein Integrationsziel für TRE5-A-Elemente darstellen können.

In dieser Arbeit konnten somit Grundlagen gelegt werden, mit deren Hilfe versucht werden kann, ein TRE5-A-Element so zu modifizieren, dass es in humanen Zellen gerichtet in sichere Bereiche oberhalb von tRNA-Genen integriert. Ein solches Element könnte einen wertvollen Beitrag zur Konzeption neuer Gentherapie-Vektoren leisten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alisch, R.S., Garcia-Perez, J.L., Muotri, A.R., Gage, F.H., Moran, J.V.** (2006). "Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons." Genes Dev 20(2): 210.
- 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. USA 102: 6385.
- Alwin, S., Gere, M.B., Guhl, E., et al.** (2005). "Custom zinc-finger nucleases for use in human cells." Mol Ther 12(4): 610.
- Bachman, N., Eby, Y., Boeke, J.D.** (2004). "Local definition of Ty1 target preference by long terminal repeats and clustered tRNA genes." Genome Res 14(7): 1232.
- Baker, R.E., Gabrielsen, O., Hall, B.D.** (1986). "Effects of tRNATyr point mutations on the binding of yeast RNA polymerase III transcription factor C." J Biol Chem 261(12): 5275.
- Baker, R.E., Camier, S., Sentenac, A., Hall, B.D.** (1987). "Gene size differentially affects the binding of yeast transcription factor tau to two intragenic regions." Proc Natl Acad Sci U S A 84(24): 8768.
- Baldauf, S.L., Doolittle, W.F.** (1997). "Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa)." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12007.
- Baldauf, S.L.** (1999). "A search for the origin of animals and fungi: comparing and combining molecular data." Am. Naturalist 154: S178.
- 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.
- Baptiste, E., Brinkmann, H., Lee, J.A., et al.** (2002). "The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1414.
- Bauerle, A., Mutzel, R.** (1995). "Nucleotide sequence of the gene for ribosomal protein S17 from Dictyostelium discoideum." Biochim. Biophys. Acta 1260: 223.
- Beck, P., Dinger, T., Winckler, T.** (2002). "Transfer RNA gene-targeted retrotransposition of Dictyostelium TRE5-A into a chromosomal UMP synthase gene trap." J. Mol. Biol. 318: 273.
- Boeke, J.D., Devine, S.E.** (1998). "Yeast retrotransposons: finding a nice quiet neighborhood." Cell 93: 1087.
- Boissinot, S., Furano, A.V.** (2005). "The recent evolution of human L1 retrotransposons." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 402.
- 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.
- Bozzaro, S., Ponte, E.** (1995). "Cell adhesion in the life cycle of Dictyostelium." Experientia 51: 1175.
- Brefeld, O.** (1869). "Dictyostelium mucoroides. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten." Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt 7: 85.
- Bukenberger, M., Marschalek, R., Salzburger, W., Dinger, T.** (1991). "Nuclear factors which bind to Dictyostelium discoideum transfer RNA genes." Curr. Genet. 20: 129.
- Bukenberger, M., Dinger, T., Meissner, W., Seifart, K.H., Winckler, T.** (1994). "Isolation of transcription factor IIIc from Dictyostelium discoideum." Eur. J. Biochem. 220: 839.
- Capy, P., Vitalis, R., Langin, T., Higuier, D., Bazin, C.** (1996). "Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor?" J. Mol. Evol. 42: 359.
- Capy, P.** (2005). "Classification and nomenclature of retrotransposable elements." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 457.
- Carlson, C.M., Frandsen, J.L., Kirchhof, N., Mclvor, R.S., Largaespada, D.A.** (2005). "Somatic integration of an oncogene-harboring Sleeping Beauty transposon models liver tumor development in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 102(47): 17059.

- 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: 1523.
- Check, E.** (2005). "Gene therapy put on hold as third child develops cancer." *Nature* 433(7026): 561.
- Chen, J.M., Stenson, P.D., Cooper, D.N., Ferec, C.** (2005). "A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease." *Hum Genet* 117(5): 411.
- Christensen, S.M., Eickbush, T.H.** (2005). "R2 target-primed reverse transcription: ordered cleavage and polymerization steps by protein subunits asymmetrically bound to the target DNA." *Mol Cell Biol* 25(15): 6617.
- Chung, T., Siol, O., Boutilliss, M., Dingermann, T., Winckler, T.** (2006). "ORF1 protein of Dictyostelium non-LTR retrotransposon TRE5-A mediates integration site selection." *Science* submitted.
- Cost, G.J., Boeke, J.D.** (1998). "Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure." *Biochemistry* 37: 18081.
- Cotter, D.A., Sands, T.W., Viridy, 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.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E.** (2004). "WebLogo: a sequence logo generator." *Genome Res* 14(6): 1188.
- Deininger, P.L., Batzer, M.A.** (2002). "Mammalian retroelements." *Genome Res* 12(10): 1455.
- Dewannieux, M., Esnault, C., Heidmann, T.** (2003). "LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences." *Nat Genet* 35(1): 41.
- Dewannieux, M., Heidmann, T.** (2005). "LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling." *Cytogenet Genome Res* 110(1-4): 35.
- Dingermann, T., Reindl, N., Brechner, T., Werner, H., Nerke, K.** (1990). "Nonsense suppression in Dictyostelium discoideum." *Dev. Genet.* 11: 410.
- Dingermann, T., Werner, H., Schutz, A., Zundorf, 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: 4038.
- Doak, T.G., Doerder, F.P., Jahn, C.L., Herrick, G.** (1994). "A proposed superfamily of transposase genes: Transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 942.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., et al.** (2005). "The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum." *Nature* 435(7038): 43.
- Fedoroff, N.** (1989). "About maize transposable elements and development." *Cell* 56(2): 181.
- Feit, I.N., Bonner, J.T., Suthers, H.B.** (1990). "Regulation of the anterior-like cell state by ammonia in Dictyostelium discoideum." *Dev. Genet.* 11: 442.
- Feng, Q.H., Moran, J.V., Kazazian, H.H., Boeke, J.D.** (1996). "Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition." *Cell* 87(5): 905.
- Flavell, A.** (1995). "Retroelements, reverse transcriptase and evolution." *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 110: 3.
- Fukai, S., Nureki, O., Sekine, S., Shimada, A., Vassilyev, D.G., Yokoyama, S.** (2003). "Mechanism of molecular interactions for tRNA(Val) recognition by valyl-tRNA synthetase." *Rna* 9(1): 100.
- Gaeta, B.A., Sharp, S.J., Stewart, T.S.** (1990). "Saturation mutagenesis of the Drosophila tRNA(Arg) gene B-Box intragenic promoter element: requirements for transcription activation and stable complex formation." *Nucleic Acids Res* 18(6): 1541.
- Garfinkel, D.J.** (2005). "Genome evolution mediated by Ty elements in Saccharomyces." *Cytogenet Genome Res* 110(1-4): 63.
- Geiduschek, E.P., Kassavetis, G.A.** (2001). "The RNA polymerase III transcription apparatus." *J Mol Biol* 310(1): 1.

- 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.
- Gilbert, N., Lutz-Prigge, S., Moran, J.V. (2002). "Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition." Cell 110(3): 315.
- Gilbert, N., Lutz, S., Morrish, T.A., Moran, J.V. (2005). "Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells." Mol Cell Biol 25(17): 7780.
- Glöckner, G., Szafranski, K., Winckler, T., et al. (2001). "The complex repeats of Dictyostelium discoideum." Genome Res. 11: 585.
- Goodier, J.L., Ostertag, E.M., Engleka, K.A., Seleme, M.C., Kazazian, H.H., Jr. (2004). "A potential role for the nucleolus in L1 retrotransposition." Hum Mol Genet 13(10): 1041.
- Grandbastien, M.A., Audeon, C., Bonnivard, E., et al. (2005). "Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 229.
- Gross, J.D. (1994). "Developmental decisions in Dictyostelium discoideum." Microbiol. Rev. 58: 330.
- Haag, A.L., Lin, J.H., Levin, H.L. (2000). "Evidence for the packaging of multiple copies of Tf1 mRNA into particles and the trans priming of reverse transcription." J Virol 74(15): 7164.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., et al. (2002). "Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy." N Engl J Med 346(16): 1185.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science 302: 415.
- Han, K., Sen, S.K., Wang, J., et al. (2005). "Genomic rearrangements by LINE-1 insertion-mediated deletion in the human and chimpanzee lineages." Nucleic Acids Res 33(13): 4040.
- Harwood, A.J., Drury, L. (1990). "New vectors for expression of the E. coli lacZ gene in Dictyostelium." Nucl. Acids Res. 18: 4292.
- Hentschel, U., Zundorf, I., Dingermann, T., Winckler, T. (2001a). "On the problem of establishing the subcellular localization of Dictyostelium retrotransposon TRE5-A proteins by biochemical analysis of nuclear extracts." Anal. Biochem. 296: 83.
- Hentschel, U., Zündorf, I., Dingermann, T., Winckler, T. (2001b). "On the problem of establishing the subcellular localization of *Dictyostelium* retrotransposon TRE5-A proteins by biochemical analysis of nuclear extracts." Anal. Biochem 296: 83.
- Hofmann, J., Schumann, G., Borschet, G., et al. (1991). "Transfer RNA genes from Dictyostelium discoideum are frequently associated with repetitive elements and contain consensus boxes in their 5'-flanking and 3'-flanking regions." J. Mol. Biol. 222: 537.
- Hofmann, J., Winckler, T., Hanenkamp, A., Bukenberger, M., Schumann, G., Marschalek, R., Dingermann, T. (1993). "The Dictyostelium discoideum 5S rDNA is organized in the same transcriptional orientation as the other rDNAs." Biochem. Biophys. Res. Commun. 191: 558.
- Horowitz, J., Chu, W.C., Derrick, W.B., Liu, J.C., Liu, M., Yue, D. (1999). "Synthetase recognition determinants of E. coli valine transfer RNA." Biochemistry 38(24): 7737.
- Hudson, J.J., Hsu, D.W., Guo, K., et al. (2005). "DNA-PKcs-Dependent Signaling of DNA Damage in Dictyostelium discoideum." Curr Biol 15(20): 1880.
- Ivics, Z., Hackett, P.B., Plasterk, R.H., Izsvak, Z. (1997). "Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells." Cell 91(4): 501.
- Izsvak, Z., Ivics, Z., Plasterk, R. (2000). "Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates." J. Mol. Biol. 302: 93.
- Jermyn, K.A., Duffy, K.T., Williams, J.G. (1989). "A new anatomy of the prestalk zone in Dictyostelium." Nature 340: 144.
- Kaiser, M.W., Brow, D.A. (1995). "Lethal mutations in a yeast U6 RNA gene B block promoter element identify essential contacts with transcription factor-IIIc." J Biol Chem 270(19): 11398.
- Kajikawa, M., Okada, N. (2002). "LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence." Cell 111(3): 433.



- Kalpaxis, D., Zundorf, 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.
- Kassavetis, G.A., Riggs, D.L., Negri, R., Nguyen, L.H., Geiduschek, E.P. (1989). "Transcription factor IIIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes." Mol Cell Biol 9(6): 2551.
- Kazazian, H.H. (1998). "Mobile elements and disease." Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 343.
- Kazazian, H.H. (2000). "L1 retrotransposons shape the mammalian genome." Science 289: 1152.
- Kazazian, H.H., Jr. (2004). "Mobile elements: drivers of genome evolution." Science 303(5664): 1626.
- Kenna, M.A., Brachmann, C.B., Devine, S.E., Boeke, J.D. (1998). "Invading the yeast nucleus: a nuclear localization signal at the C terminus of Ty1 integrase is required for transposition in vivo." Mol Cell Biol 18(2): 1115.
- Kessin, R.H. (2000). Evolutionary biology - Cooperation can be dangerous. Nature. 408: 917-919.
- 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(5): 464.
- Kiyosawa, H., Hughes, J.E., Podgorski, G.J., Welker, D.L. (1993). "Small circular plasmids of the eukaryote *Dictyostelium purpureum* define two novel plasmid families." Plasmid 30: 106.
- Knippers, R. (2001). Molekulare Genetik. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Konieczny, A., Voytas, D.F., Cummings, M.P., Ausubel, F.M. (1991). "A superfamily of *Arabidopsis thaliana* retrotransposons." Genetics 127(4): 801.
- Kulpa, D.A., Moran, J.V. (2005). "Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition." Hum Mol Genet 14(21): 3237.
- Kumar, A., Bennetzen, J.L. (1999). "Plant retrotransposons." Annu Rev Genet 33: 479.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature 409(6822): 860.
- Li, T.H., Schmid, C.W. (2001). "Differential stress induction of individual Alu loci: implications for transcription and retrotransposition." Gene 276(1-2): 135.
- Loomis, W.F. (1971). "Sensitivity of *Dictyostelium discoideum* to nucleic acid analogues." Exp. Cell Res. 64: 484.
- Loomis, W.F. (1982). The development of *Dictyostelium discoideum*. New York, Ac. Press.
- Loomis, W.F., Smith, D.W. (1995). "Consensus phylogeny of *Dictyostelium*." Experientia 51: 1110.
- Malik, H.S., Burke, W.D., Eickbush, T.H. (1999). "The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements." Mol. Biol. Evol. 16: 793.
- Malik, H.S., Eickbush, T.H. (2000). "NeSL-1, an ancient lineage of site-specific non-LTR retrotransposons from *Caenorhabditis elegans*." Genetics 154(1): 193.
- Malik, H.S., Eickbush, T.H. (2001). "Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses." Genome Res. 11: 1187.
- Malik, H.S., Henikoff, S. (2005). "Positive Selection of Iris, a Retroviral Envelope-Derived Host Gene in *Drosophila melanogaster*." PLoS Genet 1(4): e44.
- Maniak, M., Nellen, W. (1989). "pISAR, a tool for cloning genomic sequences adjacent to the site of vector integration." Nucl. Acids Res. 17: 4894.
- Manstein, D.J., Schuster, H.P., Morandini, P., Hunt, D.M. (1995). "Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*." Gene 162(1): 129.
- 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.
- Marschalek, R., Hofmann, J., Schumann, G., Dingermann, T. (1992a). "Two distinct subforms of the retrotransposable DRE element in NC4 strains of *Dictyostelium discoideum*." Nucl. Acids Res. 20: 6247.

- Marschalek, R., Hofmann, J., Schumann, G., Gosseringer, R., Dingermann, T. (1992b). "Structure of DRE, a retrotransposable element which integrates with position specificity upstream of Dictyostelium discoideum tRNA genes." Mol. Cell. Biol. 12: 229.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P., Nellen, W. (2002). "RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase." Mol. Biol. Cell 13: 445.
- Martin, S.L., Li, W.L., Furano, A.V., Boissinot, S. (2005). "The structures of mouse and human L1 elements reflect their insertion mechanism." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 223.
- McClintock, B. (1948). "Mutable loci in maize." Carnegie Inst. Wash. Year Book 47: 155.
- McDonald, J.F., Matzke, M.A., Matzke, A.J. (2005). "Host defenses to transposable elements and the evolution of genomic imprinting." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 242.
- Miskey, C., Izsvak, Z., Kawakami, K., Ivics, Z. (2005). "DNA transposons in vertebrate functional genomes." Cell Mol Life Sci 62(6): 629.
- Moran, J.V., Holmes, S.E., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Boeke, J.D., Kazazian, H.H. (1996). "High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells." Cell 87: 917.
- Morrish, T.A., Gilbert, N., Myers, J.S., et al. (2002). "DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition." Nat Genet 31(2): 159.
- Mourier, T. (2005). "Reverse transcription in genome evolution." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 56.
- Mutzel, R. (1991). "Cellular slime molds: why and how to become pluricellular." Bull. Inst. Pasteur 89: 51.
- Nara, T., Hshimoto, T., Aoki, T. (2000). "Evolutionary implications of the mosaic pyrimidine-biosynthetic pathway in eukaryotes." Gene 257(2): 209.
- Nichols, M., Bell, J., Klekamp, M.S., Weil, A., Söll, D. (1989). "Multiple mutations of the first gene of a dimeric tRNA gene abolish in vitro tRNA gene transcription." J. Biol. Chem. 264: 17084.
- Ohshima, K., Okada, N. (2005). "SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 475.
- Ostertag, E.M., Prak, E.T., DeBerardinis, R.J., Moran, J.V., Kazazian, H.H. (2000). "Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells." Nuc. Acids Res. 28: 1418.
- Ostertag, E.M., Kazazian, H.H. (2001a). "Biology of mammalian L1 retrotransposons." Annu. Rev. Genet. 35: 501.
- Ostertag, E.M., Kazazian, H.H., Jr. (2001b). "Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition." Genome Res 11(12): 2059.
- Ostertag, E.M., DeBerardinis, R.J., Goodier, J.L., Zhang, Y., Yang, N., Gerton, G.L., Kazazian, H.H., Jr. (2002). "A mouse model of human L1 retrotransposition." Nat Genet 32(4): 655.
- Pang, K.M., Lynes, M.A., Knecht, D.A. (1999). "Variables controlling the expression level of exogenous genes in Dictyostelium." Plasmid 41: 187.
- Pardue, M.L., Rashkova, S., Casacuberta, E., DeBaryshe, P.G., George, J.A., Traverse, K.L. (2005). "Two retrotransposons maintain telomeres in Drosophila." Chromosome Res 13(5): 443.
- Parent, C.A., Devreotes, P.N. (1996). "Molecular genetics of signal transduction in Dictyostelium." Annu. Rev. Biochem. 65: 411.
- Peng, Z. (2005). "Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers." Hum Gene Ther 16(9): 1016.
- Plasterk, R., Izsvak, Z., Ivics, Z. (1999). "Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements." Trends Genet. 15: 326.
- Popova, B., Kuhlmann, M., Hinas, A., Soderbom, 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.
- Poulter, R.T., Goodwin, T.J. (2005). "DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 575.

- Ramesh, V., RajBhandary, U.L.** (2001). "Importance of the anticodon sequence in the aminoacylation of tRNAs by methionyl-tRNA synthetase and by valyl-tRNA synthetase in an Archaeobacterium." J Biol Chem 276(5): 3660.
- Raper, K.B.** (1935). "Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves." J. Agr. Res. 50: 135.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., et al.** (2003). "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer." Mol Genet Metab 80(1-2): 148.
- Roberts, D.N., Stewart, A.J., Huff, J.T., Cairns, B.R.** (2003). "The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relationships." Proc Natl Acad Sci U S A 100(25): 14695.
- Rubin, E., Lithwick, G., Levy, A.A.** (2001). "Structure and evolution of the hAT transposon superfamily." Genetics 158(3): 949.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). "Molecular Cloning – A Laboratory Manual." Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463.
- Shammat, I.M., Gonzales, C.M., Welker, D.L.** (1998). "Dictyostelium discoideum nuclear plasmid Ddp6 is a new member of the Ddp2 plasmid family." Curr. Genet. 33: 77.
- Shammat, I.M., Welker, D.L.** (1999). "Mechanism of action of the Rep protein from the Dictyostelium Ddp2 plasmid family." Plasmid 41: 248.
- Singhal, R.P., Roberts, E.F., Vakharia, V.N.** (1983). "Structure of transfer RNAs: listing of 150 additional sequences." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 28: 211.
- Soifer, H.S., Kasahara, N.** (2004). "Retrotransposon-adenovirus hybrid vectors: efficient delivery and stable integration of transgenes via a two-stage mechanism." Curr Gene Ther 4(4): 373.
- Sucgang, R., Chen, G.K., Liu, W., et al.** (2003). "Sequence and structure of the extrachromosomal palindromic encoding the ribosomal RNA genes in Dictyostelium." Nucl. Acids Res. 31: 2361.
- Sussman, R., Sussman, M.** (1967). "Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic medium." Biochem Biophys Res Commun 29(1): 53.
- Symer, D.E., Connelly, C., Szak, S.T., Caputo, E.M., Cost, G.J., Parmigiani, G., Boeke, J.D.** (2002). "Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo." Cell 110(3): 327.
- Szafranski, K., Glöckner, G., Dingermann, T., et al.** (1999). "Non-LTR retrotransposons with unique integration preferences downstream of Dictyostelium discoideum tRNA genes." Mol. Gen. Genet. 262: 772.
- Szafranski, K.** Dissertation "Die Transposons im Genom von *Dictyostelium discoideum*" Jena (2002)
- Tchenio, T., Casella, J.F., Heidmann, T.** (2000). "Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons." Nucleic Acids Res 28(2): 411.
- Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., et al.** (2005). "Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases." Nature 435(7042): 646.
- Verma, I.M., Weitzman, M.D.** (2005). "Gene therapy: twenty-first century medicine." Annu Rev Biochem 74: 711.
- Vitte, C., Panaud, O.** (2005). "LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 91.
- Wah, D.A., Hirsch, J.A., Dorner, L.F., Schildkraut, I., Aggarwal, A.K.** (1997). "Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA." Nature 388(6637): 97.
- Waldschmidt, R., Jahn, D., Seifart, K.H.** (1988). "Purification of transcription factor III B from HeLa cells." J. Biol. Chem. 263: 13350.
- Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S.L., et al.** (2001). "Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation." Mol. Cell. Biol. 21: 1429.

- Wheelan, S.J., Aizawa, Y., Han, J.S., Boeke, J.D.** (2005). "Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution." Genome Res 15(8): 1073.
- Wilhelm, F.X., Wilhelm, M., Gabriel, A.** (2005). "Reverse transcriptase and integrase of the *Saccharomyces cerevisiae* Ty1 element." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 269.
- Wilhelm, M., Wilhelm, F.X.** (2001). "Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons." Cell Mol Life Sci 58(9): 1246.
- Winckler, T.** (1998). "Retrotransposable elements in the *Dictyostelium discoideum* genome." Cell. Mol. Life Sci. 54: 383.
- Winckler, T., Trautwein, C., Tschepke, C., et al.** (2001). "Gene function analysis by amber stop codon suppression: CMBF is a nuclear protein that supports growth and development of *Dictyostelium amoebae*." J. Mol. Biol. 305: 703.
- Winckler, T., Dingermann, T., Glöckner, G.** (2002). "Dictyostelium mobile elements: strategies to amplify in a compact genome." Cell. Mol. Life Sci. 59: 2097.
- Winckler, T., Szafranski, K., Glöckner, G.** (2005a). "Transfer RNA gene-targeted integration: an adaptation of retrotransposable elements to survive in the compact *Dictyostelium discoideum* genome." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 288.
- Winckler, T., Zündorf, I., Dingermann, T.** (2005b). An NIH model organism for biopharmaceutical and biomedical research: the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. Modern Biopharmaceuticals - Design, Development and Optimization. Knäblein, J., Müller, R.H., Wiley VCH: 661-693.
- Witke, W., Nellen, W., Noegel, A.** (1987). "Homologous recombination in the *Dictyostelium* alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein." EMBO J. 6: 4143.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, S.M.** (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science 300: 1749.
- Xiao, Y.L., Li, X., Peterson, T.** (2000). "Ac insertion site affects the frequency of transposon-induced homologous recombination at the maize p1 locus." Genetics 156(4): 2007.
- Xie, W., Gai, X., Zhu, Y., Zappulla, D.C., Sternglanz, R., Voytas, D.F.** (2001). "Targeting of the yeast Ty5 retrotransposon to silent chromatin is mediated by interactions between integrase and Sir4p." Mol. Cell. Biol. 21: 6606.
- Yang, J., Malik, H.S., Eickbush, T.H.** (1999). "Identification of the endonuclease domain encoded by R2 and other site-specific, non-long terminal repeat retrotransposable elements." Proc Natl Acad Sci U S A 96(14): 7847.
- Ye, J., Perez-Gonzalez, C.E., Eickbush, D.G., Eickbush, T.H.** (2005). "Competition between R1 and R2 transposable elements in the 28S rRNA genes of insects." Cytogenet Genome Res 110(1-4): 299.
- Yieh, L., Kassavetis, G., Geiduschek, E.P., Sandmeyer, S.B.** (2000). "The Brf and TATA-binding protein subunits of the RNA polymerase III transcription factor IIIB mediate position-specific integration of the gypsy-like element, Ty3." J Biol Chem 275(38): 29800.
- Yieh, L., Hatzis, H., Kassavetis, G., Sandmeyer, S.B.** (2002). "Mutational analysis of the transcription factor IIIB-DNA target of Ty3 retroelement integration." J Biol Chem 277(29): 25920.
- Zhu, Y., Dai, J., Fuerst, P.G., Voytas, D.F.** (2003). "Controlling integration specificity of a yeast retrotransposon." Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5891.
- Zingler, N., Willhoeft, U., Brose, H.P., et al.** (2005). "Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining." Genome Res 15(6): 780.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Ausschrift
β-ME	β-Mercaptoethanol
5-FO	5-Fluoroorotat
A	Adenin
Ac	<i>activator</i>
APE	apurinisch/apyrimidinische Endonuklease
Bdp	B double prime (Untereinheit von TFIIIB)
bp	Basenpaar(e)
Brf	TFIIIB related factor (Untereinheit von TFIIIB)
C	Cytosin
Cbfa	C-modul binding factor
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CIP	calf intestinal alkaline phosphatase
CPRG	Chlorophenolrot-β-Dgalaktopyranosid
DDT	<i>Dictyostelium</i> DNA transposon
DGLT	<i>Dictyostelium gypsy</i> like transposon
DIRS	<i>Dictyostelium</i> intermediate repeat sequence
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (A, C, G oder T)
DR	direct repeat
Ds	<i>dissociation</i>
dsDNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EN	Endonuklease
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HC	Histidin-Cystein-Motiv (Zinkfinger-Sequenz)
IN	Integrase
iPCR	inverse PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
ITR	inverted terminal repeat
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LINE	long interspersed nuclear element
LTR	long terminal Repeat
M	molar
Mb	Megabase(n)
MES	Morpholinethansulfonsäure
min	Minuten
mol	Mol ( $6,022 \times 10^{23}$ Einheiten)

N	beliebige Base (A, C, G oder T)
n	Anzahl
NLS	nuclear localisation signal (Kernlokalisierungssignal)
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	primer binding site
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pH	Konzentration des Wasserstoffes (potentia Hydrogenii)
PIC	Präintegrationskomplex
Pol	RNA-Polymerase
Pos.	Position
PPT	poly purine tract (poly-Purin-Region)
PR	Protease
R	Purin Base (A oder G)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleopartikel
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SINE	short interspersed nuclear element
ssDNA	single stranded DNA (einzelsträngige DNA)
T	Thymin
Tam3	transposon <i>Antirrhinum majus</i>
TBP	TATA-Box binding factor (Untereinheit von TFIIB)
Tc1	transposon <i>Caenorhabditis elegans</i>
TCA	Trichloressigsäure
Tdd	transposon in <i>Dictyostelium discoideum</i>
TE	transposables Element
TF	Transkriptionsfaktor
TPRT	target-primed reverse transcription
TR	Transposase
TRE	tRNA-gene-associated Retroelement
tRNA	transfer RNA
TSD	target site duplication
Ty	transposon yeast
U	unit (Einheit) oder Uracil
UTR	untranslated region (nicht translatierter Bereich)
V	Volt
VLP	virus like particle
XCFF	Xylencyanol FF
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
Y	Pyrimidin Base (C oder T)

## 7.2 Abbildungen

Abbildung 1.1.1: Proteom-basierter Stammbaum .....	2
Abbildung 1.1.2: <i>D. discoideum</i> Entwicklungszyklus (schematisch) .....	5
Abbildung 1.1.3: <i>D. discoideum</i> Entwicklungszyklus (mikroskopisch) .....	5
Abbildung 1.2.1: Struktur eines DNA-Transposons .....	12
Abbildung 1.2.2: Struktur eines LTR-Transposons .....	14
Abbildung 1.2.3: Struktur eines Non-LTR-Retrotransposons .....	16
Abbildung 1.2.4: TPRT Modell .....	17
Abbildung 1.2.5: Struktur eines SINE Elementes .....	19
Abbildung 1.3.1: Transposons in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	24
Abbildung 1.3.2: Integrationsorte der tRNA-assoziierten Transposons .....	28
Abbildung 1.3.3: TRE5-A-Elemente .....	30
Abbildung 1.3.4: TRE5-B-Element .....	31
Abbildung 1.3.5: TRE5-C-Element .....	31
Abbildung 1.3.6: TRE3-Element .....	32
Abbildung 1.4.1: Schematische Darstellung eines tRNA-Gens .....	34
Abbildung 3.1.1: TRE-Falle .....	56
Abbildung 3.1.2: 5-FO-Selektion mit humanem Met <sup>CAU</sup> -Gen .....	57
Abbildung 3.1.3: Zweite 5-FO-Selektion mit humanem Met <sup>CAU</sup> -Gen .....	57
Abbildung 3.1.4: UMP20/21 PCR an 5-FO-resistenten Uhti Klonen .....	59
Abbildung 3.1.5: Southernblot Uhti UMP20/21 PCRs gegen TRE5-A .....	60
Abbildung 3.1.6: TRE-Integrationsorte vor dem humanen Met <sup>CAU</sup> -tRNA-Gen .....	61
Abbildung 3.1.7: Anzahl der A-Module .....	62
Abbildung 3.1.8: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Uigi .....	64
Abbildung 3.1.9: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Uig .....	66
Abbildung 3.1.10: Alignment der B-Boxen .....	67
Abbildung 3.1.11: Alignment der A-Boxen .....	68
Abbildung 3.1.12: Abstände zwischen der A- und der B-Box von tRNA-Genen .....	69
Abbildung 3.1.13: Retrotranspositionsfrequenzen an einer B-Box .....	70
Abbildung 3.1.14: TRE-Integrationsorte in dem Stamm UiB-Box .....	71
Abbildung 3.1.15: Suppressor-Aktivitätstest des Glu <sup>Sup</sup> -Gens .....	73
Abbildung 3.1.16: Mutationen in der B-Box .....	75
Abbildung 3.1.17: Gel-Shift Val <sup>UAC</sup> + Kompetitor mit TFIIC .....	76
Abbildung 3.1.18: 5-FO-Selektionen mit Val <sup>UAC</sup> -Mutanten .....	77
Abbildung 3.1.19: Gel-Shift Glu <sup>Sup</sup> -Mutationen mit TFIIC .....	78
Abbildung 3.1.20: Suppressor-Aktivitätstest mit mutierten Glu <sup>Sup</sup> -Genen .....	80
Abbildung 3.1.21: 5-FO-Selektionen mit Glu <sup>Sup</sup> -Mutanten .....	81
Abbildung 3.1.22: 5-FO-Selektionen der Stämme UviexB und UiexB .....	82
Abbildung 3.1.23: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Uivi56exB .....	83
Abbildung 3.1.24: 5-FO-Selektionen mit dem r5S-Gen .....	85
Abbildung 3.1.25: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Ui5S .....	86
Abbildung 3.1.26: TRE-Integrationsorte in dem Stamm Ui5S2x .....	87
Abbildung 3.1.27: 5-FO-resistente Klone des Stammes Ui .....	88
Abbildung 3.1.28: Southernblot der Ui-Klone .....	89
Abbildung 3.2.1: Retrotranspositions-assay für markierte LINE-Elemente .....	90
Abbildung 3.2.2: Retrotranspositionsschema für markierte TRE5-A <sup>BSR</sup> -Elemente .....	92
Abbildung 3.2.3: RT-PCR TRE5-A <sup>BSR</sup> .....	93
Abbildung 3.2.4: BSR-Selektion mit mutierter Splice-Donor-Site .....	94
Abbildung 3.2.5: PCR an BSR-restistenten AX2-A-BSRi-C Zellen .....	95
Abbildung 3.2.6: Sequenzen des Introns eines mobilisierten A-BSRi-C-Elementes .....	95

Abbildung 3.2.7: Untersuchung von A-ORF1-BSRi-C Klonen .....	96
Abbildung 3.2.8: Mobilisierte Elemente pro Zeit .....	97
Abbildung 3.2.9: TRE5-A <sup>BSR</sup> -Konstrukte .....	98
Abbildung 3.2.10: Retrotranspositionsfrequenzen von TRE5-A <sup>BSR</sup> -Elementen .....	99
Abbildung 3.2.11: Umgebung des Translationsstartes von ORF1 .....	102
Abbildung 3.2.12: Integrationsorte der TRE5-A <sup>BSR</sup> -Elemente .....	103
Abbildung 3.2.13: Untersuchung der Integration des Klons #Leu <sup>UAA</sup> 14 .....	105
Abbildung 4.1.1: Modelle zur Zielerkennung der TRE5-A-Proteine .....	111
Abbildung 4.6.1: TFIIC-Bindung an unterschiedlich langen tRNA-Genen .....	123

## 7.3 Synthetische Oligonukleotide

Alle für Klonierungen, Mutagenesen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden in Auftragssynthese von der Firma MWG hergestellt.

### 7.3.1 Oligonukleotide, die in TRE-Elementen binden

Name	Sequenz (5'→3')
neo6	GGGTCGACAGATCGAAAAAAAAACAAACAACAACAAC
neo7	AAAAGCTTTTCCCAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
neo9	TTGAAGCTTGAATTTTGAATGTATTATTACTTTTTG
Rep48.2	GAATTGGATAACGCAATTATT
Rep54.1	CCTGGGAACCCAAGTTAATCAG
Rep83	GAGATCTAGCATCTCAAGGAGAAG
Rep83rev	CTTCTCCTTGAGATGCTAGATCTC
Rep84	CTAACCCCTCTTTTAGAGACCCTG
Rep85	GAAAATTTTGCTACGCAAATTCTC
Rep87	TTTTATAGTTTTATTTGGGGTAGATTTT
Rep94	GACAAAGACCCTAGCGATGGTTGATTTGTTTC
Rep102	GGGTACCTTTTTTTTTTTGAATTGGATAACGCAATTATTATTG
Rep104	CGTCTGGTTCGTGATTGATGTTTATGAC
Rep106	CCAACCAGAGTACTTGGAAGGCCTGAGG
Rep112	CACGCACCAATTGATAAACAGG
Rep113	GAGATGTTTAGGAAGTTCTATTGC
Rep114	CAAGGATCCAACACCATCCAATC
Rep115	GTTAGAAGTGCTGCGTCCAGC
Rep116	GGAAGCTTAAAATGAAAATCACAAACAACACCACAAATATTAAG
Rep117	AAGCTTCTTATTGTGTTTTTCTTTATAGTTTTATTTGGGGTAG
Rep118	CATTATCCACCAATCACCTCC
TRE3C 3'Seq	AAACCGTTTAAACAACACCGCCG
TRE3C.1	CCAAGACAATATTCAGATCATGAAGG
TRE3C.2	GCTGCTGGGGTTTGCCAGG



### 7.3.2 Oligonukleotide, die im Blastocidin-Gen binden

Name	Sequenz (5'→3')
BSR 3' Seq	GTGTAGGGAGTTGATTTTCAGACTATGCACC
BSR 5' seq	CGTACGAATTGCCGCTCCAC
BSR04 (mut-bgl)	CCTTACCTTTTTTTTTAATTATAGTGTTGAGAAATGTAAATTGATCC
BSR05	GGAATTCGGCTGCAGGTCGACGGATCCTC
BSR06	AAAGCTTAAAGCTTTTTTATTAATTTTCGGGTATATTTGAGTGG
BSR07 (mut SD)	CTACTTCTACTAATTCTAGATCTAAAGCTTTTAATATTAATAAAG
BSR08	CGTACTTCTACTAATTCTAGATCTTGTTG
BSR09	CTCATTCCACTCAAATATACCCG
BSR10	CCTGCAGCCGAATTCCCCG

### 7.3.3 Oligonukleotide, die in tRNA-Genen oder im 5S-Gen binden

Name	Sequenz (5'→3')
5SrDNA01	GGGAATTCGTATACGGCCATACTAGGTTG
5SrDNA02	GGGAATAAATAAAGTATACAGCACCC
5SrDNA03	CCAACCAGAGTACTTGGAAGGC
Asp(GUC)rev	CCCTGTCCGGGAATTGAACCC
Glu1	GGAATTCTCCTCATTGGTGTAGTCGGTAACAC
Glu2T	GGAATTCTAATTTTGGTCCGGAATAAAAACCTCC
GluC56G	CCATTCGGGAATCCAACCCGAGGTACC
GluC61A	CCCCATTCGGTAATCGAACCCGAGGTACC
GluG53T	CCATTCGGGAATCGAAACCCGAGGTACCAG
Gly(GCC)rev	GTATGCTGGGAATCGAACCC
hMetCAU-for	GGGGAATTCAGCAGAGTGGCGCAGCGG
hMetCAU-rev	GGGGAATTCAAAAAAAAAAGGACCTAGCAGAGGATGG
Leu(UAA)rev	GCAAGAGGCGAGATTCTGAACCTC
Lys(UUU)rev	CCAAAGGGGGGCTCGAACCC
ValAAC-for	GGATGGTGTAGTCGGTTATCACG
ValAAC-rev	CAGAGCGGGAATCGAACCCACGAC
ValUAC-back	GGGAATTCTGATCCGACCGAGGATCG
ValUAC-C57G	CCGAGGATCCAACCTCGAGACCTGTTG
ValUAC-C62A	GATCCGACCGATGATCGAACTCGAGACC
ValUAC-exB 44 2	GTTTTTTAATTTCAATTGATTCGAACCTGCGACTCGGATCAGAATTCTGATCC
ValUAC-for	GGGAATTCGGTCCGATGGTGTAGTCGG
ValUAC-G53T	CCGAGGATCGAAATCGAGACCTGTTG
ValUAC-Sup	CGAGACCTGTTGCGTTAGAAGCAACCGTG
ValUAC-Term	CACTATTTCCGATCCGAATTCGTAAAAAGATATGATCCGACCG

### 7.3.4 Oligonukleotide, die im UMPS-Gen binden

Name	Sequenz (5'→3')
UMP1	TCGATTTTAAAGATTGGTTT
UMP2	GGTCTGAAAGTCATTCC
UMP20	CACCACCATTGTTAGCAGCAATTGCAGAGATGATG
UMP21	CCTGCGACACCATGTACGGTGACCATGACTGCC
UMP22	CTGTTTCAAGTACACTTGCACC

### 7.3.5 Sonstige Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')
Chr3Leu1	GTAGGATCTTACAAATTTTTGGGG
Lac seq neu	GGGACGACGACAGTATCGGC
lacZ (amber) 1	CAACGTCGTGACTGGTAGAACCCCTGGCGTTACC
lacZ (amber) 2	GGTAACGCCAGGGTTCTACCAGTCACGACGTTG
neo3	CCAATGCATCCTGTGACGGAAGATCACTTC
neo3.1	GGACTAGTTAAAAAATTACGCCCGGCCCTG
RSP	CGGATAACAATTTACACAGG
s17i-05	GAAACAAGATTGCTGGTTTCTGTACCC
s17i-06	GTTGTATCTCTTTTGGTCAACGACGTG
s17i-07	GAATCCCAACCAAGATCTGTAAGTTTTAATATTAATAAAAAAG
s17i-08	CCTTTTTTTTAATTATAGAGATCTACGTCGTTGACC
SP	CGCCAGGGTTTTCCAGTCAC

## 7.4 Vektoren und Plasmide

### 7.4.1 Kommerzielle Ausgangsvektoren

pDXA-3H	<i>D. discoideum</i> Expressionsvektor, Amp <sub>r</sub> , Neo <sub>r</sub> , Ddp2-ori, Actin15-Promotor, His <sub>8</sub> -Tag (C-terminal) (Manstein 1995)
pGEM <sup>®</sup> -7Zf(-)	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor (2998 bp), Amp <sub>r</sub> , f1 ori, SP6-Promotor, T7-Promotor, lacZ (Fa. Promega)
pGEM <sup>®</sup> -T	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor (3001 bp), Amp <sub>r</sub> , f1 ori, SP6-Promotor, T7-Promotor, lacZ, (Fa. Promega)

## 7.4.2 Hergestellte Vektorkonstrukte mit Insert

pGEM-UMPS (pU)	(1.1170) (pGEM-T[ <i>pyr5-6</i> ] PCR Fragment mit den Primern „UMP 1“ und „UMP 2“ ( <i>pyr5-6</i> ) (1820 bp) an „pDU3B“ in pGEM <sup>®</sup> -T kloniert. Das UMPS-Gen hat die Orientierung des T7-Promotors (Beck 2002).
pGEM-UMPS-Int (pUi)	(1.1549) (pGEM-T[ <i>pyr5-6</i> ( <i>cbfA<sub>int</sub></i> )]) Das <i>cbfA</i> -Intron als <i>Kpn</i> I-Fragment (414 bp) in <i>Kpn</i> I vom UMPS-Gen in „pU“ kloniert - das <i>cbfA</i> -Intron hat dieselbe Orientierung wie das UMPS-Gen (Beck 2002).
pGEM-UMPS-Int-Val(UAC) (pUiv)	(1.1364) (pGEM-T[ <i>pyr5-6</i> ( <i>cbfA<sub>int</sub></i> ) (Val UAC)]) Die kodierende Sequenz des Val(UAC)-Gens in Orientierung des UMPS-Gens als <i>EcoR</i> I-Fragment in eingefügte <i>EcoR</i> I-Site des <i>cbfA</i> Intron von „pUi“ kloniert (Beck 2002).
pGEM-UMPS-Int-Val(UAC)i (pUivi)	(1.1365) (pGEM-T[ <i>pyr5-6</i> ( <i>cbfA<sub>int</sub></i> ) (Val UAC)i]) Die kodierende Sequenz des Val(UAC)-Gens in entgegengesetzter Orientierung des UMPS-Gens als <i>EcoR</i> I-Fragment in eingefügte <i>EcoR</i> I-Site des <i>cbfA</i> Intron von „pUi“ kloniert (Beck 2002). (1.1365)
pUivi53	(1.1899) Punktmutation (G gegen T) im Val(UAC)-Gen an Position 53 von „pUivi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ValUAC-G53T“.
pUivi56	(1.1840) Punktmutation (C gegen G) im Val(UAC)-Gen an Position 56 von „pUivi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ValUAC-C57G“.
pUivi61	(1.1898) Punktmutation (C gegen A) im Val(UAC)-Gen an Position 61 von „pUivi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ValUAC-C62A“.
pUiviS	(1.1895) Anticodon (UAC) gegen Suppressions-Codon (UAG) im Val(UAC)-Gen an Position 34-36“ von „pUivi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ValUAC-Sup“ ausgetauscht
pUiviex-B	(1.1862) Externe B-Box 44 bp hinter Val(UAC)-Gen in „pUivi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ValUAC ex-B 44 2“ eingefügt.
pUivi56ex-B	(1.1742) B-Box 44 bp hinter Val(UAC)-Gen in „pUivi56“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ValUAC ex-B 44 2“ eingefügt.
pUiB-Box	(1.1829) B-Box im <i>cbfA</i> -Intron durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ValUAC ex-B 44 2“ in „pUi“ eingefügt. Die Position und Orientierung der B-Box entspricht der ex-B-Box im „pUivi ex-B“.
pUig	(1.1772) Die kodierende Sequenz des Glu (GAA)-Gens mit Terminator und <i>amber</i> -Suppressions-Anticodon als PCR-Produkt mit den Primern „Glu 1“ und „Glu 2T“ an „pGTET BSR+1( <i>amber</i> )“ (Winckler 2001) in den Vektor pGEM <sup>®</sup> -T zwischenkloniert und als <i>EcoR</i> I-Fragment in Orientierung des UMPS-Gens, in eingefügte <i>EcoR</i> I-Site des <i>cbfA</i> Intron von „pUi“ kloniert.

pUigi	(1.1705) Die kodierende Sequenz des Glu (GAA)-Gens mit Terminator und <i>amber</i> -Suppressions-Anticodon als PCR-Produkt mit den Primern „Glu 1“ und „Glu 2T“ an „pGTET BSR( <i>amber</i> )“ in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und als <i>EcoR</i> I-Fragment in entgegengesetzter Orientierung des UMPS-Gens, in eingefügte <i>EcoR</i> I-Site des <i>cbfA</i> Intron von „pUi“ kloniert.
pUigi53	(1.1881) Punktmutation (G gegen C) im Glu (GAA)-Gen an Position 53 von „pUigi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „Glu-G53C“.
pUigi56	(1.1743) Punktmutation (C gegen G) im Glu (GAA)-Gen an Position 56 von „pUigi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „Glu-C56G“.
pUigi61	(1.1741) Punktmutation (C gegen A) im Glu (GAA)-Gen an Position 61 von „pUigi“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „Glu-C61A“.
pUi5S	(1.1629) Die kodierende Sequenz des ribosomalen 5S-Gens als PCR-Produkt mit den Primern „5S rDNA-01“ und „5S rDNA-02“ an „pUd5S“ (Hofmann 1993) in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und als <i>EcoR</i> I-Fragment in Orientierung des UMPS-Gens, in eingefügte <i>EcoR</i> I-Site des <i>cbfA</i> Intron von „pUi“ kloniert.
pUi5Si	(1.1628) Die kodierende Sequenz des ribosomalen 5S-Gens als PCR-Produkt mit den Primern „5S rDNA-01“ und „5S rDNA-02“ an „pUd5S“ (Hofmann 1993) in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und als <i>EcoR</i> I-Fragment in entgegengesetzter Orientierung des UMPS-Gens, in eingefügte <i>EcoR</i> I-Site des <i>cbfA</i> Intron von „pUi“ kloniert.
pUiht	(1.1630) Die kodierende Sequenz des humanen Met (CAU)-Gens als PCR-Produkt mit den Primern „hMetCAU-for“ und „hMetCAU-rev“ an „pXlt1met“ (Waldschmidt 1988) in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und als <i>EcoR</i> I-Fragment in entgegengesetzter Orientierung des UMPS-Gens, in eingefügte <i>EcoR</i> I-Site des <i>cbfA</i> Intron von „pUi“ kloniert.
pVal(UAC)1	(1.0210) Komplettes Val(UAC)-Gen mit genomischen flankierenden Sequenzen in pUC19 (Bukenberg 1991).
pDd Gal 17-A15P	(1.1842) <i>Dictyostelium discoideum</i> LacZ-Expressionsvektor mit G418-Resistenzkassette und A15 Promotor als <i>Xba</i> I / <i>Bgl</i> II aus „pBT10Act15BKH“ vor <i>LacZ</i> -Gen in pDd Gal 17 (Harwood 1990) kloniert (von Jeff Williams).
pDd-Gal-A15P( <i>amber</i> )	(1.1720) <i>Amber</i> -Stopp-Codon durch Doppelstrangmutagenese mit den Primern „LacZ <i>amber</i> 1“ und „LacZ <i>amber</i> 2“ an <i>LacZ</i> Aminosäureposition 17 in „pDd Gal 17-A15P“ eingefügt.
pB3	(1.0820) Der Vektor enthält ein genomisches <i>Sau</i> 3A-Fragment aus AX3. Das Fragment beinhaltet ein TRE5-A.1-Element ohne A-Modul und ein komplettes TRE5-A.3-Element (Marschalek 1992b).
pORF+BSR	(1.1045) Plasmid enthält <i>BSR</i> -Kassette als <i>Hind</i> III-Fragment (P. Morandini, M. Scienza unveröffentlicht).
pGEM_7Zf(-) BSR	(1.1233) Blastocin-Resistenzkassette mit A15-Promotor und

	A8-Terminator als <i>Hind</i> III-Fragment aus „pORF+BSR“ in „pGEM_7 Zf(-)“ kloniert. Das Blastocidin-Gen besitzt an Aminosäureposition 10 eine singlecopy- <i>Bgl</i> II Schnittstelle.
pGEMs17(5/6)7+8	(1.1688) <i>s17</i> -Gen mit Intron als PCR-Produkt mit den Primern „S17-05“ und „S17-06“ an AX2-gDNA in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T ligiert, <i>Bgl</i> II -Sites durch Einzelstrangmutagenese mit den Primern „S17-07“ und „S17-08“ direkt vor und hinter dem Intron eingefügt.
pGEM-7Zf(-)-BSR <i>s17</i> int	(nur Minilysat) <i>s17</i> -Intron aus „pGEMs17(5/6)7+8“ mit <i>Bgl</i> II in entgegengesetzter Orientierung der Blastocidinresistenzkassette, in <i>Bgl</i> II-Site der Blastocidinresistenz von „pGEM_7Zf(-) BSR“ kloniert. Die durch die Klonierung entstandene 2. <i>Bgl</i> II-Site in der Blastocidinresistenz wurde durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „BSR04“ wieder entfernt.
pGEM_BSR 5-6	(1.1737) Das Blastocidin-Gen mit A15-Promotor als PCR-Produkt mit den Primern „BSR05“ und „BSR06“ an „pGEM-7Zf(-)-BSR“ in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T ligiert.
pGEM_BSR int 5-6	(1.1774) Das Blastocidin-Gen mit A15-Promotor als PCR-Produkt mit den Primern „BSR05“ und „BSR06“ an „pGEM-7Zf(-)-BSR <i>s17</i> int“ in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T ligiert.
pGEM_BSR 5-6 cmr	(nur Minilysat) Chloramphenicol-Resistenz als PCR-Produkt mit den Primern neo3 und neo3.1 an „pBD-Gal4Cam“ (Fa. Stratagene) in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und mit <i>Nsi</i> I und <i>Spe</i> I in pGEM_BSR 5-6 kloniert.
pGEM_BSR int 5-6 cmr	(nur Minilysat) Chloramphenicol-Resistenz als PCR-Produkt mit den Primern neo3 und neo3.1 an „pBD-Gal4Cam“ (Fa. Stratagene) in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und mit <i>Nsi</i> I und <i>Spe</i> I in pGEM_BSR int 5-6 kloniert.
pGEM_A-BSR	(nur Minilysat) Komplettes A-Modul von TRE5-A als PCR-Fragment mit den Primern „neo6“ und „neo7“ an „pB3“ in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und als <i>Sal</i> I / <i>Hind</i> III-Fragment in „pGEM_BSR 5-6 cmr“ kloniert.
pGEM_A-BSRi	(nur Minilysat) Komplettes A-Modul von TRE5-A als PCR-Fragment mit den Primern „neo6“ und „neo7“ an „pB3“ in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T zwischenkloniert und als <i>Sal</i> I / <i>Hind</i> III-Fragment in „pGEM_BSR int 5-6 cmr“ kloniert.
pGEM_A-BSR-C	(1.1723) C-Modul von TRE5-A als <i>Eco</i> R I / <i>Bam</i> H I-Fragment aus „Puc 9#17“ (Geier 1996) in pGEM_A-BSR kloniert.
pGEM_A-BSRi-C	(1.1778) C-Modul von TRE5-A als <i>Eco</i> R I / <i>Bam</i> H I-Fragment aus „Puc 9#17“ (Geier 1996) in pGEM_A-BSRi kloniert.
pGEM_A-ORF1-BSRi-C	(1.1885) Kompletter TRE5.A-ORF 1 (1354 bp) in Orientierung des A-Moduls mit <i>Hind</i> III hinter A-Modul in „pGEM_A-BSRi-C“ kloniert.
pGEM_A-ORF1(I10*)-BSRi-C	(1.1715) TAA-Stopp-Codon durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „ORF Stopp“ an Aminosäureposition 10 in ORF1 von „pGEM_A-ORF1-BSRi-C“ eingefügt.

---

pGEM_A-ORF1-BSRi-C SD	(1.1791) Splice-Donor-Site in „pGEM_A-ORF1-BSRi-C“ durch Einzelstrangmutagenese mit dem Primer „BSR07“ zerstört.
pGEM_A-ORF1-BSRi-A8T	(1.1739) A8-Terminator als <i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III-Fragment aus pA6Ptlac.1 (Dingermann 1992) in pGEM-7Zf(-) zwischenkloniert und als <i>Xho</i> I / <i>Bam</i> HI-Fragment in „pGEM_A-ORF1-BSRi-C“ kloniert. Das C-Modul wurde dabei entfernt.
pGEM_7Zf(-)-A6P	(1.1891) A6-Promotor mit <i>Xba</i> I aus „pDNeo2“ (Witke 1987) in „pGEM_7Zf(-)“ kloniert (5'-Ende des Promotors auf der SP-Seite)
pGEM_A6P-ORF1-BSRi-C	(1.1727) A6-Promotor mit <i>Sph</i> I / <i>Hind</i> III aus „pGEM_7Zf(-)-A6P“ in „pGEM_A-ORF1-BSRi-C“ kloniert. Das A-Modul wurde dabei entfernt. Der A6-Promotor wurde so kloniert, dass die beiden ATGs aus dem Promotor <i>in frame</i> mit dem ATG aus ORF1 liegen.
pISAR	(1.1339) <i>Dictyostelium discoideum</i> Expressionsvektor mit G418-Resistenzkassette (Maniak 1989).
pDXA HC-ORF1	(1.1489) <i>Dictyostelium discoideum</i> TRE5-A-ORF1-Expressionsvektor mit G418-Resistenzkassette (Hentschel 2001a).
pGEMasORF	(1.1582) 3'-Ende von TRE5-A als PCR-Fragment mit Primern asORF01 und asORF02 an „pB3“ in den Vektor pGEM <sup>®</sup> T ligiert.

# Lebenslauf

Name	Oliver Siol
Geburtstag	04.03.1975
Geburtsort	Lüdenscheid
1981-1985	Grundschule Spormecke Schalksmühle
1985-1991	Realschule Schalksmühle
1991-1994	Anne-Frank-Gymnasium Halver Abschluss: <b>Abitur</b>
10/1995 - 02/2000	<b>Studium</b> an der Märkischen Fachhochschule Iserlohn Physikalische Technik, Schwerpunkt Biotechnik Abschluss: Diplom Ingenieur (FH)
05/1999 - 02/2000	<b>Diplomarbeit</b> am Max Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin Titel: Vergleichende molekulare zytogenetische Untersuchungen von pericentromerischen Chromosomenregionen bei Mensch und Menschenaffe
03/2000 - 10/2001	<b>Studium</b> an der Märkischen Fachhochschule Iserlohn Maschinenbau, Schwerpunkt Produktionstechnik
01/2002 - 03/2006	<b>Promotion</b> an der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main, Institut für pharmazeutische Biologie Titel: Untersuchungen zum spezifischen Integrationsmechanismus der TRE5-A Retrotransposons in <i>Dictyostelium discoideum</i>
04/2006 -	<b>Postdoc</b> an der Friedrich Schiller Universität Jena Institut für pharmazeutische Biologie

6.4.2006

## Publikationen

### **CbfA, the C-module DNA-binding factor, plays an essential role in the initiation of *Dictyostelium discoideum* development.**

Thomas Winckler, Negin Iranfar, Peter Beck, Ingo Jennes, Oliver Siol, Unha Baik, William F. Loomis, und Theodor Dingermann

Eukaryotic Cell, 2004, **3**: 1349-1358

### **The C-Module DNA-Binding Factor Mediates Expression of the *Dictyostelium* Aggregation-Specific Adenylyl Cyclase ACA**

Oliver Siol, Theodor Dingermann und Thomas Winckler

Eukaryotic Cell, 2006, **5**: 658-664

### **On the contribution of RNA polymerase III transcription factor IIIC to the selection of integration sites by *Dictyostelium* retrotransposon TRE5-A**

Oliver Siol, Moustapha Boutliliss, Gernot Glöckner, Thanh Chung, Theodor Dingermann und Thomas Winckler

Molecular and Cellular Biology, 2006 submitted

### **ORF1 protein of *Dictyostelium* non-LTR retrotransposon TRE5-A mediates integration site selection**

Thanh Chung, Oliver Siol, Moustapha Boutliliss, Theodor Dingermann und Thomas Winckler

Science 2006 submitted.

## Posterpräsentationen

### **How to observe active tRNA gene-targeted retrotransposons in the *Dictyostelium* genome**

Peter Beck, Oliver Siol, Theodor Dingermann und Thomas Winckler

Keystone-Symposium 2003, Santa Fe, New Mexico (USA)

### **Is the expression of the *Dictyostelium* tRNA genetargeted retrotransposon TRE5-A regulated by RNAi ?**

Oliver Siol, Theodor Dingermann und Thomas Winckler

International *Dictyostelium* Conference 2003, Lorne (Australien)

### **How TRE5-A retrotransposons select tRNA genes as integration targets - an update**

Oliver Siol, Thanh Chung, Theodor Dingermann und Thomas Winckler

International *Dictyostelium* Conference 2004, Sainte-Adèle, Québec (Kanada)

### **Targeted Integration of *Dictyostelium* Retrotransposons: Concept for safer gene transfer vectors**

Thomas Winckler, Oliver Siol, Thanh Chung, Theodor Dingermann

ZAFES Meeting 2005 Frankfurt am Main

### **RNA polymerase III transcription factor complex TFIIIB determines chromosomal integration sites of retrotransposon TRE5-A**

Thanh Chung und Oliver Siol, Theodor Dingermann und Thomas Winckler

International *Dictyostelium* Conference 2005, Autrans (Frankreich)



# Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben danke ich ganz herzlich. Dazu gehören vor allem:

Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler für die Überlassung des wirklich interessanten Themas, die sehr gute Betreuung und die Bereitschaft alle Fragen sofort, verständlich und kompetent zu beantworten. Vor allem auch dafür, dass er mich immer unterstützt hat, ohne großen Druck selbständig zu arbeiten, Ideen zu entwickeln und diese auch umzusetzen. Ausserdem möchte ich mich für die große Unterstützung bei der Ausarbeitung der Posterpräsentationen und Puplicationen, sowie das Vertrauen, mich um die halbe Welt zu schicken um unsere Arbeitsgruppe beim Dicty-Meeting in Australien zu vertreten, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dingermann für die Aufnahme an seinem Institut, die Diskussionsbeiträge und Vorschläge in diversen Seminaren, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Thanh Chung, Monika Baik, Ingo Jennes, Peter Beck und Moustapha Boutliliss, mit denen es Spass gemacht hat, zusammen zu arbeiten und die auch beim Vereinfachen einiger Laborabläufe behilflich waren.

Herrn Prof. Dr. Rolf Marschalek für einige interessante Ideen und natürlich für die „Erfindung“ der TRE5-A-Elemente.

Den restlichen Rolfis: Bastl, Sven, Jürgen, Jens, Claus, Heidi, Anne G. und Anne B., Björn Karen, Claris, Annika, Miriam und Ute für die angenehme Zeit abseits der Laborbench.

Sowie meiner Familie und allen anderen, die mich auf welche Art auch immer, unterstützt haben.